

## 学位論文題名

## Computational design and experimental evaluation of glycosyltransferase mutants

(新規糖転移酵素の計算に基づく設計と実験による検証)

## 学位論文内容の要旨

この10年間で生物学の領域におけるバイオインフォマティクスの地位は確固たるものとなった。伝統的にバイオインフォマティクスを用いた研究の対象となってきたのはタンパク質もしくは核酸である。特にこれらの配列情報はデジタル化になりやすいため、コンピュータとタンパク質・核酸との相性は良かった。一方糖鎖に目を転じると、糖鎖自身は遺伝物質ではない事や、その合成・解析の困難のため構造情報がタンパク質・核酸に比べて少ない事などに由来して、糖鎖とコンピュータとの相性はそれほど良いとは言えなかった。

糖鎖生物学は長い歴史をもっているが、生物学における主流は常にタンパク質もしくは核酸を対象としたものであった。ところが近年、特に質量分析技術の発展により、大量の糖鎖構造の情報が得られるようになった。また、タンパク質と糖鎖の共結晶が大量に公共データベースに登録された事によって、糖鎖の3次元構造の情報も豊富に得られるようになった。このような近年の糖鎖生物学の発展によって、糖鎖を対象としたバイオインフォマティクス研究が行える状況になった。

本研究は、糖鎖を対象としたバイオインフォマティクスを確立する事を目標にし、はじめに、現在得られる糖鎖の3次元構造情報をまとめる事を行った。次に、まとめた糖鎖の立体構造情報を用いて糖-タンパク質間相互作用を評価する経験ポテンシャルを構築した。最後に、この経験ポテンシャルを用いて新しい基質特異性を持つ糖鎖関連酵素をデザインし、実験的にデザインした酵素の活性を評価した。

本学位論文の第1章で、糖鎖生物学とバイオインフォマティクスに関連する現在の状況に関して概説した。

第2章では、糖鎖の立体構造をまとめたデータベースの構築に関して記述した。糖鎖の立体構造情報はタンパク質の立体構造データベースである The Protein Data Bank (PDB) に大量に含まれている。この研究をはじめた当初 PDB に含まれている糖鎖の情報をまとめたデータベースが存在しなかったため、PDB の中から網羅的に自動で糖鎖構造を抽出する事を行った。getCARBO と命名したプログラムによって PDB 中の全糖鎖構造を抽出し、その化学構造に対して IUPAC 勧告に従ったアノテーションを施した。また、PDB 中の N 結合型糖鎖に大量のまちがった構造が見られたので、このまちがいを自動検出する機能も getCARBO に実装した。第3章では、構築したデータベースに含まれる情報の詳細に付いて概観した。前章で記述した糖鎖の立体構造データベースは Glycoconjugate Data Bank:Structures (GDB:Structures) と命名

した。GDB:Structures には 18,000 を超える糖鎖構造が登録されていた。時系列にそった解析を行ったところ、構造ゲノミクスによる糖鎖構造情報への貢献はほとんどない事と、まちがった N 結合型糖鎖が PDB に登録される割合が減っていない事などが明らかになった。

第 4 章では、GDB:Structures を活用した、糖-タンパク質相互作用を評価する経験ポテンシャルの構築に関して記述した。この経験ポテンシャルを用いる事で、所与の糖-タンパク質複合体において、糖の水酸基の向きがエクソトリアルである方が親和性が高いのか、アキシシャルである方が親和性が高いのかを評価する事ができる。

第 5 章では、前章で記述した経験ポテンシャルを用いて異なった基質特異性を持つ糖転移酵素をデザインし、その酵素活性を実験的に確かめた。変異体をデザインした酵素は、人の B 型の血液型抗原を合成する糖転移酵素(GTB)で、本来ガラクトースを転移する酵素である。GTB の立体構造は既知なので、この酵素の変異体を分子モデリングし、その変異体構造とグルコースとの複合体が安定にできる候補を前述の経験ポテンシャルを用いて選出した。実際にデザインしたタンパク質を大量発現させ酵素活性を調べた結果、グルコースを基質として好む傾向が顕著に上昇した変異体(Ser185Asn と Ser185Cys)を得る事ができた。グルコース転移活性：ガラクトース転移活性の比率が、野生型を 1 とした時に Ser185Asn では 27 倍、Ser185Cys では 217 倍に上昇していた。

最後に第 6 章で、この研究の総括を行い、明らかになった問題点などに関して記述した。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 西 村 紳一郎  
副 査 教 授 河 野 敬 一  
副 査 教 授 田 中 勲  
副 査 助 教 授 姚 閱

学位論文題名

## Computational design and experimental evaluation of glycosyltransferase mutants

(新規糖転移酵素の計算に基づく設計と実験による検証)

近年、糖鎖生物学と情報生物学（バイオインフォマティクス）は進展目覚ましい研究分野である。これまで、糖鎖生物学ではゲノミクスに代表される大量のデータをハイスループットで得ることが困難であった事、バイオインフォマティクスが核酸とタンパク質を対象とする学問であった事により、両者が有機的に連携する事が少なかった。ごく最近になって、糖鎖に関しても大量のデータが得られるようになり、糖鎖生物学においてもバイオインフォマティクスが重要な手法として認識されるようになった。

本論文は、糖鎖生物学と情報生物学を融合研究の1つのモデルを示したものである。著者は、糖鎖生物学の情報に対してバイオインフォマティクス的な整理を行い、その情報をもとに新たな機能を持つ酵素の設計・実験的検証を行った。この研究は、糖鎖生物学と情報生物学の融合によってタンパク質工学、糖鎖工学分野にインパクトを与えるものであった。

著者は、タンパク質の立体構造データベースである Protein Data Bank (PDB) 中に相当数の糖鎖が含まれている事を発見し、その立体構造情報を収集、データベース化した (Glycoconjugate Data Bank/Structures)。PDB の情報から糖鎖の構造を抽出するために独自のコンピュータプログラムコードを開発した (getCARBO)。このプログラムは、糖鎖の構造を検出し、その構造の詳細についてのアノテーションを自動付加するものである。また、PDB 中に N 型糖鎖として不適切な立体構造が多く含まれている事を明らかにし、これを判定するためのプログラムコードの開発もあわせて行い公開した。次に、構築した糖鎖構造データベースを活用し、糖鎖周辺のタンパク質分子の原子レベルでの分布をモデル化し、糖-タンパク質相互作用を評価する経験的ルールを構築した。これによって、糖-タンパク質複合体における糖の水酸基の向きがアキシアル・エクソトリアルどちらの方が起こりやすいかを評価する方法を見出した。方法に基づいて著者は、本来の基質がガラクトースである糖転移酵素 GTB に対してグルコース転移活性を上昇させるための機能改変を行った。結果、本来の基質であるガラクトースに対する転移活性は減少し、グルコースの転移活性が上昇した変異体を得る事に成功した。

本学位論文は、糖鎖生物学と情報生物学を融合して得られた方法論に基づき、酵素変異体のモデル設計を行う事によって、これまででない新規な糖鎖合成酵素を見出した研究をまとめたものである。タンパク質工学や糖鎖工学に対して大きな影響を与えるとともに、その発展を加速する研究である。

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があるものと認める。