

(様式 1-1)

提出日：2024 年 5 月 8 日

2023 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- $\beta$ -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

前年度、セレノメチオニン蛋白質 EndoHS を用い、自動結晶化ロボットを使用してスクリーニングにより良質な結晶を得ることが出来た。また、その結晶を用いて X 線構造解析を行い、立体構造モデルの構築に成功していた。EndoHS でも GH85 ファミリーで保存されている 3 つの触媒残基(Glu, Asn, Tyr) が存在していたため、これらの残基の変異酵素を作成し活性を調べたところ、いずれの変異体でも活性が減少することが分かった。また、2 つの触媒残基を同時に変異させたものについて完全に失活したため、この二重変異体 EndoHS と基質の複合体の作成を試みた。二重変異体 EndoHS は、Native 体と同じ条件で結晶を得ることが出来たが、結晶のサイズは小さく、Native に比べて低い分解能のデータしか得られなかったため、今後さらなる条件検討を行う予定である。また、二重変異体 EndoHS 結晶に生成物または基質アナログのソーキング実験を行ったが、活性部位に結合した構造は得られなかった。EndoHS の基質糖蛋白質であるヒト由来トランスフェリンを用い、Native 体、二重変異体、ドメイン欠損体を用いて複合体形成を Native-PAGE で確認したところ、二重変異体のみ複合体を形成していることが明らかとなった。また、二重変異体 EndoHS と基質糖蛋白質の混合溶液をカラムクロマトグラフィーにかけたところ、複合体と考えられるピークが得られた。