

Studies on the Enzymatic Characterization of Novel Endo- β -N-acetylglucosaminidase from *Bacteroides nordii*

クリスティーナ, メイ, ウリラン, ビエネス

<https://hdl.handle.net/2324/5068278>

出版情報 : Kyushu University, 2022, 博士 (農学), 課程博士

バージョン :

権利関係 : Public access to the fulltext file is restricted for unavoidable reason (3)

氏名	クリスティーナ メイ ウリラン ビエネス (Kristina Mae Ulilang Bienes)		
論文名	Studies on the Enzymatic Characterization of Novel Endo- β -N-acetylglucosaminidase from <i>Bacteroides nordii</i> (<i>Bacteroides nordii</i> 由来の新規 Endo- β -N-アセチルグルコサミニダーゼの酵素的特性に関する研究)		
論文調査委員	主査	九州大学	教授 竹川 薫
	副査	九州大学	准教授 樋口 裕次郎
	副査	九州大学	准教授 沖野 望

論文審査の結果の要旨

真核生物において、糖タンパク質の糖鎖部分は細胞間認識、タンパク質の安定性や品質管理など広く重要な役割を果たしている。タンパク質の N-結合型糖鎖の根元部分に存在するキトビオース間をエンド型に切断する酵素は、エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ (ENGase) と呼ばれ、本酵素はこれまでに糖タンパク質の糖鎖部分の構造や糖鎖の機能を解析するために広く用いられている。ENGase はアミノ酸配列の類似性から GH (Glycoside Hydrolase) 18 と GH85 という 2 つの GH ファミリーに分類されている。また、ENGase は糖鎖をエンド型に遊離する加水分解活性と、水酸基を有する他の化合物へ糖鎖を転移する糖転移活性を有する。そこで、本酵素の糖転移活性を利用して、不均一な糖鎖を有する天然の糖タンパク質の糖鎖構造を、均一な構造へと変換する研究が行われている。天然の糖タンパク質糖鎖には、非還元末端部分が三分岐や四分岐からなる多分岐型の複合型糖鎖も普遍的に存在している。本研究では、これまでほとんど報告例のない、多分岐複合型糖鎖を切断可能な ENGase を微生物ゲノムから検索し、得られた酵素の諸性質について解析を行っている。

高等動物の糖タンパク質には、多分岐の複合型糖鎖は普遍的に存在しているため、病原微生物や腸内細菌が目的の多分岐複合型糖鎖を分解する ENGase を有している可能性が高いと考えられる。そこで、ヒトの腸内細菌叢に多く存在するバクテロイデス属細菌のゲノム塩基配列を検索した結果、*Bacteroides nordii* ゲノムに GH85 に属する ENGase (Endo-BN) をコードする推定遺伝子が存在することを見出している。大腸菌で本遺伝子の発現・精製を行い、酵素活性を調べたところ、二本鎖複合型の N-結合型糖鎖をエンド型に遊離する ENGase 活性を持つことを証明している。さらに本酵素の基質特異性を詳細に調べ、以下のことを明らかにしている。(1)これまで報告されたほぼ全ての ENGase が作用できる高マンノース型糖鎖を全く分解しない、(2)二本鎖複合型糖鎖の場合、非還元末端にシアル酸が結合している構造に高い分解能を示す、(3)糖鎖根元の N-アセチルグルコサミン残基にフコースが結合している構造に高い分解能を示す、(4)三本鎖複合型糖鎖などの多分岐糖鎖も分解できる。さらに Endo-BN は、多分岐複合型糖鎖を有する糖タンパク質であるフェツインや α 1-酸性糖タンパク質からも糖鎖を遊離できることを確認している。これらの基質特異性は、これまで報告されている ENGase とは異なっており、Endo-BN は新規な基質特異性を有する酵素であることを明らかにしている。

モデル糖タンパク質として、ウシ膵臓のリボヌクレアーゼ B (RNaseB) を用いて、Endo-BN の加水分解活性を抑制した種々の Endo-BN 変異体の糖転移活性を測定した。その結果、Endo-BN(N188H)

および Endo-BN(N188Q)変異体が、RNaseB へ糖鎖を転移する活性が高いことを示している。以上の結果から、Endo-BN(N188H)および Endo-BN(N188Q)変異体は、天然糖タンパク質の不均一な *N*-結合型糖鎖を、構造が既知の均一糖鎖へと変換する有用な酵素であることを明らかにしている。

以上、要するに本研究はバクテロイデス由来の Endo-BN が、糖タンパク質の多分岐複合型糖鎖を遊離可能な新たな基質特異性を有していることを明らかにしている。さらに Endo-BN 変異体が糖鎖転移活性を示すことから、不均一な糖鎖構造を持つ天然糖タンパク質を、均一な多分岐複合型糖鎖へ変換することも可能である。これらの研究内容は応用微生物学および糖鎖工学の発展に寄与する価値ある業績と認める。よって、本研究者は博士(農学)の学位を得る資格を有するものと認める。