

ヒト GnT-IVa (MGAT4A) および昆虫オルソログの C 末端ドメインの構造解析 Structural analysis of the C-terminal domains of human GnT-IVa (MGAT4A) and an insect ortholog

宮崎剛壱^{1,2,3*}, 岡希望², 森壮太², 池谷真里奈³

¹ 静岡大学 グリーン科学技術研究所, 〒422-8529 静岡県静岡市駿河区大谷 836

² 静岡大学 大学院総合科学技術研究科 農学専攻, 〒422-8529 静岡県静岡市駿河区大谷 836

³ 静岡大学 創造科学技術大学院 自然科学系教育部 バイオサイエンス専攻,
〒422-8529 静岡県静岡市駿河区大谷 836

Takatsugu MIYAZAKI^{1,2,3*}, Nozomi OKA², Sota MORI², Marina IKEGAYA³

¹ Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka University,
836 Ohya, Suruga-ku, Shizuoka, Japan

² Department of Agriculture, Graduate School of Integrated Science and Technology, Shizuoka University, 836 Ohya, Suruga-ku, Shizuoka, Japan

³ Department of Bioscience, Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University,
836 Ohya, Suruga-ku, Shizuoka, Japan

1 はじめに

N 結合型糖鎖はタンパク質の普遍的な翻訳後修飾であり、糖タンパク質のフォールディング、安定性、輸送、機能発現などに関与している [1]。がんなどの様々な疾患との関連が報告されており、それらのバイオマーカーとなる。真核生物においては小胞体からゴルジ体にかけて生合成される。オリゴ糖転移酵素によって特定のアスパラギン残基に糖鎖が付加されたのちに、種々の糖質加水分解酵素や糖転移酵素によって糖残基の切除や付加が行われ、多様な構造が形成される。

GnT-IV (MGAT4) はゴルジ体に局在する糖転移酵素であり、非還元末端側が β -1,2-GlcNAc (N-アセチルグルコサミン) でキャップされた糖鎖構造にさらに β -1,4-GlcNAc の枝分かれ構造を形成する。GnT-IV は 4 つのパラログが存在し、GnT-IVa と GnT-IVb は糖鎖の α -1,3-mannosyl arm に、GnT-IVc (GnT-VI) は α -1,6-mannosyl arm に GlcNAc を付加する [2]。一方で GnT-IVd (MGAT4D) の酵素活性は見出されていない。近年、N 結合型糖鎖の生合成に関わる酵素の立体構造の報告が徐々に増えているが、GnT-IV の立体構造の報告は全くない。我々は、GnT-IVa の立体構造予測から、推定酵素ドメインの C 末端側に糖結合モジュール様 (CBML) ドメインがあることを見出した。そこで、ヒト由来 GnT-IVa の C 末端ドメイン (HsCBML) とその昆虫由来オルソログ (BmCBML) の構造解析を行った。

2 実験

HEK293 細胞およびカイコ (*Bombyx mori*) 5 齢幼虫から調製した cDNA を鋳型に、それぞれのタンパク質をコードする DNA を増幅し、pET-28a(+) ベクターに組み込み、大腸菌 BL31(DE3) にて His タグ融合

タンパク質として発現させた。Ni アフィニティークロマトグラフィーで精製した後、20 mg/mL まで濃縮を行い、ハンギングドロップ蒸気拡散法にて 20°C で結晶化した。20% エチレングリコールを含む結晶化母液を抗凍結剤として用い、BL-5A または AR-NW12A ビームラインで X 線回折データを収集した。いずれのタンパク質も AlphaFold2/ColabFold で生成した立体構造モデルを鋳型とした分子置換法によって構造を決定した。

3 結果および考察

HsCBML の結晶構造を 1.97 Å 分解能で決定した。また、BmCBML はリガンドフリー構造と GlcNAc との複合体構造をそれぞれ 1.47 と 1.15 Å 分解能で決定した。いずれも、 β -サンドイッチ構造を呈しており、糖結合モジュールファミリー-32 (CBM32) と最も構造類似性が高かった (図 1)。両タンパク質は等温滴定カロリーメトリーを用いた相互作用解析によって GlcNAc と親和性を示すことが明らかになっており、BmCBML との共結晶構造では、結晶学的非対称単位中の 2 分子の BmCBML にそれぞれ 1 分子ずつ GlcNAc が結合していた。

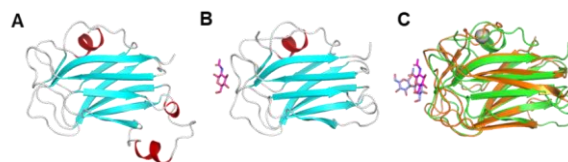


図 1 : HsCBML (A) と BmCBML (GlcNAc 複合体, B) の全体構造。(C) BmCBML (green) と CBM32 (PDB 2WDB, orange) との重ね合わせ。GlcNAc は magenta、CBM32 に結合している GlcNAc β -1,2-mannose は blue のスティックモデルで示した。

GlcNAc と相互作用しているアミノ酸残基は、HsCBML や GnT-IVb, GnT-IVc においても高く保存されていた。また、GlcNAc と結合することが報告されている *Clostridium perfringens* の β -N-acetylhexosaminidase が持つ CBM32 ドメイン [3] とも相互作用するアミノ酸残基が共通していた (図 2)。以上の結果から、CBML ドメインは糖鎖の末端に存在する GlcNAc 残基を認識することで、酵素の糖転移反応を補助している可能性が考えられた。

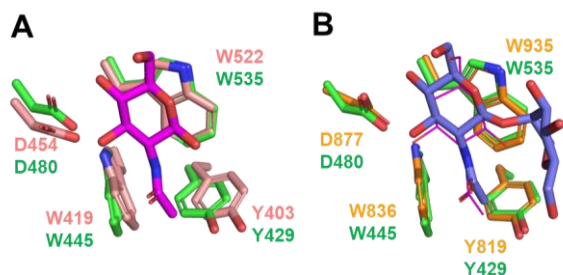


図 2 : (A) HsCBML (pink) と BmCBML-GlcNAc 複合体 (green) の GlcNAc 結合部位の重ね合わせ。(B) BmCBML-GlcNAc 複合体 (green) と CBM32 (PDB 2WDB, orange) との重ね合わせ。GlcNAc は magenta、CBM32 に結合している GlcNAc β -1,2-mannose は blue のスティックモデルで示した。

以上の研究成果に基づき、糖質関連酵素をアミノ酸配列の相同性に基づいて分類している CAZy データベース (<https://www.cazy.org/>) の運営チームとの協議により、新しい CBM ファミリー (CBM94) が設立されることとなった。

4 まとめ

ヒト由来糖転移酵素 GnT-IVa の C 末端に存在する糖結合ドメイン HsCBML およびカイコ由来オルソログ BmCBML の立体構造を決定し、糖の結合メカニズムを明らかにした [4]。本研究により、CAZy データベースにおいて新しいファミリーである CBM94 が設立された [5]。

謝辞

X 線回折実験を行うにあたり、サポートいただきました PF ビームラインスタッフの方々に感謝申し上げます。

参考文献

- [1] Varki A, *Glycobiology* **27**, 3–49, 2017.
- [2] Nagae M et al., *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 437, 2020.
- [3] Ficko-Blean E, Boraston AB, *J. Mol. Biol.* **390**, 208–220, 2009.
- [4] Oka N, Mori S et al., *Glycobiology* **32**, 1153–1163, 2022.
- [5] <http://www.cazy.org/CBM94.html>

成果

1. 岡 希望, 森 壮太, 池谷 真里奈, 朴 龍洙, 宮崎 剛臣: *N*-acetylglucosaminyltransferase IV の C 末端領域の機能と構造の解析、第 74 回日本生物工学会大会、2022 年 10 月 18 日
2. Oka N, Mori S, Ikegaya M, Park EY, Miyazaki T, *Glycobiology* **32**, 1153–1163, 2022
3. Miyazaki T (Author and Responsible Curator) CAZyedia, Carbohydrate Binding Module Family 94, https://www.cazyedia.org/index.php/Carbohydrate_Binding_Module_Family_94

* miyazaki.takatsugu@shizuoka.ac.jp