

学 位 論 文 題 名

Study on an Engineered Biocatalyst for the Synthesis
of Heteropolysaccharides: Recombinant Human
Hyaluronan Synthase 2 Expressed in *Escherichia coli*

（ヘテロポリサッカライド合成酵素の機能制御に関する研究
ーヒト由来ヒアルロン酸合成酵素を用いた大腸菌発現系改変酵素の
作成とそのキャラクターゼーションに関する研究ー）

学位論文内容の要旨

ヒトゲノム解読が完了し、急速にポストゲノム研究が行なわれつつある近年、糖鎖は生命の誕生から死に至るまでの様々な生命現象において深く関与することが知られ、その重要性が注目されている。

機能性糖鎖分子の中でも重要な分子の一つであるヒアルロン酸(HA)は、生物進化上セルロース、キチン等のホモサッカライドと共に最も古くから生物界に存在する分子であり結合組織中形態の形成、維持機能を果たす他、受精、細胞分化、腫瘍の悪性化等の生命現象に深く関ることが知られている。HAの分子構造はグルクロン酸(GlcUA)とN-アセチルグルコサミン(GlcNAc)が β 1-3結合した二糖が繰り返し重合する分子量数十万から数百万の直鎖分子を形成するヘテロポリサッカライドである。

生体内機能の解明で重要となる糖鎖研究を進める上では、基礎的な機能解析と共に特定の糖鎖を大量に合成する技術が必要となるが、一般に糖鎖の化学合成は複雑かつ困難であるため、糖転移酵素を用いた大量発現系の構築が多分に貢献する。発現構築系に際して多用される宿主には、大腸菌、酵母、昆虫培養細胞、動物培養細胞等が挙げられ、最近では *in vitro* での転写翻訳系によってタンパク質を生産できることも報告されている。中でも、生産コスト面や短期間で十分な発現量の確保、更に手法上の簡便性を兼ね備えた宿主としては大腸菌が代表的となる。セキツイ動物由来のタンパク質を大腸菌で発現させる場合には、発現させるタンパク質の本来の局在や、発現させる領域（遺伝子配列）について十分な考慮を要し、活性を有した形での効率的な細胞外へのタンパク質分泌を行う技術が必要となる。しかしながら、フォールディングの不確実性、膜貫通領域による可溶性画分への分泌が困難であることが推測されるため、発現されたタンパク質が期待された機能を保持するかどうかは別の問題であり、現在までに活性を有するセキツイ動物由来糖合成酵素を大腸菌内で発現させた報告は数例のみにとどまっているのが現状である。

本研究では、HA合成を司るヒト由来ヒアルロン酸合成酵素(hHAS2)を遺伝子工学的手法を用いて改変し、マルトース結合タンパク質との融合タンパク質(MBP)として発現させることにより、大腸菌(*E. coli*)で活性を有した状態で発現させることに成功した。ま

た、当該酵素を用いて HAS の HA 産生メカニズムについて検討を行った。

第一章では序章として、HA を始めとしたグリコサミノグリカン (GAG) や生物進化的に近縁であると考えられるセルロース、キチン等の β 結合型多糖についての概略とそれら多糖の糖転移酵素遺伝子についての遺伝子的特徴及び機能に関して過去の様々な報告を基に述べる。

第二章では、バイオインフォマテクスを用いた遺伝子検索による戦略的遺伝子改変 hHAS2 の作成し、MBP との融合タンパク質として *E. coli* における発現効率について述べる。HA の合成を司るヒアルロン酸合成酵素 (HAS) は、遺伝子中に GlcUA と GlcNAc をそれぞれ合成する二種類の遺伝子ドメインを有し、今までの糖転移酵素の定説であった「一つの酵素は一つの糖を転移する (1 enzyme 1 linkage)」を覆した、一つの酵素で二種類の糖を交互に転移することのできる非常にユニークな酵素である。また、この HAS 酵素は糖転移酵素には稀有な複数回膜貫通領域を持つ膜貫通型タンパク質であることから、本研究では、HAS 酵素の持つ複数回の膜貫通領域を取り除き、HAS の触媒領域部位である、セキツイ動物由来で非常に高い遺伝子相同性領域に共通して保持される細胞質内領域と一部の膜貫通領域から成る改変酵素タンパク質の領域遺伝子を設計した。更に、この領域遺伝子を MBP 発現ベクターに組み込み、融合タンパク質として発現させた。その結果、本来、MBP は *E. coli* のペリプラズム画分に局在するタンパク質であるが、HAS-MBP 融合タンパク質はペリプラズムには局在せず、細胞質内及び膜画分に局在発現した。

第三章では、二章にて発現したヒト由来改変ヒアルロン酸合成酵素 (rhHAS2) の酵素活性測定と基質特異性について述べる。発現した rhHAS2 リゾチーム及び超音波処理後、超遠心を行い、rhHAS2 が局在する膜画分を調整して酵素活性測定を行った。反応産物はゲル濾過にて精製、分画後、Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI - TOF MS) にて分子量測定を行った。その結果、rhHAS2 は平均分子量 14 糖の HA を産生する活性型改変酵素であることを示した。さらに、セキツイ動物由来 HAS で議論されている糖鎖のプライマーと伸張方向についても、rhHAS2 により、HA のプライマーには非還元末端が飽和の 4 糖 HA が必要であり、そのプライマーにより非還元末端側に糖鎖が伸長することをセキツイ動物由来 HAS で初めて直接的に示した。

第四章では、第三章で得られた知見を基に更に改変 HAS のコンストラクトの長さを検討し、HA 合成に関る HAS 分子のメカニズムについて述べている。この実験で HA 合成のためには膜貫通領域は必ずしも必須ではなく、HAS の細胞質領域のみで HA が産生可能であることを示し、更に HA を一様に安定して産生するためには細胞質内より続く C 末端側の膜貫通領域の一部が必要であることを示した。

第五章は総括である。本研究では、バイオインフォマテクスを用いてヒト由来改変酵素をデザインし、MBP との融合タンパク質として *E. coli* 内で誘導、発現させることにより、*E. coli* において活性型の HAS を作成することに成功した。また第三章で示すように、本改変酵素により現在まで不明確であったセキツイ動物 HAS の HA 伸長プライマーを決定し、さらに、その際の HA 伸張方向を決定した。セキツイ動物由来の糖転移酵素を *E. coli* 内で機能を保持した状態で発現させたことは、今後の生体内機能を解明し、糖鎖を標的とした創薬及び糖鎖の研究を行う上で非常に有用であると考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 西 村 紳一郎
副 査 教 授 齋 藤 政 樹 (明治薬科大学 薬効学教室)
副 査 教 授 新 田 勝 利
副 査 助 教 授 中 川 裕 章
副 査 助 教 授 福 原 法 夫

学 位 論 文 題 名

Study on an Engineered Biocatalyst for the Synthesis of Heteropolysaccharides: Recombinant Human Hyaluronan Synthase 2 Expressed in *Escherichia coli*

(ヘテロポリサッカライド合成酵素の機能制御に関する研究
ーヒト由来ヒアルロン酸合成酵素を用いた大腸菌発現系改変酵素の
作成とそのキャラクタリゼーションに関する研究ー)

ヒトゲノム解読が完了し、急速にポストゲノム研究が行なわれつつある近年、糖鎖は生命の誕生から死に至るまでの様々な生命現象において深く関与することが知られ、その重要性が注目されている。

機能性糖鎖分子の中でも重要な分子の一つであるヒアルロン酸(HA)は、生物進化上セルロース、キチン等のホモサッカライドと共に最も古くから生物界に存在する分子であり結合組織中の形態形成、維持機能を果たす他、受精、細胞分化、腫瘍の悪性化等の生命現象に深く関ることが知られている。HAの分子構造はグルクロン酸(GlcUA)と *N*-アセチルグルコサミン(GlcNAc)が β 1-3 結合した二糖が繰り返し重合する分子量数十万から数百万の直鎖分子を形成するヘテロポリサッカライドである。

生体内機能の解明で重要となる糖鎖研究を進める上では、基礎的な機能解析と共に特定の糖鎖を大量に合成する技術が必要となるが、一般に糖鎖の化学合成は複雑かつ困難であるため、糖転移酵素を用いた培養法による糖鎖合成が有用となる。糖転移酵素の発現系に際して多用される宿主には、大腸菌、酵母、昆虫培養細胞、動物培養細胞等が挙げられ、最近では *in vitro* での転写翻訳系によってタンパク質を生産できることも報告されている。中でも、生産コスト面や短期間で十分な発現量の確保、更に手法上の簡便性を兼ね備えた宿主としては大腸菌が代表的である。セキツイ動物由来のタンパク質を大腸菌で発現させる場合には、発現させるタンパク質の本来の局在や、発現させる領域(遺伝子配列)について十分な考慮を要し、活性を有した形での効率的な細胞外へのタンパク質分泌を行う技術が必要となる。しかしながら、フォールディングの不確

実性、膜貫通領域による可溶性画分への分泌が困難であることが推測されるため、発現されたタンパク質が期待された機能を保持するかどうかは別の問題であり、現在までに活性を有するセキツイ動物由来糖合成酵素を大腸菌内で発現させた報告は数例のみにとどまっているのが現状である。

本研究では、HA 合成を司るヒト由来ヒアルロン酸合成酵素(hHAS2)を遺伝子工学的手法を用いて改変し、マルトース結合タンパク質との融合タンパク質 (MBP) として発現させることにより、大腸菌(*E. coli*)で活性を有した状態で発現させることを試みた。また、当該酵素を用いて HAS の HA 産生メカニズムについて検討を行った。

HA の合成を司るヒアルロン酸合成酵素(HAS)は、遺伝子中に GlcUA と GlcNAc をそれぞれ合成する二種類の遺伝子ドメインを有し、今までの糖転移酵素の定説であった「一つの酵素は一つの糖を転移する (1 enzyme 1 linkage)」を覆した、一つの酵素で二種類の糖を交互に転移することのできる非常にユニークな酵素である。また、HAS は糖転移酵素には稀有な複数回膜貫通領域を持つ膜貫通型タンパク質である。本研究では、セキツイ動物由来 HAS に共通な細胞質内の糖転移部位と、糖合成に関するタンパク質と高い相同性を示す一部の膜貫通領域より構成された改変ヒト由来ヒアルロン酸合成酵素(rhHAS2)を設計した。更に、この領域遺伝子を MBP 発現ベクターに組み込み、融合タンパク質として発現させた。発現した rhHAS2 はリゾチーム及び超音波処理後、超遠心を行い、rhHAS2 が局在する膜画分を調整して酵素活性測定を行った。反応産物はゲル濾過にて精製、分画後、Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS)にて分子量測定を行った。その結果、rhHAS2 は平均分子量 14 糖の HA を産生する活性型改変酵素であることを示した。また、セキツイ動物由来 HAS で議論されている糖鎖のプライマーと伸張方向について検討した結果、HA 合成には非還元末端が飽和の 4 糖 HA がプライマーとして必要であり、4 糖 HA プライマーにより非還元末端側に糖鎖が伸長することをセキツイ動物由来 HAS で初めて直接的に示した。更に、rhHAS2 の必要領域について詳細に検討した結果、HA 合成には膜貫通領域は必ずしも必須ではなく、HAS の細胞質領域のみで HA の産生が可能であり、HA を一様に安定して産生するためには細胞質内より続く C 末端側の膜貫通領域の一部が必要であることを示した。

これを要するに、著者は、初めてセキツイ動物由来のヒアルロン酸合成酵素を大腸菌内で活性を保持した状態で発現させることに成功した。更に、現在まで不明確であった当該酵素の機能制御の一端を解明した。この結果は、糖鎖を標的とした創薬及び今後の糖鎖の研究に貢献するところ大なるものがある。

よって著者は、北海道大学博士 (理学) の学位を授与される資格あるものと認める。