

## 微生物エンドグリコシダーゼの機能改変とその糖鎖生物学への応用

# Improvement of Function of Microbial Endoglycosidase and Its Application for Glycobiology

石川県立大学 山本憲二

生体内のほとんどのタンパク質は多様な糖鎖が付加した糖タンパク質として存在し、その糖鎖構造の違いがタンパク質の機能に大きな影響を及ぼすこともある。糖鎖は細胞間の認識を初めとして、発生・分化、疾病の発症など、さまざまな生命現象に深く関与している。遺伝子を基にして生合成されるタンパク質に糖鎖が付加することはタンパク質の機能を決定付ける大きなイベントのひとつであり、多くの生体内エネルギーが使われ、多くの酵素が関わる。このような糖タンパク質の糖鎖をタンパク質との結合部より加水分解して糖鎖を遊離するエンドグリコシダーゼ (endo- $\beta$ -N-acetylglucosaminidase) を我々は土壌より単離同定した糸状菌 *Mucor hiemalis* より見出した。本酵素は他の微生物起源の酵素とは異なり、酵母やカビの糖タンパク質が有する比較的単純な構造の糖鎖 (high-mannose type) のみならず、ヒトや動物由来の糖タンパク質が持つ複雑な構造の糖鎖 (complex type) にも作用する新奇な酵素であり、Endo-M と名付けた。また、本酵素は加水分解活性のみならず、糖転移活性をも有し、水酸基を持つ化合物に供与体から糖鎖を転移付加できることを見出した。すなわち、細胞内で数十にも及ぶ反応を経て行われる糖鎖の付加反応をひとつの酵素のみによって行うことができる。

Endo-M は本来、加水分解酵素であるため、その糖転移活性によって反応生成物を得ようとする際に問題となるのは、糖鎖を有する生成物が Endo-M の加水分解活性によって分解されるためにその生成物の収率が低下することである。そこで、加水分解活性が抑制され、糖転移活性が促進されるような Endo-M の変異酵素を作成することを試みた。Endo-M の活性中心付近のさまざまなアミノ酸残基を部位特異的変異させた酵素を作成して調べたところ、加水分解活性が抑制され、糖転移活性が促進されるような変異酵素 Y217F を得ることができた。この変異酵素はチロシン残基をフェニールアラニン残基に置換したために、加水分解活性が低下する一方、チロシンの水酸基が除かれたことにより、糖転移反応の基質が活性中心に入り込み易くなって、糖転移活性が上昇したものと考えられる。また、Endo-M の酵素反応はオキサゾリン中間体を經由する substrate-assisted catalytic mechanism と呼ばれるユニークな機構によって進行することが知られているが、N-型糖鎖のオキサゾリン中間体を合成し、それを供与体基質として用いて、加水分解活性が抑制され糖転移反応のみの進行が促進される変異酵素 N175Q (アスパラギン残基をグルタミン残基に置換) を得た。この変異酵素と N-型糖鎖のオキサゾリン中間体を基質として反応することにより、糖鎖が付加された糖転移生成物は 70% 以上の高い収率で得ることができ、本酵素が機能性糖鎖複合体の合成に実用的な酵素となり得る可能性を示した。