



Clostridium perfringensの2種のエンドー β -N-アセチルグルコサミニダーゼについて : 精製と性質、特異性の検討とその応用

妻鹿-伊藤, 節子

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1977-02-02

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙0452

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2000452>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・本籍 ^め妻 ^が鹿 ^{せつ}節 ^と子 (大阪府)

学位の種類 医学博士

学位記番号 医博ろ第380号

学位授与の要件 学位規則第5条第2項該当

学位授与の日付 昭和52年2月2日

学位論文題目 *Clostridium perfringens*の2種のエンド- β -N-
アセチルグルコサミニダーゼについて
—精製と性質, 特異性の検討とその応用—

審査委員 主査教授 木 幡 陽
教授 岡 本 彰 祐 教授 西 塚 泰 美

論文内容の要旨

○ 序 文

糖タンパク質は酵素, ホルモン, 免疫グロブリンや細胞表面など生物界に広く分布し, その糖質部分の役割の重要性が最近特に注目されてきた。そこで糖タンパク質の糖部分の構造を知ることは, その機能を解明する上で重要と考えられる。それ故, 糖タンパク質から糖部分をオリゴ糖として切り離すエンドグリコシダーゼは非常に有用な酵素と思われる。

今回, *Clostridium perfringens* の培養濾液中に糖タンパク質の糖質部分のジ-N-アセチルキトビオース部位に作用し, オリゴ糖を遊離するエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼが2種類存在することを発見し, 精製した。そして諸性質, 特異性を調べ, 次いで精製酵素を用いて, 子牛チログロブリンの糖構造を検討した。

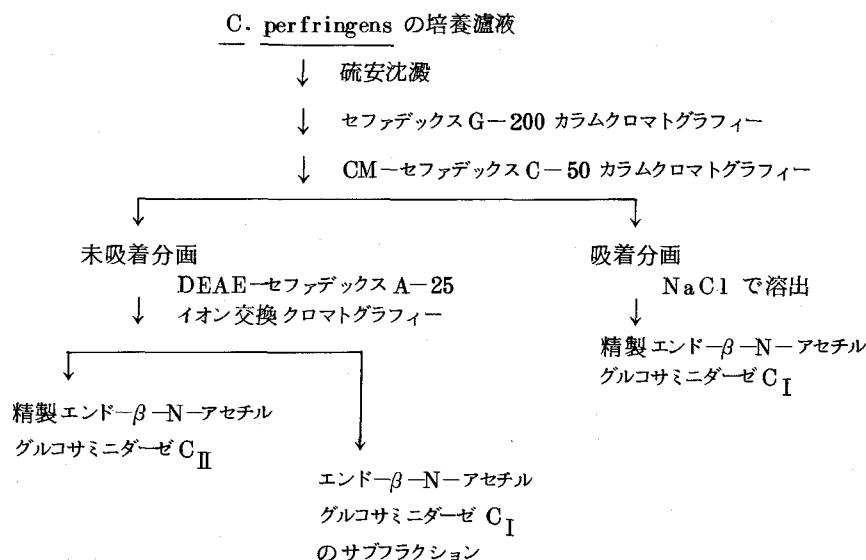
○ 実験方法

省 略

○ 実験結果

I エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼの精製

Clostridium perfringens ATCC 10873 の培養濾液からN-[^{14}C] アセチル化された側鎖フリー-IgG糖ペプチド(C_I 酵素)と, 同様にラベルされた卵白アルブミン糖ペプチドIV, (Man)₆(GlcNAc)₂Asn(C_II 酵素)を基質として次の図にまとめた順序で精製を行った。



エンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼ C_I は 326 倍、C_{II} は 750 倍に精製された。

II 精製酵素の性質

精製酵素の K_m , V_{max} は、C_I ; $3.2 \times 10^{-5} M$, $0.80 \mu\text{mole mg}^{-1} \text{min}^{-1}$, C_{II} ; $5.0 \times 10^{-5} M$, $0.31 \mu\text{mole mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ であり、至適 pH は、C_I で 6.5, C_{II} で 7.0 であった。

エキソグリコシダーゼの含有量は多いものでも数%で、C_I, C_{II} の相互混在量は 1% 以下、また α -マンノシダーゼは検出されなかった。

各種金属イオン、その他の物質の酵素に及ぼす影響について調べたところ Mn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} は影響を与えなかった。p-クロロマーキュリーフェニルスルフォネートで阻害され、システインで活性化されることから、これらの酵素は SH 酵素であると考えられる。また、β-N-アセチルグルコサミニダーゼの阻害剤 N-アセチルグルコサミノ (1→5) ラクトンでは阻害をうけなかった。

C_I, C_{II} 酵素によって、それぞれの基質から遊離したオリゴ糖の還元末端は、共に N-アセチルグルコサミンであった。

III 精製酵素の特異性

C_I 酵素は、牛 IgG 糖ペプチドを β-ガラクトシダーゼと β-N-アセチルグルコサミニダーゼであらかじめ処理して側鎖を除いた糖ペプチドに作用するが、未処理の IgG 糖ペプチドには作用しない。また卵白アルブミン糖ペプチドの V すなわち (Man)₅ (GlcNAc)₂ Asn を水解するが同ペプチド IV すなわち (Man)₆ (GlcNAc)₂ Asn には作用しない。一方、β-N-アセチルグルコサミニダーゼのみの消化で非還元末端にマンノースを 1 つ露出した IgG 糖ペプチドは、C_I 酵素で水解された。更にこの IgG 糖ペプチド誘導体のガラクトース残基をトリチウム標識した基質を用いた場合、6 糖に相当するトリチウムラベルオリゴ糖が得られた。牛 IgG 糖ペプチドのアスパラギンに結合した糖鎖構造の研究が

$$\begin{array}{c} \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2\text{Man}\alpha 1 \searrow 6 \\ \text{Man}\alpha 1 \nearrow 3 \text{Man}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc} \end{array}$$

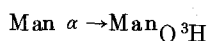
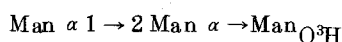
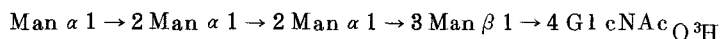
C_I 酵素の作用に対する α -マンノース残基の重要性は、卵白アルブミン糖ペプチド N と V の構造研究からも示されている (田井ら J. Biol. Chem. 250, 8569)。

$$\begin{array}{ccccccc}
 R \rightarrow \text{Man } \alpha 1 \xrightarrow{6} & \text{Man } \beta 1 \rightarrow 4 \text{ GlcNAc } \beta 1 & \xrightarrow[\text{5}]{4} & 4 \text{ GlcNAc} \rightarrow \text{Asn} \\
 \text{Man } \alpha 1 \nearrow 3 & & & \uparrow 6 \\
 & & & 1 \\
 & & & R'
 \end{array}$$
$$R'; H \text{ 又は } \text{Fuc } \alpha$$

他方、 C_{II} 酵素は、卵白アルブミン糖ペプチド IV, V, チログロブリンユニット A 糖ペプチドを水解するが未処理及び側鎖フリー IgG 糖ペプチド、側鎖フリーチログロブリンユニット B 糖ペプチド、 $Man (GlcNAc)_2 Asn$ には作用しない。以上の特異性は、S. griseus のエンド β -N-アセチルグルコサミニダーゼ H と同じである。しかしながら、卵白アルブミンとチログロブリンユニット A 糖ペプチドに対する作用は異なる。 C_{II} 酵素は卵白アルブミン糖ペプチド III を 75% しか水解しない。そして同ペプチド I, II はほとんど水解しない。他方 H 酵素は糖ペプチド I, II, III とほとんど水解する。また両酵素の糖ペプチドを水解する相対速度は次のように異なる。 C_{II} 酵素; $(Man)_6 (GlcNAc)_2 Asn \geq$ ユニット A $> (Man)_5 (GlcNAc)_2 Asn$ H 酵素; $(Man)_5 (GlcNAc)_2 Asn > (Man)_6 (GlcNAc)_2 Asn >$ ユニット A

— 192 —

子牛チログロブリンユニットA糖ペプチドを精製エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ C_{II} で水解した後、遊離したオリゴ糖をNaB³H₄ で還元的にラベルした。この時少なくとも6成分のオリゴ糖が得られ、主成分は濾紙クロマトグラフィーで10糖を示す位置に分画された。この成分Aを α -マンノシダーゼの徹底消化や塩酸加水分解をしたところ、卵白アルブミン糖ペプチド等と同様、 α -マンノース鎖が、 β -マンノシールージーN-アセチルグルコサミン-アスパラギンに結合した形であることがわかった。アセトリシスは、Man α 1 $\rightarrow$ 6 Man結合は完全に、Man α 1 $\rightarrow$ 2 Man結合は10%切断されるが、Man α 1 $\rightarrow$ 3 Man結合は分解をうけない。そこで、成分Aをアセトリシス後NaB³H₄ でラベルしたところ3つの主成分が得られた。これらをナタ豆の α -マンノシダーゼの限定分解を行ったところ次のようなフラグメントであると推定された。



そして、これら3成分が α 1 $\rightarrow$ 6結合で繋がっていると考えられる。完全構造は更にメチル化による分析を行わなくてはならないが少なくとも以前に提唱された構造とは異なった結果が得られた。すなわちC_{II}酵素の特異性をも考えあわせると、ユニットAの糖鎖は卵白アルブミン等の糖構造と同様に α -マンノース3, 6の枝分れを持つことが示唆された。

○ 考 察

C. perfringens ATCC 10873 の培養濾液には糖タンパク質の糖質部分に作用してマンノース核構造を含むオリゴ糖を遊離する2種のエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼが存在することを発見し精製した。他の菌株ATCC 3626も同様にエンドグリコシダーゼ活性が存在した。それ故、これらの酵素は実験材料としたC. perfringensの菌株に特異的ではないと考えられる。2種の酵素のうち一方は、D. pneumoniaeのD酵素と同じ特異性を示した。他方は、S. griseusのH酵素と類似しているが、異なった特異性を示した。

C. perfringens の培養濾液からはD型(C_I酵素)とH型(C_{II}酵素)の酵素が同時に精製できるのでエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼの材料として有用と思われる。またセファデックスG-200で得られた酵素液は α -マンノシダーゼを含まないので糖タンパク質のアスパラギンに結合した糖鎖を非特異的に切る場合にはこれを使用できる。

論文審査の結果の要旨

10年ほど前までは血液型を中心とした抗原構造との関連以外にあまり華やかさの見られなかった複合糖質の研究が過去数年の間に大きな発展をみせている。これは複合糖質の糖鎖に秘められているとみられる機能的役割が生化学者のみならず生物学者の興味をひいたからにはほかならない。

例えば酵素、ホルモン、免疫グロブリンや細胞表面などは糖タンパク質であるがその糖質部分の果たしている役割の重要性が強く認識されてきている訳である。

しかしこうした機能解明の基礎になる糖鎖の構造については、糖タンパク質がアミノ酸と糖という性質の異なる構成ユニットからなることが障害となって研究があまり進んでいない。

その意味で糖タンパク質から糖部分を切り離すエンドグリコシダーゼ群の研究は、糖タンパク質の構造研究発展の鍵になると考えられる訳である。

本研究者は、*Clostridium perfringens* の培養濾液から各種のエキシグリコシダーゼを精製する実験を行っている間に、偶然に糖タンパク質の糖鎖の根元に位置する NN'-ジアセチルキトビオース部分を水解し糖鎖を丸ごと遊離する酵素活性がこの培養濾液に含まれることを発見した。

以後、この酵素の精製に努め、最終的には糖タンパク質の Asn 結合型糖鎖のうち主として、Man と GlcNAc からなる中性糖鎖に働く C_{II} 酵素とシアル酸や Gal をも含む酸性糖鎖のコアに働く C_I 酵素に分離することを解明して、両酵素をそれぞれ 750 倍と 360 倍まで精製した。

更にこの両酵素につきその酵素学的諸性質を検索して、これらが金属要求性のない SH 酵素であることを明らかにするとともに、C_I 酵素の基質特異性を完全に解明した。この特異性の確立は、参考論文 3 のウシ IgG の糖鎖構造の解明の鍵となっている。

C_{II} 酵素は作用する糖鎖が多種に及ぶために、未だその構造要求性の完全な解明に成功していないが、本研究者は逆にこの酵素の特異性の広さを利用して、ウシのチログロブリンの unit A 糖鎖の構造研究を行い、この糖鎖について有馬、Spiro が 1972 年に提出した構造が誤りであることを指摘している。

以上本研究は、*Clostridium perfringens* の 2 種の新しいエンドグリコシダーゼの発見、精製、性質の解明とその糖タンパク質の構造研究への応用という極めて重要な一連の研究成果を含むもので価値ある集積であると考えられる。

よって、本研究者は、医学博士の学位を得る資格があると認める。