

Schizosaccharomyces pombe 由来 glucosidase II に関する研究

生物資源科学専攻 応用分子生物学講座 分子酵素学分野 宮本 大司

1. 背景と目的

真核生物の新生糖タンパク質は *N* 型糖鎖修飾によって立体構造の形成が制御されており, glucosidase II はこの *N* 型糖鎖修飾に関与している。glucosidase II は触媒能を有する α サブユニットと, 糖鎖認識を担う β サブユニットからなるヘテロダイマーである。*N* 型糖鎖 ($\text{Glc}_2\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$) の α 1,3 グルコシド結合したグルコース残基 2 つを加水分解し, $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ および $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ 糖鎖を生産することで, 新生糖タンパク質とシャペロンとの結合および遊離を制御している。つまり, glucosidase II はフォールディング過程への出入を制御する役割をもつ, タンパク質分子の品質管理に重要な酵素である。これまでの研究では精製酵素を用いた解析ならびに異種宿主発現系での生産例が少なく, その酵素化学的諸性質は不明瞭な点が多い。本研究では大腸菌を用いた glucosidase II の生産系の確立および酵素化学的諸性質の解明を目的とした。

2. 方法と結果

大腸菌による宿主発現系を用い, *Schizosaccharomyces pombe* 由来 glucosidase II α サブユニット (Gls2) を His-tag 融合タンパク質として発現させ, Co アフィニティーカラムクロマトグラフィーおよび陰イオン交換カラムクロマトグラフィーを用いて精製した。得られた精製 Gls2 は 2 日間で残存活性が 70% となる不安定な酵素であった。Gls2 の安定化を目的とし, 各種試薬を酵素溶液に添加後, 経時的に残存活性を測定した。10% グリセロールの添加により Gls2 の安定化がみられ, 90 日後に 90% 以上の残存活性を示した。またグリセロールを添加しない場合に比べ, 添加後では温度安定性 ($\leq 32^\circ\text{C} \rightarrow \leq 40^\circ\text{C}$) および pH 安定性 (6.2-8.2 \rightarrow 6.2-9.1) が上昇した。 α -グルコピオースを基質として速度パラメーターを求め, k_{cat}/K_m 値を比較することで Gls2 の二糖に対する基質特異性を評価した。ニゲロース (α 1,3 グルコシド結合) に対して最も高い k_{cat}/K_m 値を示し, その値は $0.0481 (\text{sec}^{-1} \text{mM}^{-1})$ であった。次に Gls2 の糖鎖に対する加水分解反応を解析した。Gls2 は $\text{Glc}_2\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-PA}$ を基質とし, 加水分解反応産物である $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-PA}$ を生産した。また大腸菌による Gls2 および β -サブユニット (Gtb1) の共生産を行い, ヘテロダイマー形成を確認した。

3. まとめ

大腸菌を用いた Gls2 の生産系を初めて確立した。10% グリセロールを酵素溶液に添加することにより Gls2 を 3 ヶ月以上安定的に保存することを可能にした。また糖鎖のみならず, 二糖に対しても α 1,3 グルコシド結合特異的な性質を示した。これまで糖鎖の加水分解には糖鎖認識を担う Gtb1 の存在が必須であるとされてきたが, 今回 Gls2 が単独で糖鎖の加水分解反応を触媒することを明らかにした。精製 Gls2 を用いた *in vitro* の系で糖鎖の加水分解を確認した初めての報告である。