

FRET 型糖鎖分子プローブを用いた 新規 Endo- α -mannosidase 活性検出系の開発

SATテクノロジー・ショーケース2019

■ はじめに

糖鎖とは、単糖が鎖状につながってできた分子であり細胞間の情報伝達などを担っていることから、核酸やタンパク質に次ぐ第三の生命分子とよばれ注目されている。

糖鎖が関与する生命現象として、糖タンパク質の品質管理機構が挙げられる。糖タンパク質の品質管理機構は、ミスフォールドした新生糖タンパク質の高次構造を正しい構造へと導く役割があり、種々の糖鎖関連酵素が糖タンパク質上の糖鎖を識別することで制御される。糖鎖関連酵素のなかでも、Golgi endo- α -mannosidase (G-EM'ase)は、誤ってゴルジ体へと運搬された糖タンパク質上のグルコシル化された高マンノース型糖鎖をトリミングすることで、正常な分泌経路へと導く役割があるといわれている[A]。

本研究では、簡単にG-EM'aseを検出するアッセイ系の開発を目的として、糖鎖基質に対してFRETペアとなる蛍光基と消光基を導入し、G-EM'aseの酵素活性により糖鎖基質が切れると蛍光を発する分子プローブ1を合成した。実際、プローブ1に対してG-EM'aseを作用させると、徐々に蛍光強度が上昇したことから、G-EM'aseによる糖加水分解反応の追跡ができることを確認した。さらに、プローブ1は α -グルコシダーゼ (GII) に対する耐性を有することがわかった。このことから、プローブ1を用いることで細胞内でのG-EM'ase活性を検出することが期待できる。

■ 活動内容

1. FRET型糖鎖分子プローブ1の合成

G-EM'aseの糖鎖認識に必要な4糖骨格は、単糖誘導体をつなぎ合わせることで構築した。非還元末端側に蛍光基としてN-メチルアントラニル(MANT)基を、還元末端側に消光基として2,4-ジニトロフェニル基(DNP)を導入した。

2. FRET型糖鎖分子プローブ1の光物理化学的特性

得られたプローブ1の蛍光スペクトルとMANT基の蛍光寿命を測定した。その結果、プローブ1のMANT基の蛍光寿命が0.53 ns、別途調製した加水分解生成物2の蛍光寿命が7.7 nsであり消光効率は94%だった。このことから、プローブ1のMANT基の蛍光はDNP基によって高効率で消光されていることを確認した。

3. FRET型糖鎖分子プローブ1によるG-EM'ase活性測定

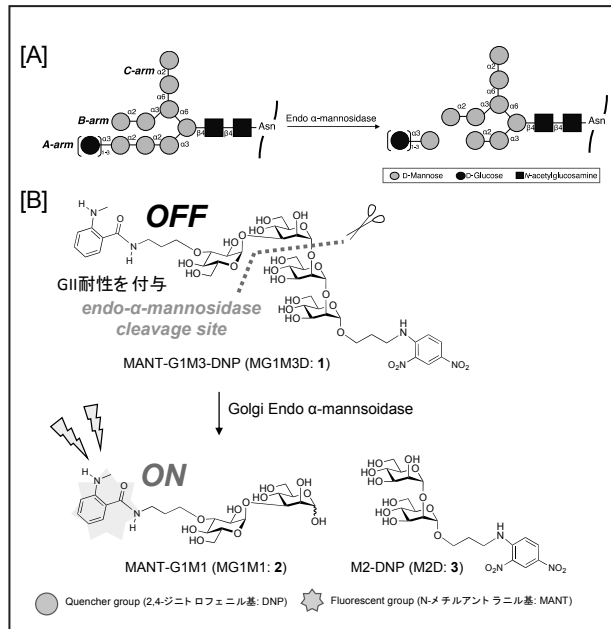
得られたプローブ1に対しG-EM'aseを作用させたところ、反応液の蛍光強度が上昇した。また、酵素量依存的に蛍光強度の上昇効率が上がったことより酵素反応を検出していると判断した。また、プローブ1とG-EM'aseの反応を高速液体クロマトグラフィー (high performance liquid chromatography; HPLC)で追跡した結果、プローブ1に由来するピークが次第に減少し、糖加水分解生成物の2と3に由来するピークが経時的に増加したことも確認した。このことから、プローブ1により、G-EM'aseの糖加水分解反応の追跡が可能であることがわかった。同様にプローブ1に対しGIIを作用させたところ、プローブ1に由来するピークに変化がなく、加水分解生成物に相当するピークが見られなかった。よって、プローブ1がGIIに分解されず、GIIに対して耐性をもつことを確認した。

■ 関連情報等(特許関係、施設)

・Endo- α -mannosidaseと α -glucosidase IIの発現 (成蹊大学 理工学部 戸谷 希一郎教授, 栗原 大輝助教)

・酵素反応の実験技術の提供 (産業技術総合研究所 千葉 靖典上級主任研究員)

・蛍光強度および蛍光寿命測定 (群馬大学大学院 理工学 吉原 利忠准教授)



代表発表者 **佐野 加苗(さの かなえ)**
 所属 **群馬大学大学院 理工学部
 物質・生命理工学領域 糖鎖化学研究室**
 問合せ先 **〒376-8515 群馬県桐生市天神町 1-5-1
 TEL: 0277-30-1343 FAX: 0277-30-1343
 MAIL: t182a003@gunma-u.ac.jp**

■キーワード: (1)糖鎖分子プローブ
 (2)FRETクエンチング
 (3)糖加水分解酵素

■共同研究者:

松尾 一郎 (群馬大学大学院 理工学部)
 吉原 利忠 (群馬大学大学院 理工学部)
 石井 希実 (群馬大学大学院 理工学部)
 黒岩 歩美 (群馬大学 理工学部)
 栗原 大輝 (成蹊大学 理工学部)
 戸谷 希一郎 (成蹊大学 理工学部)
 千葉 靖典 (産業技術総合研究所)