

ヒト型糖鎖生合成酵素と相同性を有する昆虫由来酵素群の構造機能相関解明と応用展開

メタデータ	言語: ja 出版者: 公開日: 2023-03-29 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 宮崎, 剛亜 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10297/00029685">http://hdl.handle.net/10297/00029685</a>

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：13801

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K15748

研究課題名(和文) ヒト型糖鎖合成酵素と相同性を有する昆虫由来酵素群の構造機能相関解明と応用展開

研究課題名(英文) Structure-function relationships of insect enzymes homologous to human glycan-related enzymes

研究代表者

宮崎 剛亜 (Miyazaki, Takatsugu)

静岡大学・グリーン科学技術研究所・助教

研究者番号：30775721

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：糖タンパク質糖鎖合成に関与するヒト由来酵素と配列相同性を有する昆虫由来糖転移酵素および糖質加水分解酵素に着目し、カイコ由来  $\alpha$ -1,4-GalNAc転移酵素の機能と他の糖転移酵素の一部のドメインの立体構造と機能を明らかにした。カイコ由来  $\alpha$ -L-フコシダーゼと  $\alpha$ -N-アセチルガラクトサミニダーゼの糖タンパク質糖鎖に対する基質特異性を明らかにした。その他の糖質関連酵素として、2種類のカイコ由来スクロース分解酵素、糖鎖に作用する2種類の腸内細菌由来酵素、N結合型糖鎖前駆体の部分構造であるコージビオースとニゲロースをそれぞれ特異的に加水分解する2種類のバクテリア由来新規酵素の立体構造を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖鎖はあらゆる生理機能や疾患、細菌やウイルスの感染に関与しているため、創薬・医療の観点からも重要な研究対象である。本研究においてヒトと昆虫の酵素活性と構造の違いを明らかにしたことから、昆虫細胞や虫体を用いたヒト型糖タンパク質生産の基盤構築に寄与するものと考えられる。また、糖鎖およびその部分構造に高い特異性を持つ複数の酵素を発見し、その立体構造を明らかにしたことから、酵素を利用した糖鎖の加工技術の開発に応用できる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：This study focused on insect function-unknown proteins homologous to human glycosyltransferases and glycosidases involved in glycan biosynthesis and related enzymes. We identified and characterized *Bombyx mori*  $\alpha$ -1,4-N-acetylgalactosaminyltransferase, a homolog of human  $\alpha$ -1,4-galactosyltransferase, and also identified the C-terminal domain of human and *B. mori* glycosyltransferases as a new carbohydrate-binding module. *B. mori*  $\alpha$ -fucosidase and  $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase was revealed to have specificity towards N- and O-glycans, respectively. Moreover, we determined the crystal structures of two sucrose hydrolases from *B. mori*,  $\alpha$ -1,2-mannosidase and  $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase from *Enterococcus faecalis* acting on N- and O-glycans, respectively,  $\alpha$ -1,2-glucosidase from *Flavobacterium johnsoniae* specific for kojibiose, and  $\alpha$ -1,3-glucosidase from *Lactococcus lactis* specific for nigerose.

研究分野：酵素学

キーワード：糖転移酵素 糖質加水分解酵素 N結合型糖鎖 O結合型糖鎖 CAZy 糖タンパク質 X線結晶構造解析 昆虫

## 1. 研究開始当初の背景

タンパク質への糖鎖付加は最も普遍的な翻訳後修飾の一つであり、特にヒトなどの真核生物が有するタンパク質の半数以上は糖鎖が付加した糖タンパク質であると言われている (1,2)。糖鎖はあらゆる生理機能や疾患、細菌やウイルスの感染に関与しているため、創薬・医療の観点からも重要な研究対象であり、抗体医薬などの医療用糖タンパク質の機能発現には糖鎖が大きく寄与している。タンパク質の糖鎖は現在までに様々なタイプが知られているが、*N* 結合型糖鎖や *O* 結合型糖鎖が主なものとして知られている。*N* 結合型糖鎖はタンパク質中の特定のアスパラギン残基に付加する糖鎖であり、*O* 結合型糖鎖はセリンやスレオニン残基などのヒドロキシ基に付加する糖鎖である。*N* 結合型糖鎖の生合成経路は比較的良好に研究されており、小胞体からゴルジ体にかけて行われる。オリゴ糖転移酵素により 14 糖からなる糖鎖前駆体がアスパラギン残基に付加されたのち、種々の加水分解酵素や糖転移酵素により多様な糖鎖構造となる。その構造は生物種によっても異なり、ヒトなどの哺乳動物では複合型糖鎖が広く見られるのに対し、昆虫では主にパウチマンノース型糖鎖が生合成される。

昆虫細胞やカイコは、高いタンパク質生産能力、翻訳後修飾能力があることから哺乳動物細胞に代わる医療用タンパク質の生産系として研究がなされている。既述のように糖鎖構造がヒトと異なるため、発現させるタンパク質に付加する糖鎖の構造を改変する研究が研究代表者の研究グループをはじめとする複数の研究グループで行われている (3)。しかし、これまでの研究は糖鎖生合成酵素の遺伝子導入やノックダウンなどにとどまっており、哺乳動物細胞発現と同等の糖鎖構造を有するタンパク質の生産には及んでいないのが現状である。一方で、昆虫のゲノムには、複合型糖鎖生合成に必要な酵素とアミノ酸配列相同性を有するタンパク質の遺伝子が複数見出されている。また、研究代表者のグループはカイコで発現させたタンパク質には他の昆虫細胞で発現させたタンパク質に比べて複合型糖鎖に近い構造を有する糖鎖が含まれていることを見出し (4)、カイコ由来が有する複合型糖鎖生合成酵素の一つである *N*-アセチルグルコサミン転移酵素 II (GnTII) オルソログがヒト GnTII と同様の機能を有することを見出した (5,6)。しかしながら、GnTII を含む一部の昆虫由来酵素について性質が明らかにされているものの、それらの生理機能や立体構造に関する報告はほとんどない。

## 2. 研究の目的

本研究では、昆虫細胞およびカイコで発現させる糖タンパク質糖鎖のヒト型化を促進するため、昆虫のゲノム解析から見出された複合型糖鎖の生合成に必須な酵素と配列相同性を示す昆虫由来酵素の立体構造および機能の解明を目的とした。また、糖質加水分解酵素はその基質特異性を利用して、糖鎖構造の加工に応用が可能である。そこで、糖タンパク質糖鎖の分解酵素やそれらと相同性を有する酵素の立体構造解析を行い、それぞれの酵素ファミリーの構造機能相関を包括的に理解することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 組換え酵素の発現と精製

ヒト培養細胞およびカイコ虫体から抽出した total RNA から逆転写酵素を用いて cDNA を合成した。cDNA を鋳型に各遺伝子特異的なプライマーを用い、全長または *N* 末端側膜貫通領域を除いた部分をコードする DNA を PCR で増幅し、大腸菌発現または昆虫細胞発現用ベクターに組み込んだ。バクテリア由来酵素遺伝子は各種バクテリアのゲノム DNA を鋳型に PCR で増幅し、発現プラスミドに組み込んだ。この際に目的に応じて分泌シグナル配列、アフィニティータグや各種可溶性タグを付加するように設計した。大腸菌発現の場合は発現プラスミドを BL21 (DE3) などの発現用株に導入して培養、発現させた。昆虫細胞またはカイコ虫体で発現させる場合は、構築したプラスミドを大腸菌 *BmDH10Bac CP-Chi* (7) に導入し、菌体内でカイコ多角体病ウイルス (*BmNPV*) バクミドへ目的タンパク質の遺伝子を導入した。組換えバクミドをカイコ 5 齢幼虫に注射し 5-6 日間飼育を行ったのち、体液および脂肪体を回収し、組換えタンパク質の発現の有無を確認した。大腸菌破砕液上清または回収したカイコ幼虫体液を Ni sepharose、抗 FLAG 抗体ビーズなどを用いたアフィニティークロマトグラフィーに供し、目的タンパク質の精製を行った。タンパク質によってはイオン交換クロマトグラフィーやゲルろ過クロマトグラフィーによる多段階精製を行い、純度を向上させた。

### (2) 酵素活性測定

*N* 結合型糖鎖に作用する糖転移酵素や糖質加水分解酵素の糖鎖に対する活性は、ピリジルアミノ化標識をした糖鎖を基質とし、反応産物を高速液体クロマトグラフィーで分離、定量を行

った。*p*-ニトロフェニル化糖に対する加水分解活性は遊離した *p*-ニトロフェノールを 400 nm の波長における吸光度を測定することで定量し、オリゴ糖に対する加水分解活性は生成する単糖特異的な酵素・発色試薬を用いた比色法によった。また、酵素の糖結合ドメインについては等温滴定カロリメトリー (ITC) を用いた糖との相互作用解析を行った。

### (3) X線結晶構造解析

精製酵素を濃縮し、シッティングドロップまたはハンギングドロップ蒸気拡散法にて結晶化条件の検討を行った。条件検討は市販のスクリーニングキットなどを用いた。得られた単結晶はグリセロールなどの抗凍結剤に浸けた後に、液体窒素中で保存した。X線回折強度測定は高エネルギー加速器研究機構フotonファクトリーのBL-5AまたはAR-NW12Aビームラインで行い、収集した回折データより各種ソフトウェアを用いて構造解析を行った。

## 4. 研究成果

### (1) カイコ由来糖転移酵素の組換え発現と構造機能解析

ヒトの複合型糖鎖生成に関わる糖転移酵素と相同性を有する3つのカイコ由来酵素 (BmGalNAcT、BmST、BmGnT-IV) を対象として、組換え発現系の構築を行った。いずれも大腸菌発現系では活性が十分に検出できる可溶性タンパク質として得ることができなかったため、カイコ虫体での組換え発現を行った。

BmGalNAcTはUDP-GalNAcをドナー基質とし、オリゴ糖に転移する活性を示した。特に、アクセプター基質の*N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc) 残基によく転移する活性を示し、既報の他の昆虫由来ホモログ (8,9) と同様の性質を有することを明らかにした。BmGalNAcTのホモロジーモデルとホモログであるウシ由来ガラクトース転移酵素の結晶構造を比較すると、ドナー基質のガラクトース (Gal) / *N*-アセチルガラクトサミン (GalNAc) 残基を認識する2つのアミノ酸残基が異なることが分かった。その残基をガラクトース転移酵素型に置換した変異体 I298M と I310Y およびその二重変異体では著しく GalNAc 転移活性が低下したことから、GalNAc の認識に重要であることが明らかになった (10)。本酵素は、非還元末端側に LacdiNAc (GalNAc $\beta$ 1-4GlcNAc) 構造を持つ糖鎖の合成に利用できると考えられる。

BmST および BmGnT-IV は、カイコ発現系を用いた場合も安定性の高いタンパク質の効率的な発現系が構築できなかった。BmGnT-IV のドメイン構造の予測を行ったところ、N末端側の触媒ドメインとC末端側の糖結合モジュール様 (Carbohydrate-Binding Module-Like, CBML) ドメインに分けられると予想された。そこで、CBMLドメインのみの大腸菌発現系を構築したところ、可溶性タンパク質として大量に得ることができた。ヒト由来ホモログである GnT-IVa の CBML も同様に発現、精製した。ITC によって単糖またはオリゴ糖に対する親和性を解析したところ、GlcNAc または  $\beta$ -GlcNAc 残基を非還元末端に持つオリゴ糖のみに親和性を示した。両 CBML の X線結晶構造解析にも成功し、カイコ由来 CBML と  $\beta$ -GlcNAc との複合体構造解析によって、糖の認識機構を明らかにした。CAZy データベース (<http://www.cazy.org>) において既知の CBM ファミリーと配列相同性が低いことから新しい CBM ファミリーに分類されると考えられる。

### (2) カイコ由来 $\alpha$ -L-フコシダーゼの機能解析

カイコ由来  $\alpha$ -L-フコシダーゼ (BmFucA) は、グルタチオン *S*-トランスフェラーゼタグを付加することによって、大腸菌発現系で可溶性タンパク質として得ることができた。精製酵素を各  $\alpha$ -L-フコース含有オリゴ糖やコア  $\alpha$ (1-6)フコシル化された *N*結合型糖鎖に作用させたところ、フコース残基を遊離する活性を示した。また、コア  $\alpha$ (1-3)/ $\alpha$ (1-6)フコシル化されているミツバチ由来ホスホリパーゼ A<sub>2</sub> に BmFucA を作用させ、コア  $\alpha$ (1-3)フコシル化糖鎖を遊離できない PNGase F の基質特異性を利用し、フコース特異的レクチンを用いたレクチンプロットを行ったところ、BmFucA はコア  $\alpha$ (1-3)フコース残基にも作用することが示唆された (11)。昆虫の  $\alpha$ -L-フコシダーゼの糖鎖に対する活性を解析した例は本研究が初めてである。

### (3) カイコ由来糖質加水分解酵素ファミリー31 酵素の機能解析

カイコのゲノム DNA には、祖先鱗翅目昆虫が共生細菌からの水平伝播によって獲得したと考えられる糖質加水分解酵素ファミリー31 (GH31) に属する酵素の遺伝子が存在する (12)。本酵素 (以下、BmNag31) の組換え発現を行い、活性の調査を行ったところ、これまで GH31 では見られなかった  $\alpha$ -*N*-アセチルガラクトサミニダーゼ活性を示すことを明らかにした。BmNag31 は溶液中で6量体を形成しており、*O*結合型糖鎖をもつウシ顎下腺ムチンから GalNAc を遊離する活性を示した。また、ITC によって C末端側に存在する糖結合モジュール (CBM32) ドメインが GalNAc に特異的に結合することを明らかにした。カイコの各成長段階における遺伝子発現量を定量 PCR で測定したところ、蛹の後期にかけて発現量が上昇していることが明らかになった。以上のことから、本酵素は蛹の段階で各組織が再構成される際に、糖タンパク質の分解に関与していると予想された (13)。

#### (4) カイコ由来スクロース分解酵素の立体構造解析

カイコの中腸に発現していると報告のある2種類のスクロース加水分解酵素 BmSUH および BmSUC1 の大腸菌発現系を構築し、組換え酵素を得た。両酵素とも X 線結晶構造解析に成功し、BmSUH はリガンドフリー構造に加え、基質複合体、共有結合中間体、生成物複合体に相当する立体構造の取得に成功した。この構造から基質であるスクロースのグルコース残基が  ${}^4C_1 \rightarrow [{}^4H_3] \rightarrow {}^4C_1 \rightarrow [{}^4H_3] \rightarrow {}^4C_1$  の構造変化を辿ることが強く支持され、この過程で触媒残基を含む活性部位のアミノ酸残基の構造も変化することが明らかになった。BmSUH は  $\alpha$ -アミラーゼに代表される巨大なファミリーである GH13 に属するが、GH13 においてこのように活性部位の構造変化を伴う酵素の報告は初めてのことであり (14)。BmSUC1 はスクロースとの複合体構造の決定に成功し、本酵素の基質の鎖長特異性に関する知見を得た。これは、動物由来 GH32 酵素として初めての立体構造の報告である (15)。

#### (5) 糖鎖分解酵素と相同性を有するバクテリア由来酵素の構造機能解析

(3) で記載した BmNag31 のホモログである腸内細菌 *Enterococcus faecalis* 由来 GH31 を糖タンパク質の O 結合型糖鎖に作用する  $\alpha$ -N-アセチルガラクトサミニダーゼであることを明らかにし、世界で初めて立体構造解析に成功した (16)。これは、糖タンパク質の Ser/Thr 残基に付加している  $\alpha$ -GalNAc を遊離する酵素であり、これまで知られている  $\alpha$ -N-アセチルガラクトサミニダーゼ (EC 3.2.1.49) の基質となる血液型 A 抗原には作用しなかった。立体構造と量子力学的計算によって本酵素の反応中における基質の構造変化や基質認識機構について明らかにした (17)。先行して海外のグループから機能の報告がされた別のバクテリア由来ホモログ (18) と我々の研究成果に基づき、本酵素には新しい EC 番号である 3.2.1.217 が付与された。

N 結合型糖鎖に作用する  $\alpha$ -1,2-マンノシダーゼである *E. faecalis* 由来酵素 EfGH92 の基質および基質を模倣した C-グリコシド阻害剤との複合体構造解析を行った。その結果、基質の  $\alpha$ -マンノース残基が  $E_5$  コンホメーションを取っており、他グループによって S-グリコシド阻害剤複合体から提唱されていた  ${}^4C_1$  とは異なることが明らかになった。これは、共同研究者の量子力学 (QM) 的計算によって予想されて実証したものであり、糖質加水分解酵素の反応機構の解明研究において QM の有用性を改めて示すものとなった (19)。

動物のコラーゲン糖鎖の分解酵素が分類されている GH65 から、バクテリア由来  $\alpha$ -1,2-グルコシダーゼを発見した。また、GH31 の系統解析から機能未知サブファミリーに着目し、バクテリアおよび真菌から既報の酵素より基質特異性の高い  $\alpha$ -1,3-グルコシダーゼを発見した。いずれの酵素も立体構造解析に成功し、基質認識機構と反応機構の構造基盤を得た (20,21)。前者の酵素は、既存の EC 番号に該当しないことから新しい EC 番号である 3.2.1.216 が付与された。 $\alpha$ -1,2-グルコシド結合や  $\alpha$ -1,3-グルコシド結合は N 結合型糖鎖前駆体や微生物が産生する多糖に含まれる構造であるため、これらの化学構造の解析や合成に利用できる可能性がある。

#### <参考文献>

1. Varki A., *Glycobiology* **27**, 3–49 (2017)
2. Apweiler R. et al., *Biochim. Biophys. Acta* **1473**, 4–8 (1999)
3. Kato T. et al., *Sci. Rep.* **7**, 1409 (2017)
4. Dojima T. et al., *J. Biotechnol.* **143**, 27–33 (2009)
5. Miyazaki T. et al., *J. Biosci. Bioeng.* **126**, 15–22 (2018)
6. Miyazaki T. et al., *J. Biosci. Bioeng.* **127**, 273–280 (2019)
7. Park E.Y. et al., *Biotechnol. Appl. Biochem.* **49**, 135–140 (2008)
8. Vadaie N. and Jarvis D.L., *J. Biol. Chem.* **279**, 33501–33518 (2004)
9. Haines N. and Irvine K.D., *Glycobiology* **15**, 335–346 (2005)
10. Miyazaki T. et al., *Insect Biochem. Mol. Biol.* **115**, 103254 (2019)
11. Nakamura S. et al., *Insect Biochem. Mol. Biol.* **123**, 103427 (2020)
12. Wheeler D. et al., *PLoS One* **8**, e59262 (2013)
13. Ikegaya M. et al., *Insect Mol. Biol.* **30**, 367–378 (2021)
14. Miyazaki T. and Park E.Y., *J. Biol. Chem.* **295**, 8784–8797 (2020)
15. Miyazaki T. et al., *Insect Biochem. Mol. Biol.* **127**, 103494 (2021)
16. Miyazaki T. and Park E.Y., *FEBS Lett.* **594**, 2282–2293 (2020)
17. Miyazaki T. et al., *Biochimie* **195**, 90–99 (2022)
18. Rahfeld P. et al., *J. Biol. Chem.* **294**, 16400–16415 (2019)
19. Alonso-Gil S. et al., *Chem. Eur. J.* **28**, e202200148 (2022)
20. Nakamura S. et al., *J. Biol. Chem.* **297**, 101366 (2021)
21. Ikegaya M. et al., *J. Biol. Chem.* **298**, 101827 (2022)

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 11件）

1. 著者名 Shuntaro Nakamura, Takanori Nihira, Rikuya Kurata, Hiroyuki Nakai, Kazumi Funane, Enoch Y. Park, Takatsugu Miyazaki	4. 巻 297
2. 論文標題 Structure of a bacterial $\alpha$ -1,2-glucosidase defines mechanisms of hydrolysis and substrate specificity in GH65 family hydrolases	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 101366
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2021.101366	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Takatsugu Miyazaki, Marina Ikegaya, Santiago Alonso-Gil	4. 巻 195
2. 論文標題 Structural and mechanistic insights into the substrate specificity and hydrolysis of GH31 $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochimie	6. 最初と最後の頁 90-99
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.biochi.2021.11.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Santiago Alonso Gil, Kamil Parkan, Jakub Kaminsky, Radek Pohl, Takatsugu Miyazaki	4. 巻 28
2. 論文標題 Unlocking the hydrolytic mechanism of GH92 $\alpha$ -1,2 mannosidases: Computation inspires the use of C-glycosides as Michaelis complex mimics	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Chemistry - A European Journal	6. 最初と最後の頁 e202200148
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/chem.202200148	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Marina Ikegaya, Toshio Moriya, Naruhiko Adachi, Masato Kawasaki, Enoch Y. Park, Takatsugu Miyazaki	4. 巻 298
2. 論文標題 Structural basis of the strict specificity of a bacterial GH31 $\alpha$ -1,3-glucosidase for nigerooligosaccharides	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 101827
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2022.101827	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takatsugu Miyazaki, Enoch Y. Park	4. 巻 295
2. 論文標題 Structure-function analysis of silkworm sucrose hydrolase uncovers the mechanism of substrate specificity in GH13 subfamily 17 exo- $\alpha$ -glucosidases	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 8784-8797
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA120.013595	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takatsugu Miyazaki, Enoch Y. Park	4. 巻 594
2. 論文標題 Crystal structure of the <i>Enterococcus faecalis</i> $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase, a member of the glycoside hydrolase family 31	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 2282-2293
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1873-3468.13804	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 宮崎 剛亜	4. 巻 58
2. 論文標題 カイコの糖鎖生物学と糖鎖工学 カイコの糖鎖構造改変と複合型糖鎖生合成酵素の解析	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 化学と生物	6. 最初と最後の頁 330-332
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1271/kagakutoseibutsu.58.330	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Shuntaro Nakamura, Takatsugu Miyazaki, Enoch Y. Park	4. 巻 124
2. 論文標題 $\alpha$ -L-Fucosidase from <i>Bombyx mori</i> has broad substrate specificity and hydrolyzes core fucosylated N-glycans	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Insect Biochemistry and Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 103427
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ibmb.2020.103427	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takatsugu Miyazaki, Nozomi Oba, Enoch Y. Park	4. 巻 127
2. 論文標題 Structural insight into the substrate specificity of Bombyx mori -fructofuranosidase belonging to the glycoside hydrolase family 32	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Insect Biochemistry and Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 103494
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ibmb.2020.103494	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Marina Ikegaya, Takatsugu Miyazaki, Enoch Y. Park	4. 巻 30
2. 論文標題 Biochemical characterization of Bombyx mori -N-acetylgalactosaminidase belonging to the glycoside hydrolase family 31	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Insect Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 367-378
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/imb.12701	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Miyazaki T, Miyashita R, Nakamura S, Ikegaya M, Kato T, Park EY	4. 巻 115
2. 論文標題 Biochemical characterization and mutational analysis of silkworm Bombyx mori -1,4-N-acetylgalactosaminyltransferase and insight into the substrate specificity of -1,4-galactosyltransferase family enzymes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Insect Biochemistry and Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 103254
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ibmb.2019.103254	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計26件(うち招待講演 1件/うち国際学会 4件)

1. 発表者名 宮崎 剛亜, 池谷 真里奈, Alonso-Gil Santiago
2. 発表標題 Enterococcus faecalis由来GH31 -N-アセチルガラクトサミニダーゼと基質との複合体構造解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年



1. 発表者名 中村 駿太郎, 朴 龍洙, 宮崎 剛亜
2. 発表標題 GH65 -1,2-グルコシダーゼとグルコシダーゼ阻害剤の複合体構造解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 池谷 真里奈, 朴 龍洙, 宮崎 剛亜
2. 発表標題 糖質加水分解酵素ファミリー31に属する -1,3-グルコシダーゼの構造と基質特異性の相関の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 池谷 真里奈, 守屋 俊夫, 安達 成彦, 川崎 政人, 朴 龍洙, 宮崎 剛亜
2. 発表標題 糖質加水分解酵素ファミリー31に属する -1,3-グルコシダーゼのX線結晶構造およびクライオ電子顕微鏡構造
3. 学会等名 2021年度量子ビームサイエンスフェスタ
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Rikuya Kurata, Shuntaro Nakamura, Enoch Y. Park, Takatsugu Miyazaki
2. 発表標題 Characterization of a glycoside hydrolase family 97 enzyme from <i>Flavobacterium johnsoniae</i>
3. 学会等名 The 8th International Symposium toward the Future of Advanced Researches in Shizuoka University (ISFAR-SU2022) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中村 駿太郎, 宮崎 剛亜
2. 発表標題 GH65 -1,2-グルコシダーゼと1-deoxynojirimycinの複合体構造解析
3. 学会等名 日本応用糖質科学会中部支部名古屋講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 池谷 真里奈, 宮崎 剛亜
2. 発表標題 糖質加水分解酵素ファミリー31に属する細菌および真菌由来 -1,3-グルコシダーゼの機能解析
3. 学会等名 日本応用糖質科学会中部支部名古屋講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Santiago Alonso-Gil, Kamil Parkan, Jakub Kaminsky, Radek Pohl, Takatsugu Miyazaki
2. 発表標題 The GH92 enzymatic mechanism: computation inspires the use of C-glycosides as Michaelis complex mimics
3. 学会等名 EMBO Workshop: Advances and Challenges in Biomolecular Simulations (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中村 駿太郎, 中井 博之, 朴 龍洙, 宮崎 剛亜
2. 発表標題 GH65 -1,2-グルコシダーゼの多分岐デキストランおよびその部分構造に対する活性
3. 学会等名 日本応用糖質科学会2021年度大会 (第70回)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 池谷 真里奈, 朴 龍洙, 宮崎 剛亜
2. 発表標題 GH31に属する新規 -1,3-グルコシダーゼの機能と構造の解析
3. 学会等名 日本応用糖質科学会2021年度大会 (第70回)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 倉田 陸矢, 中村 駿太郎, 朴 龍洙, 宮崎 剛亜
2. 発表標題 Flavobacterium johnsoniae由来GH97酵素の基質特異性の解析
3. 学会等名 日本応用糖質科学会2021年度大会 (第70回)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 池谷 真里奈, 宮崎 剛亜
2. 発表標題 系統解析によって見出した GH31 ファミリー -1,3-グルコシダーゼの機能解析
3. 学会等名 生物工学若手研究者の集い 夏のオンラインセミナー2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮崎 剛亜
2. 発表標題 カイコが有する二種類のスクロース加水分解酵素の構造機能解析
3. 学会等名 日本応用糖質科学会東日本支部シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮崎 剛亜, 朴 龍洙
2. 発表標題 Enterococcus faecalis 由来GH31 -N-アセチルガラクトサミニダーゼの構造機能解析
3. 学会等名 日本応用糖質科学会2020年度大会 (第69回)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 池谷 真里奈, 宮崎 剛亜, 朴 龍洙
2. 発表標題 水平伝播によって獲得したカイコ由来GH31 -N-アセチルガラクトサミニダーゼの発現と機能の解析
3. 学会等名 日本応用糖質科学会2020年度大会 (第69回)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中村 駿太郎, 宮崎 剛亜, 朴 龍洙
2. 発表標題 Flavobacterium johnsoniae由来新奇 -1,2-グルコシダーゼの性質解析
3. 学会等名 日本応用糖質科学会2020年度大会 (第69回)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shuntaro Nakamura, Takatsugu Miyazaki, Enoch Y. Park
2. 発表標題 -L-Fucosidase from Bombyx mori has wide substrate specificity and hydrolyzes core-fucosylated N-glycans
3. 学会等名 The 7th International Symposium toward the Future of Advanced Researches in Shizuoka University (ISFAR-SU2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Marina Ikegaya, Takatsugu Miyazaki, Enoch Y. Park
2. 発表標題 Functional analysis of a glycoside hydrolase family 31 enzyme from Bombyx mori obtained via horizontal gene transfer
3. 学会等名 The 7th International Symposium toward the Future of Advanced Researches in Shizuoka University (ISFAR-SU2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中村 駿太郎, 宮崎 剛亜
2. 発表標題 糖質加水分解酵素ファミリー65に属する -1,2-グルコシダーゼの基質認識機構の解明
3. 学会等名 2020年度量子ビームサイエンスフェスタ
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮崎 剛亜, 大場 望美, 朴 龍洙
2. 発表標題 カイコ由来 GH32 -フルクトフラノシダーゼ BmSUC1の立体構造解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中村 駿太郎, 中井 博之, 朴 龍洙, 宮崎 剛亜
2. 発表標題 Flavobacterium johnsoniae由来 -1,2-グルコシダーゼの立体構造解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮崎 剛亜, 朴 龍洙
2. 発表標題 カイコ由来 GH13_17 スクロース加水分解酵素のX線結晶構造解析
3. 学会等名 日本応用糖質科学会2019年度大会 (第68回)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村 駿太郎, 宮崎 剛亜, 朴 龍洙
2. 発表標題 カイコ由来 -L-fucosidase の性質の解析
3. 学会等名 日本応用糖質科学会2019年度大会 (第68回)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮崎 剛亜, 朴 龍洙
2. 発表標題 カイコ由来スクロース加水分解酵素の基質および阻害剤との複合体構造解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 池谷 真里奈, 宮崎 剛亜, 朴 龍洙
2. 発表標題 カイコ由来 -N-アセチルガラクトサミニダーゼの酵素学的性質の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中村 駿太郎, 宮崎 剛亜, 朴 龍洙
2. 発表標題 カイコ由来 -L-fucosidaseの糖タンパク質のN型糖鎖に対する活性の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Miyazaki T, Park EY	4. 発行年 2019年
2. 出版社 CRC Press	5. 総ページ数 344
3. 書名 Green Science and Technology: Chapter 20. Glycobiology and Glycoengineering in Silkworm	

〔産業財産権〕

〔その他〕

静岡大学農学部生物工学研究室（宮崎研究室）ウェブサイト <a href="https://wpp.shizuoka.ac.jp/glycoenzyme/">https://wpp.shizuoka.ac.jp/glycoenzyme/</a>
--

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------

オーストリア	University of Vienna			
チェコ	UCT, Prague	Czech Academy of Sciences		