

(様式 1-1)

提出日：2023 年 5 月 11 日

2022 年度 大阪大学蛋白質研究所 拠点事業

研究成果報告書

(1) 事業名 (下記より該当事業名を選択し、ほかは削除して下さい。)

共同研究員

(2) 研究代表者

氏名：宮原郁子

所属機関名・部局名・職名：大阪公立大学・大学院理学研究科・准教授

(3) 研究課題名 (申請時に記載したものと同一課題名を記入して下さい。)

糖質加水分解酵素ファミリー85に属する酵素の基質認識機構

(4) 蛋白質研究所受入担当教員

教員名：栗栖 源嗣

(研究室名：蛋白質結晶学)

(5) 研究成果の概要 (公開)

*背景および目的、方法と結果、について、公開して差し支えない範囲で1ページ以内で記載。

研究の背景および目的

ヒト唾液中より発見された Endo- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ HS(Endo HS)は、天然のタンパク質から複合型糖鎖を遊離する活性を持つこと、また水酸化化合物に遊離した複合型糖鎖を転移する機能を持つ。本酵素は、フコースの有無にかかわらず複合型糖鎖にのみ作用する一方でハイマンノース型には全く作用しないことから、バイオ医薬品への利用が注目され、糖鎖工学のツールとしての応用が進められている。本研究では、EndoHS の基質認識機構及び糖鎖転移反応機構を三次元立体構造から明らかにすることを目的としている。

方法と結果

N 末端の膜貫通領域を欠損した EndoHS について、セレノメチオニン蛋白質を発現・精製し、自動結晶化ロボットを使用してスクリーニングを行った。その結果、0.1 M Bis-tris 緩衝液 pH 5.5、2.0 M 硫酸アンモニウム条件で多結晶が析出した。得られた結晶を使ってマイクロシーディングを行うことにより、再現性よく板状の単結晶を析出させることができた。X 線回折実験は、SLS X06SA にて 0.98 Å の波長を用いて行い、1.95 Å 分解能のデータを収集することができた。SAD 法により位相を決定し、アミノ酸残基は 28-1008 番目まで構築し、最終的に Rwork/Rfree = 0.191/0.235 となった。全体構造は5つのドメインから構成されており、N 末端側の3つのドメインは GH85 ファミリーに属する EndoA や EndoD と非常によく似たフォールドを持っているが、C 末端側の2つのドメインは Endo A や Endo D には存在していなかった。GH85 ファミリーに共通な3つのドメインのうち、TIM バレルである触媒ドメインに触媒残基(Glu, Asn, Tyr) が存在すると推定されており、立体構造の比較により EndoHS においてもこれらが保存されていることが分かった。そこで、推定される触媒残基を変異させた酵素をそれぞれ作成し、活性測定を行った。現在、触媒残基を変異させて活性が消失した酵素を用いて、基質との複合体の作成を試みている。また、C 末端側の2つの独自ドメインのうち、1つは糖鎖結合に関与していると推測されたため、このドメインのみを発現させ、機能解明をおこなっている。