

(様式 1-1)

提出日：2025 年 5 月 8 日

2024 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、ほかは削除してください。)

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ください。)

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

研究の背景および目的

タンパク質についての糖鎖は、タンパク質の物理的性質を変えるだけでなく、細胞間の認識等にも関わる重要な高分子である。糖質加水分解酵素ファミリー85 (GH85) に属する酵素は糖鎖転移活性を持つため、糖転移生成物を合成するために有用であるが、立体構造の報告は少なく、原子レベルでの機能解明はなされていない。我々は、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)や、*Agaricus bisporus* 由来 Endo- $\beta$ -N-アセチルグルコサミニダーゼ (EndoAB)をターゲットとして、その三次元立体構造から基質認識機構および糖鎖転移反応機構を明らかにすることを目的としている。

方法と結果

我々は既に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て、その構造解析に成功した。また、GH85 ファミリーで保存されている触媒残基を変異させることにより、完全に活性を失った変異型酵素を得ることができた。変異型 EndoHS は、大量発現、精製を行い、野生型と似た条件で高分解能の結晶を得ることが出来た。また、この結晶について構造解析をすることにより野生型とほぼ同じ構造であることが分かった。変異型 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ているが、現在のところ複合体構造は得られていない。変異型 EndoHS と基質糖蛋白質であるヒト由来トランスフェリンの複合体は、HPLC やゲルシフトアッセイにより、複合体を形成していることを確認した。さらに、トランスフェリン以外の複合型糖鎖をもつ様々な糖タンパク質に対しても複合体を形成できること、ハイマンノース型糖鎖を持つ糖タンパク質とは複合体を形成しないことを確認した。