

微生物を活用した N 型糖鎖代謝酵素の機能解明とその応用



京都大学大学院生命科学研究所 梅川 碧里

はじめに

糖質は、細胞が ATP を生産する源となるとともに、タンパク質や膜上において、多糖が連結した「糖鎖」として存在し、細胞の構造維持や生体分子の機能に重要な役割を持つ。筆者は、「糖鎖の代謝分解」に関わる種々の酵素の機能について、微生物を活用して、分子・細胞レベルで明らかにするとともに、有用物質生産に向けた応用展開を目指している。本研究では、タンパク質のアスパラギン残基に結合する N-結合型 (N 型) 糖鎖の代謝分解に関わる微生物酵素の機能と活性に着目して行った。

1. 微生物由来のエンドグリコシダーゼを用いた新規糖タンパク質調整法の開発

バイオ医薬品として用いられるタンパク質の多くは、糖鎖の付加した糖タンパク質であり、糖鎖の有無や微細な構造の違いによりその機能や生理活性は大きく異なる。とりわけ、N 型糖鎖末端にシアル酸が付加したヒト型のシアロ複合型糖鎖は、多くのサイトカインの生理活性に重要である。抗貧血薬として用いられるエリスロポエチンは、3本の N 型糖鎖を持つ糖タンパク質であるが、末端のシアル酸が欠如すると血中半減期が減少し、生理活性を殆ど示さない。そのため、特定の糖鎖を有する均一な糖タンパク質を効率的に調製する手法が必要となる。筆者らは、微生物由来の N 型糖鎖代謝酵素が有する特異的な糖転移付加機能を飛躍的に向上させ、ヒト型糖鎖を有する糖タンパク質を簡便かつ高収率で生産する手法を開発した。

本研究で着目する、糸状菌由来のエンドグリコシダーゼ (Endo-M) の特徴は、シアロ複合型糖鎖を含む N 型糖鎖に幅広く作用してオリゴ糖を切り出し、加水分解するだけでなく、1 残基の GlcNAc が付加したポリペプチドに N 型糖鎖のオリゴ糖を転移付加する糖転移活性を有することである。しかし、Endo-M は、本来の糖加水分解活性が強く、糖転移生成物は直ちに加水分解されごく微量しか得られないことが、タンパク質に糖鎖付加するツールとして活用するための問題であった。

筆者らは、まず、Endo-M を遺伝子操作の容易な大腸菌で生産させる系を構築し、Endo-M の部位特異的変異体を効率的に作製することを可能にした。当時、ホモログ間で結晶構造は報告されていなかったため、アミノ酸配列の相同性などから、活性中心付近に位置することが予測された多種類のアミノ酸残基の部位特異的変異体を網羅的に作製し、酵素学的解析を行った。その結果、糖転移活性の初速度が野生型 Endo-M の 2 倍程度まで上昇した変異体酵素 Y217F を選抜し、目的の糖転移生成物の最大収量を大幅に向上させることに成功した¹⁾。しかし、やはり糖転移生成物は時間とともに加水分解され、長時間反応させると消失した。そこで筆者は、「糖転移生成物を加水分解しない変異体」を作製することを試みることにした。

多くの糖加水分解酵素は、酸/塩基触媒残基と求核触媒残基

の 2 つの触媒残基を有する。一方、Endo-M を含む一部の糖加水分解酵素は、酸/塩基触媒残基のみを有し、基質の GlcNAc の 2-アセトアミド基が求核基として機能することによって、環状のオキサゾリン中間体構造が形成される。同メカニズムにより機能するキチナーゼや β -ヘキソサミニダーゼにおいては、活性中心の Asp がオキサゾリン反応中間体形成に重要な鍵残基として機能することが立体構造解析から示されている。筆者は、Endo-M のホモログ間では Asp の代わりに非酸性残基の Asn が保存されていることに着目し、そのアラニン置換体 (Endo-M-N175A) を作製した。そして、Endo-M-N175A は、通常の N 型糖鎖に対する触媒活性を殆ど有さないが、オキサゾリン反応中間体構造を有する糖オキサゾリンを化学合成して、供与体基質として反応させることにより、糖転移生成物を生成することを見出した¹⁾。N 型糖鎖に対する触媒活性を失った Endo-M-N175A は、生成した糖転移生成物を加水分解することなく蓄積できることが判明した。バクテリアのホモログである Endo-A において、対応する変異体を作製した結果、同様の結果が確認された²⁾。これらの結果は、Endo-M のホモログ間では、イレギュラーな Asn がオキサゾリン中間体形成の鍵残基として機能することを示唆している。

筆者らは、Endo-M の Asn-175 を他の全てのアミノ酸に置換した変異体を作製し、グルタミン残基に置換した Endo-M-N175Q が、糖オキサゾリンに対する糖転移活性が著しく高められた変異体であることを見出した³⁾。ヒト型のシアロ複合型糖鎖を、野口らにより開発された簡便法⁴⁾を用いてオキサゾリン化し、Endo-M-N175Q と反応させた結果、均一なヒト型糖鎖を有する目的タンパク質が約 80% の高収率で得られた⁵⁾。また、本手法を用いていくつかの生理活性ペプチドにシアロ複合型糖鎖を付加した結果、生理活性を損なうことなく、プロテアーゼ抵抗性を付与することができた^{5),6)}。

上記 Endo-M-N175Q 及び Y217F は、2011 年に東京化成工業より市販化され、タンパク質に N 型糖鎖を付加するツールとして利用されている。本研究で新たに開発した「エンド酵素のアスパラギン変異体と糖オキサゾリンを用いて糖転移生成物を蓄積させる」という手法は、いくつかのホモログ酵素にも適用され、同様の変異体が創出されている。本研究において、エンドグリコシダーゼを活用してタンパク質に N 型糖鎖を効率的に付加する技術を確立することができたと考えている。

2. 酵母を用いた細胞内 N 型糖鎖代謝制御と栄養応答の機構解明

生体内における細胞内代謝分解の機能はさまざまな環境変化に応じて厳密に調節制御される。細胞内代謝の代表的な機構の一つが、真核生物に保存された大規模分解経路「オートファジー」である。オートファジーは、不要なタンパク質やオルガネラなどのさまざまな細胞質成分を液胞 (またはリソソーム) に膜輸

送し分解するシステムである。オートファジーは、栄養飢餓時に自己タンパク質を分解してアミノ酸を再利用する生理的意義を持つと考えられているが、「オートファジーを介したリサイクル」に関する知見は乏しい。オートファジーの終着点である液胞には、タンパク質のほか、種々の糖鎖も輸送され分解されるが、実際にその栄養飢餓時における重要性を示した報告は殆どない。本研究では、未解明な「オートファジーを介したリサイクル」の意義について、糖質代謝の視点から明らかにすることを目的として、細胞外環境に応じて運命決定する真核モデル生物である出芽酵母を用いて解析を行った。

まず、オートファジーが強く誘導される栄養飢餓条件下で、細胞内糖代謝分解が誘導されるのかを明らかにするため、酵母の細胞内に豊富に存在する高マンノース型のN型糖鎖の代謝分解を担う α -マンノシダーゼ(Ams1)の細胞内活性の変化に着目した。それまで、Ams1は恒常的に細胞質遊離糖鎖を代謝すると考えられてきたが、筆者らは、Ams1の細胞内活性は富栄養条件下では非常に微弱であり、アミノ酸やグルコースなどの栄養飢餓時に著しく上昇することを明らかにした⁷⁾。Ams1は栄養応答に重要なTORC1キナーゼおよびProteinkinaseAにより下方制御され、飢餓に応じてストレス応答性転写因子Msn2/4により転写誘導されることを明らかにした。加えて、オートファジーにより液胞に輸送されプロテアーゼ依存的プロセッシングを受けることで翻訳後レベルでも活性化されることを明らかにした。これらの結果から、Ams1を介した細胞内マンノシド糖鎖の代謝は、オートファジーと連動して栄養飢餓時に重要な生理的意義を持つことが考えられる。

また筆者らは、Ams1の細胞内活性が栄養シグナルに応じて変動することを利用して、細胞外からの栄養伝達に関わる新規の膜機能分子Ecm33を同定している⁸⁾。Ecm33の欠損株では、富栄養条件下においても細胞内が飢餓状態にシフトしており、TORC1が不活化することで、オートファジーが亢進した。Ecm33は、細胞表層において、細胞外グルコースの効率的な取り込みに関与し、栄養増殖時における活発なATP生産と細胞増殖を促す生理機能を担うことが示唆された。

本研究によって、細胞外炭素源の飢餓に端を発し、最終的に細胞内糖鎖の代謝分解に至るまでのシグナル伝達経路に関わる新たな分子および分子機構の解明に貢献できたと考えている。今後は、糖タンパク質糖鎖の「分解経路」の重要性と新たな意義を明らかにしていきたい。また、同定した細胞外糖質の資化代謝に関わる遺伝子を改変し、細胞外糖質から効率的にエタノール生産できる酵母の創製にも応用展開したい。

(引用文献)

- Umekawa M, Huang W, Li B, Fujita K, Ashida H, Wang LX, Yamamoto K. Mutants of *Mucor hiemalis* endo-beta-N-acetylglucosaminidase show enhanced transglycosylation and glycosynthase-like activities. *J Biol Chem*, Vol. 283, p 4469-4479 (2008)
- Huang W, Li C, Li B, Umekawa M, Yamamoto K, Zhang X, Wang LX. Glycosynthases enable a highly efficient chemoenzymatic synthesis of N-glycoproteins carrying intact natural N-glycans. *J Am Chem Soc*, Vol. 131, p 2214-2223 (2009)
- Umekawa M, Li C, Higashiyama T, Huang W, Ashida H, Yamamoto K, Wang LX. Efficient glycosynthase mutant derived from *Mucor hiemalis* endo-beta-N-acetylglucosaminidase capable of transferring oligosaccharide from both sugar oxazoline and natural N-glycan. *J Biol Chem*, Vol. 285, p 511-521 (2010)
- Noguchi M, Tanaka T, Gyakushi H, Kobayashi A, Shoda SI. Efficient synthesis of sugar oxazolines from unprotected N-Acetyl-2-amino sugars by using chloroformamimidium reagent in water. *J Org Chem*, Vol. 74, p 2210-2212 (2009)
- Umekawa M, Higashiyama T, Koga Y, Tanaka T, Noguchi M, Koba yashi A, Shoda S, Huang W, Wang LX, Ashida H, Yamamoto K. Efficient transfer of sialo-oligosaccharide onto proteins by combined use of a glycosynthase-like mutant of *Mucor hiemalis* endoglycosidase and synthetic sialo-complex-type sugar oxazoline. *Biochim Biophys Acta*, Vol. 1800, p 1203-1209 (2010)
- Higashiyama T, Umekawa M, Nagao M, Katoh T, Ashida H, Yamamoto K. Chemo-enzymatic synthesis of the glucagon containing N-linked oligosaccharide and its characterization. *Carbohydr Res*, Vol. 455, p 92-96 (2018)
- Umekawa M, Ujihara M, Makishima K, Yamamoto S, Takematsu H, Wakayama M. The signaling pathways underlying starvation-induced upregulation of α -mannosidase Ams1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta*, Vol. 1860, p 1192-1201 (2016)
- Umekawa M, Ujihara M, Nakai D, Takematsu H, Wakayama M. Ecm33 is a novel factor involved in efficient glucose uptake for nutrition-responsive TORC1 signaling in yeast. *FEBS Lett*, Vol. 591, p 3721-3729 (2017)

謝辞 本研究は、京都大学大学院生命科学研究科統合生命科学研究専攻分子応答機構学分野、および立命館大学生命科学部生物工学科にて実施したものです。カビ由来エンドグリコシダーゼに関する研究を行う機会を与えてくださり、ご指導戴くとともに、研究者として私を育成してくださった、山本憲二先生(現 石川県立大学特任教授)ならびに芦田久先生(現 近畿大学教授)に心より御礼申し上げます。本研究は、メリーランド大学のLai-Xi Wang先生ならびに東北大学の正田晋一朗先生のグループ、鹿児島大学の藤田清貴先生との共同研究による成果です。幾度もご助言をくださり、導いてくださった先生方に深く感謝致します。酵母を用いた糖代謝制御に関する研究を実施するにあたっては、酵母を扱う細胞生物学の基礎をご指導戴き、多くのリソースをご提供戴いたミシガン大学のDaniel Klionsky先生、自由に研究遂行する機会と環境を与えてくださった立命館大学の若山守先生、共同研究を行わせて戴いた京都大学の竹松弘先生に心より御礼申し上げます。私が今日まで研究を続けることができたのは、ご支援くださった多くの先生方、当該研究に貢献してくれた学生の皆様、そして家事育児に協力してくれた家族・両親のお陰であり、心より感謝致します。最後になりましたが、日ごろから研究に関するご助言をくださり、本賞にご推薦くださいました京都大学の片山高嶺先生に深く御礼申し上げます。