

深海メタゲノム情報から見出された新規糖質分解酵素群の機能的多様性の解明

海洋研究開発機構 生命理工学センター 澄田 智美

【略歴】

2010 年 3 月 九州大学大学院 生物資源環境科学府 博士後期課程修了博士（農学）
2010 年 4 月 理化学研究所 横浜研究所 生命分子システム基盤研究領域 特別研究員
2012 年 4 月 日本学術振興会 特別研究員 PD
2015 年 4 月 横浜市立大学大学院 医学研究科 テクニカルスタッフ
2016 年 4 月 理化学研究所 横浜研究所 ライフサイエンス技術基盤研究センター 研究員
2018 年 4 月～ 海洋研究開発機構 海洋機能利用部門 特任技術主任、特任副主任研究員を経て
現職の副主任研究員

はじめに

糖鎖は、多糖、糖脂質、糖タンパク質などの複合糖質として自然界に普遍的に存在し、様々な生物学のプロセスで重要な役割を果たしている。生命現象において、糖鎖の機能調整には糖質関連酵素が関与しており、糖鎖の多様性と関連して糖質関連酵素も酵素の配列や立体構造を変えた多様な形で存在している。しかし、糖鎖の多様性に対して、糖質関連酵素の機能解析は圧倒的に不足しているため、新しい糖質関連酵素の探索は、糖鎖を介した生命現象を理解する上で重要な課題の一つである。また、新規糖質関連酵素の発見は、糖鎖構造解析、機能性オリゴ糖の製造、疾患診断への利用など、産業応用への可能性が秘められているため、基礎科学と応用科学の両方にとって重要である。

糖鎖の構成糖の中で β -N-アセチルガラクトサミン (β -GalNAc) は、スフィンゴ糖脂質や N 型・O 型糖鎖、O 抗原、コンドロイチン硫酸など様々な複合糖質に含まれているが、 β -GalNAc に特異的に作用する糖質分解酵素は、我々が発見した非還元末端の β -GalNAc のみに作用する厳密なエキソ型 β -N-アセチルガラクトサミニダーゼ (β -NGA) の 1 系統 (Glycoside Hydrolase family 123 (GH123))¹⁾、細菌由来の 3 種しか機能解析されていない。GH123 の β -NGA は基質特異性が厳密な新規酵素であったため、先天性代謝異常症の新生児スクリーニングに応用利用されている²⁾。 β -NGA に対して、 β -GalNAc だけではなく β -N-アセチルグルコサミンにも作用する酵素は β -ヘキソサミニダーゼ (β -HEX) と呼ばれ、主に GH20 に分類されるが、これまでに真核生物、細菌、古細菌の全ての生物種由来の酵素が 100 種類以上機能解析されている。その中でも我々は新規特異性を持つ GH20 に属する β -HEX を発見し、機能解析と X 線結晶構造解析から、代謝異常症の治療法の一つであるケミカルシャペロン法に対する基礎研究を行った^{3,4)}。このように新規酵素は産業応用への可能性を秘めているが、 β -HEX に対して β -NGA の情報は圧倒的に不足しており、 β -GalNAc を介した複雑な生命現象の包括的な理解と応用展開には、新規配列や活性を持つ β -NGA をさらに同定し、機能的に特徴付けることが不可欠であった。

深海メタゲノム情報から新規糖質分解酵素の発見

新規 β -NGA を探索するために、従来の GH123 に属する酵素が発見された陸上環境とは全く異なる特徴と独特の細菌叢を有する深海環境に着目し、深海メタゲノム情報からの探索を試みた。伊豆小笠原海溝 5747m の深海堆積物 4 分画のメタゲノム情報を使用して新規 β -NGA の探索を行った結果、既報の β -NGA と配列相同性が非常に低い候補配列を得た。大腸菌による異種発現系で酵素を作製し、基質特異性を調べた結果、GalNAc- β -pNP を分解する β -NGA であることが確認された(酵素名: NgaDssm)。驚くべきことに、NgaDssm は非還元末端の β -GalNAc に作用する単糖遊離型 (エキソ型) 活性だけではなく、

糖鎖(Gal β 1-3GalNAc- β -pNP)の内部の β -GalNAc にも作用するオリゴ糖遊離型活性も示した。よって、深海メタゲノム情報から、 β -NGA 初のオリゴ糖/単糖遊離型活性を持つ新規酵素の発見に成功した⁵⁾。

4 系統の新規糖質分解酵素群の発見 ～ β -GalNAc に作用する糖質分解酵素群の分子進化を紐解く～

深海メタゲノム情報を用いた探索から、 β -NGA の配列に含まれる約 70 アミノ酸からなる機能未知ドメイン DUF4091 が β -NGA 探索の手掛かりになることが見出された。公共データベースから DUF4091 を持つ配列を再検索し、大部分が機能未知タンパク質として登録されている約 740 配列を用いて系統樹を作製した結果、既報の GH123 の配列とは系統的に遠く離れた 4 系統の新規 β -NGA 候補配列群を発見した(図 1, Group 1～4)。各グループから様々な細菌、古細菌、真核生物由来の 8 つの酵素を作製して機能解析を行った結果、各グループで基質特異性に明確な違いが確認された。Group1 の酵素は厳密なオリゴ糖遊離型 β -NGA、Group2 の植物由来の酵素はオリゴ糖/単糖遊離型 β -HEX であった。Group3 (NgaDssm も含まれる)の好熱古細菌由来の酵素は NgaDssm 同様、オリゴ糖/単糖遊離型 β -NGA 活性を示し、高い耐熱性($T_m=93^\circ\text{C}$)も示した。Group4 は GH123 の β -NGA 同様、厳密な単糖遊離型 β -NGA 活性を示した。

これら 4 グループの酵素から 5 生物種 9 条件の X 線結晶構造解析を行った結果、各グループ特有の基質特異性は、立体構造から明確に説明された。基質結合部位の形状は、オリゴ糖遊離型酵素は長鎖の糖鎖が結合できるクレフト構造を持っており、厳密な単糖遊離型酵素は非還元末端の単糖しか結合できないポケット型構造を持っていた。興味深いことに、これらの構造変化はたったの十数アミノ酸の付加ループの挿入により起こっていた。各種酵素の生化学的試験及び立体構造の比較解析から、GH123 と 4 つの新規酵素群は、系統的に離れており、基質特異性が大きく異なるにも関わらず、起源を同じくするホモログ酵素である可能性が示された。よって本研究では、長い年月の間に起こった点変異と挿入配列の蓄積を通して基質特異性が多様化された β -GalNAc 分解酵素群の単系統進化の歴史を紐解いた⁵⁾(図 1)。

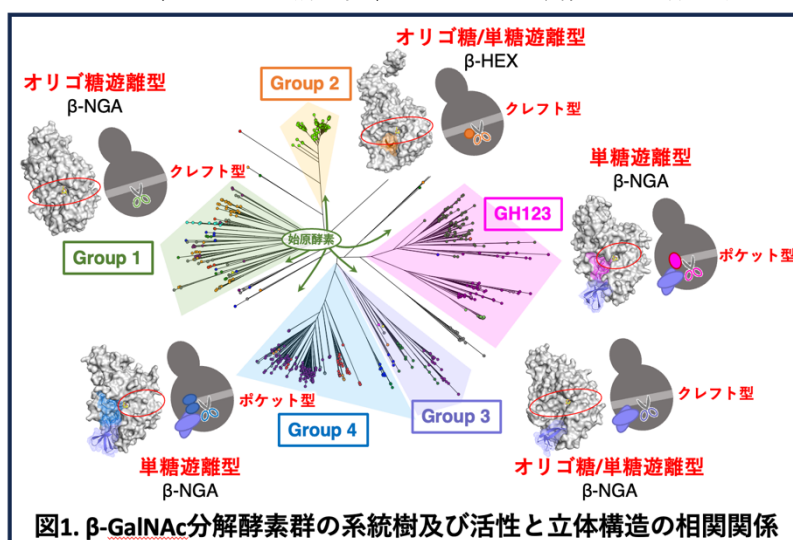


図1. β -GalNAc分解酵素群の系統樹及び活性と立体構造の相関関係

今後の展望

新規酵素の探索において、機能ベースのスクリーニングに加えて、配列ベース、ドメインベースのスクリーニングの有用性と、陸上の環境とは異なる極限環境の深海メタゲノム情報の有用性が示された。今後は対象を広げて様々な環境特有の新規酵素の探索を行う。また、今回得られた機能的多様性の獲得方法を応用した新規機能を持つ酵素の作製や、新規酵素を用いた産業応用展開にも取り組んでいく。

謝辞

本研究に携わっていただいた先生方、共同研究者、技術員の皆様に心より感謝いたします。

参考文献

- (1) T. Sumida *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 286, 14065-14072 (2011)
- (2) A. B. Kumar *et al.*, *Clin. Chim. Acta*, 451(Pt B), 125-128 (2015)
- (3) T. Sumida *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 392 87-99 (2009)
- (4) T. Sumida *et al.*, *Org. Biomol. Chem.*, 10, 2607-2612 (2012)
- (5) T. Sumida *et al.*, *Nat. Commun.*, 15, 3543 (2024)