

Point mutations in yeast
oligosaccharyltransferase decouple the
oligosaccharyl transfer and hydrolysis of
lipid-linked oligosaccharide reactions: an
improved purification strategy and peptide
substrate for the oligosaccharyltransferase
researches

山崎, 貴大

<https://hdl.handle.net/2324/4474954>

出版情報 : Kyushu University, 2020, 博士 (システム生命科学) , 課程博士
バージョン :
権利関係 :

氏 名 : 山崎 貴大

論 文 名 : Point mutations in yeast oligosaccharyltransferase decouple the oligosaccharyl transfer and hydrolysis of lipid-linked oligosaccharide reactions: an improved purification strategy and peptide substrate for the oligosaccharyltransferase researches

(酵母オリゴ糖転移酵素の遺伝子点変異による、オリゴ糖転移活性と脂質結合型糖鎖の加水分解活性の脱共役：オリゴ糖転移酵素研究に資する改良された酵素調製法とペプチド基質デザイン)

区 分 : 甲

論 文 内 容 の 要 旨

オリゴ糖転移酵素(OST)はN型糖鎖修飾における最初のステップを触媒する酵素で、糖タンパク質を作るためにアスパラギン残基にオリゴ糖鎖を転移する。OST酵素はアクセプターであるアスパラギン残基が存在しない場合、糖鎖供与体の脂質結合型糖鎖(LLO)を加水分解して粗面小胞体内腔に遊離N型糖鎖(FNG)を恒常的に生成することが知られている。本研究では酵母のOST酵素に含まれる触媒サブユニットSTT3タンパク質に高親和性のエピトープタグを付加することで、野生型OST酵素を共発現している酵母細胞から変異型OSTを選択して精製する方法を確立した。この方法によって、機能不全となった変異型OST酵素を調製することが可能になり、精製したOSTを様々な生化学実験に使用できるようになった。変異型STT3サブユニットを含むOST酵素について、*in vitro*で2つの活性を測定し、さらに同一変異を導入した酵母を用いて細胞内のN型糖鎖修飾とFNG量を測定した。その結果、変異を導入した酵母の表現型と細胞内のFNG量の相関から、通常の培養条件では酵母の生育にFNGは必須ではないことが示唆された。さらに、アミノ酸保存モチーフであるDXDモチーフへの変異の導入はオリゴ糖転移活性に比べて加水分解活性を高めること、逆にDKモチーフへの変異の導入はオリゴ糖転移活性に比べて加水分解活性を低下させることが*in vitro*と*in vivo*の両方の条件で明らかになった。点突然変異の導入でOST酵素の2つの活性の共役を解くことができるという知見は、将来的に酵素反応機構の解明に繋がる可能性がある。また、変異を含むOST酵素が調製できたことで、15残基の優れた性質をもつ基質ペプチドの発見とOST3サブユニットあるいはOST6サブユニットのいずれかを含む2種類のOST複合体の酵素特性の違いを明らかにできた。本研究で新規に見いだされた変異体、基質、方法は酵母や他の真核生物種におけるOST酵素の分子基盤と生理学的役割の解明に有用である。