

学位論文題名

High Level Expression of Bacterial Glycosyltransferases and its Application to the Syntheses of Glycopeptides and Glycosphingolipids

(細菌由来糖転移酵素の高生産と糖ペプチド、糖脂質合成への利用)

学位論文内容の要旨

糖タンパク質、糖脂質は、細胞接着、シグナル伝達、免疫応答など様々な生体反応に関与している。糖タンパク質である *O*-結合型糖タンパク質は、*N*-アセチルガラクトサミンがセリン/スレオニン残基に α 結合し、様々な糖転移酵素の修飾を受けることで多様な糖鎖構造を提示する。中でもコア2型糖鎖の高発現は免疫不全症や癌細胞の浸潤に関与することが知られている。糖脂質は、両親媒性分子で、全ての脊椎動物の細胞に存在し、糖転移酵素の修飾パターンにより8つのクラスに分類される。糖タンパク、糖脂質において、シアリルルイスX、ルイスX、ルイスaなどの機能性糖鎖形成は、ポリラクトサミンを基盤として起こることが知られている。

生物学的機能解明のために、糖ペプチド、糖脂質の合成は化学合成(液相、固相)、あるいは化学合成と酵素合成を組み合わせた方法で行われてきた。特に糖ペプチド合成においてはマイクロウェーブ照射化での固相合成が注目されている。糖は多数水酸基を有する高極性物質であり、化学合成の際はその水酸基の保護/脱保護が必要となる。また、糖鎖構築のためのグリコシル化反応においては立体制御の必要がある。一方糖転移酵素を用いた糖伸長では水酸基が遊離のまま、立体選択的にグリコシド結合を構築できることから近年注目されている。しかしながら、高い活性を有する糖転移酵素の調製が困難であるため、限られた酵素しか利用できないのが現状である。

ナイセリア、ヘリコバクター属などの病原性グラム陰性菌は、その細胞膜に糖鎖と脂質から成る複合糖脂質リポオリゴ糖を産生する。病原性細菌は末端糖鎖にシアリルルイスX、ルイスXなどのヒト糖鎖を模倣することにより、免疫監視機構から逃れることを可能にしている。これら外膜糖鎖の生合成には複数の糖転移酵素が関与していることから、このような糖転移酵素の高生産は有用糖鎖の合成に利用できると考えられる。

本研究では、高い活性を有する糖転移酵素源として細菌由来の糖転移酵素に着目した。ヒト糖鎖を模倣するための糖転移酵素を大腸菌で大量発現し、それら酵素を糖ペプチド、糖脂質の合成に利用できないかと考え、研究を行った。

第一章では、これまでに明らかとなっている糖タンパク、糖脂質の構造と機能、糖ペプチド、糖脂質の合成方法、そして細菌由来糖転移酵素の性質と機能、そして現在までの糖ペ

チド、糖脂質の合成についてまとめた。

第二章では、グラム陰性菌 *Neisseria meningitidis* 由来 β 1,3-*N*-アセチルグルコサミン転移酵素(LgtA)の大腸菌における大量発現と特異性解析、そしてその酵素をポリラクトサミン含有糖アミノ酸、糖ペプチド、糖脂質合成に利用し、構築した化合物群に関する詳細な構造解析について述べた。LgtA を大腸菌にて発現させ、陰イオン交換、ゲルろ過カラムにより精製を行い、従来よりも7倍の活性を有する LgtA を調製した。最適反応条件を検討したところ従来の最適 pH 7.0 よりも、アルカリ条件 pH 10.0 において最も活性が高いことを明らかにした。Core2[GlcNAc β 1 \rightarrow 6(Gal β 1 \rightarrow 3)GalNAc α 1 \rightarrow]がスレオニン (Thr) あるいはセリン (Ser) に結合した基質に対して GlcNAc 転移反応を行ったところ、アミノ酸が Ser の時のみ Gal からの伸長を確認した。このことから1分岐、あるいは2分岐ポリラクトサミンを有する糖アミノ酸ビルディングブロックを得るために、Core2-Ser を出発原料とし、ヒト由来ガラクトース転移酵素(GalT)と LgtA によりラクトサミン伸長を行った。ラクトサミン1単位伸長ごとに精製し、伸長反応を繰り返した結果、1分岐型6糖(78%)、8糖(82%)、10糖(36%)、2分岐型8糖(16%)、10糖(86%)、12糖(90%)を有する糖アミノ酸の合成に成功した。しかしながら、糖ペプチドに対してはLgtAは全くグルコサミンを転移しなかった。そこで糖ペプチド合成にLgtAを利用するために、糖アミノ酸上でグルコサミンを伸長し、それをビルディングブロックとして用いることにした。Core2のGlcNAcにGlcNAc β 1 \rightarrow 3Gal β 1 \rightarrow 4が結合した糖アミノ酸をマイクロウェーブ照射化カップリングすることで、固相糖ペプチド合成に利用可能であることが解った。LgtA, GalTによるラクトサミン伸長反応を糖脂質の合成に用いるために、水溶性ラクトシルセラミドミミックポリマーに対しても行った。その結果、LgtA, GalT 反応共にほぼ定量的に進行し、ラクトサミン2単位の伸長が可能であった。以上により合成したポリラクトサミン含有化合物群すべてに関して NMR 解析により完全帰属に成功した。また糖アミノ酸化合物に関しては詳細な MALDI-TOF/TOF MS 解析も行った。

第三章では、グラム陰性菌 *Helicobacter pylori* 由来 α 1,3-フコース転移酵素 (FucT) の大腸菌による大量発現と精製、そしてルイスX構造を有する糖アミノ酸、糖ペプチド、糖脂質の合成に利用し、構築した化合物群に関する詳細な構造解析について述べた。FucT を大腸菌にて発現させ、ニッケルキレートカラムにて精製後、透析により pH8.0 から pH10.0 に置換し、陰イオン交換、ゲルろ過カラムにて精製を行った。アルカリ条件下濃縮することで、中性条件下で見られた沈殿はなく、18 mg/mL まで濃縮可能であった。また、活性を測定したところ 16U/mL、比活性 2.8U/mg であった。以上により調製した FucT の転移能を評価するために、第二章で述べた方法によりラクトサミン構造を有する糖アミノ酸、糖ペプチド、糖脂質ミミックポリマーを調製した。これら基質に対して FucT を反応させたところ、90%以上の高収率でフコシル化された化合物を得た。しかしながら、反応しうる糖残基が複数ある場合においては構造を見分けることなく、全てがフコシル化された。以上により合成したルイスX構造を有する化合物群に関して詳細な構造解析を行った。

第四章は第一章から第三章までの総括を述べた。

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 教 授 出 村 誠

学 位 論 文 題 名

High Level Expression of Bacterial Glycosyltransferases and its Application to the Syntheses of Glycopeptides and Glycosphingolipids

(細菌由来糖転移酵素の高生産と糖ペプチド、糖脂質合成への利用)

糖タンパク、糖脂質など複合糖質の構造とその機能が徐々に解明されつつある。その解明には、糖タンパク質(糖ペプチド)、糖脂質の効率的な合成法が開発されてきたという背景がある。しかしながら、ポリラクトサミン、ルイスX構造を有する複合糖質の効率的合成法は未だ確立しておらず、今後の発展が待たされている状況にある。本論文は、2種の異なる細菌由来糖転移酵素の大量発現系を確立し、この酵素を用いた糖鎖伸長法と化学合成法を組み合わせることで、ポリラクトサミン、ルイスX構造を有する糖アミノ酸、糖ペプチド、糖脂質の網羅的な合成研究を展開することにより、糖鎖工学、糖鎖生物学上の有益な知見を得たもので多大な意義がある。

ナイセリア、ヘリコバクター属などの病原性グラム陰性菌はその細胞外膜にヒト模倣糖鎖と脂質から成る複合糖脂質リポオリゴ糖を産生する。これら外膜糖鎖の生合成には複数の糖転移酵素が関与していることから、著者はこれらの糖転移酵素を高生産できれば複合糖質合成に利用できると考え、*N. meningitidis* 由来の β 1,3-グルコサミン転移酵素(β 1,3-GlcNAcT)と *H. pylori* 由来の α 1,3-フコース転移酵素(α 1,3-FucT)それぞれに関して、既存の生産法を改善することにより大量調製法を確立した。 β 1,3-GlcNAcT に関して至適条件を詳細に検討した結果、驚くことにアルカリ条件下で最も活性が高いという新規な知見を見出した。この新規性質を活用することで、長鎖分岐型ポリラクトサミン構造を有する O-結合型糖アミノ酸を効率的に合成した。この酵素は糖ペプチドには直接糖を転移しなかったことから、著者は糖アミノ酸上で糖転移を行った基質を化学酵素的に調製し、マイクロウェーブ照射固相合成に利用することでポリラクトサミン含有糖ペプチド合成に成功した。さらに、糖脂質ミミックポリマー上でのポリラクトサミン伸長にも成功した。大量発現した α 1,3-FucT を上記で合成したポリラクトサミン含有基質に対して作用させた結果、糖アミノ酸、糖ペプチド、糖脂質の全てにおいて90%以上の高収率でフコシル化が進行することがわかった。

これを要するに、著者は、2種の細菌由来糖転移酵素の大量発現系の確立、そのポリラクト

サミン、ルイスX構造を有する複合糖質の効率的合成法への応用に関する新知見を得たものであり、糖鎖工学、糖鎖生物学の分野に対して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。