

学位論文題名

Oriented immobilization of recombinant glycosyltransferases
using site-specific *trans*-peptidase(部位特異的トランスペプチダーゼを利用した
遺伝子組換え糖転移酵素の配向的固定化)

学位論文内容の要旨

複合糖質は生体内における様々な相互作用に重要な役割を果たしている。糖鎖研究において、均一な糖鎖の調製は重要なテーマの一つとなっているが、核酸、蛋白質のように増幅システムがないことから有機化学合成法による調製が主流である。近年、位置選択性、立体選択性及び温和な反応条件などの利点から、糖転移酵素を利用した糖鎖の化学酵素的合成法が広がってきている。本研究では、化学酵素的糖鎖合成の効率向上を目指し、黄色ブドウ球菌由来の部位特異的トランスペプチダーゼ(SrtA)を利用した糖転移酵素の固定化法の開発を行った。

SrtA は菌体内で分泌蛋白質の C 末端近傍にある LPXTG 配列を認識し、Thr と Gly の間を切断する。その後、細胞壁構成成分 Lipid II の Gly₅ 残基の N 末端の求核反応によりペプチド結合を形成し分泌蛋白質を細胞壁に提示する。SrtA は Acyl-donor である LPXTG に対しては厳格な基質特異性を有するため選択性は高く、また、この配列は遺伝子組換え技術で容易に目的蛋白質に導入可能であることから、部位特異的な修飾のタグとして有用である。一方、Acyl-acceptor に対しての基質特異性は、十分に調べられておらず、SrtA と類似した SrtB において Acyl-acceptor となる tri-glycine との共結晶構造解析から、これらの相互作用は非常に弱いことが示されている。Acyl-acceptor の許容度が高ければこのシステムを利用した固定化の汎用性が広がることから、まず初めに Acyl-acceptor に対する基質特異性を検討した。LPKTG を含むモデルペプチドと簡単なアルキルアミン体である 5-amino-1-pentanol とを SrtA で反応させた結果、MALDI-TOF MS 分析により反応生成物に相当するマススペクトルが得られた。さらに、アミノアルキル基を有する糖鎖あるいはビオチンとも反応することを確認した。以上の結果、SrtA は非天然構造のアミノアルキル基を Acyl-acceptor として利用できることを見出した。次に以下の 2 種類の糖転移酵素について SrtA によるアミノアルキル基を保持する担体への固定化を検討した。

ヒト β 1,4-galactosyltransferase (hGalT) は、GlcNAc に galactose を転移する酵素であるが、反応時に大きく構造変化することが知られており、化学的固定化では比活性が低下することが報告されている。hGalT の C 末端に SrtA 認識配列 (LPETG) を導入した hGalT-Sor 発現プラスミドを構築した。このプラスミドを保持する組換え大腸菌を培養し、SDS-PAGE でシングルバンドにまで精製した。hGalT-Sor と上記アミノアルキル基を有するビオチンとを SrtA で反応後、Streptavidine-HRP にてウェスタンブロッティングを行った。その結果、SrtA 添加系にのみ、hGalT-Sor の位置にシグナルを確認したことから、hGalT-Sor に導入した SrtA 認識配列が Acyl-donor として機能したことが示された。続いてビオチン誘導体の代わりに、市販のアミノアルキル基を保持する固相担体

である EAH-Sepharose と hGalT-Sor とを SrtA で反応させた。その結果、活性固定化率 30%、蛋白質固定化率 33% となり、固相担体上の hGalT の比活性は遊離 hGalT の 90% であった。Mu-GlcNAc に対する kinetics parameter も遊離および固定化 hGalT で同等であった。従来の特異的な化学的固定化法であるグルタルアルデヒド法、活性化エステル法では比活性はそれぞれ 25%、23% であり、SrtA による固定化の方が活性固定化率、固定化酵素の比活性が優れていた。

Helicobacter pylori α 1,3-fucosyltransferase (HFucT) は LacNAc に fucose を転移する酵素である。HFucT は二量体を形成していると推測され、この構造が安定性と活性に重要であることが示唆されている。従って、HFucT も化学的固定化では、比活性の低下が予想される。hGalT と同様に C 末端に SrtA 認識配列 (LPETG) を導入し、大腸菌から精製した。アミノアルキル基を有するビオチンとの反応性を確認後、EAH-Sepharose に固定化した。その結果、活性固定化率 54%、蛋白質固定化率 57% となり、固相担体上の HFucT の比活性は遊離 HFucT の 94% であった。固定化 HFucT も GDP-fucose および Mu-LacNAc に対する kinetics parameter は遊離 HFucT と同程度であり、また、化学的固定化法と比較しても、活性固定化率は同等以上でかつ比活性は高かった。以上の結果から、SrtA による *trans*-peptidation によって固定化した酵素は、活性が低下することなく遊離酵素と同等の特性と比活性を有しており、特に、構造的に化学的固定化が困難な酵素に対して優れた固定化法であることが示された。

最後に、調製した固定化 hGalT および固定化 HFucT を使い、GlcNAc 誘導体を原料として 3 糖からなる Lewis X 抗原の合成を検討した。原料及び 2 つの酵素を one-pot で反応開始後、GlcNAc から LacNAc を経て Lewis X へ経時的に変換した。反応終了後、スピンフィルターにて固定化酵素を回収し、再び Lewis X 合成反応に供した。10 回繰り返し使用する間、固定化酵素の活性を測定した結果、hGalT の酵素活性は低下することなくその初期活性を維持していた。一方、HFucT は最初の 3 回までに共有結合で固定化されていない dimmer の活性ロスに相当する約 40% 程度、活性が低下したもののその後は活性を維持した。

本研究では、SrtA を利用し *trans*-peptidation 反応による効率的な糖転移酵素の固定化法を開発した。この方法は、短いペプチド配列を酵素活性への影響が少ない C 末端に遺伝子組換えによって導入し、容易に入手可能な担体に固定化できることから非常に汎用性が高い。特に化学的固定化が困難な酵素でも容易に固定化でき、さらに固定化酵素の利点である容易な生産物の分離と酵素の繰り返し使用が可能であることを示した。本技術を利用することによって化学酵素的合成法による糖鎖ライブラリーの構築や固定化酵素を利用した酵素阻害剤のスクリーニングなどに貢献することが期待される。

以上

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 西 村 紳一郎
副 査 教 授 田 中 勲
副 査 教 授 河 野 敬 一
副 査 教 授 菅 原 一 幸
副 査 客員教授 武 本 浩 (シオノギ創薬
イノベーションセンター長)
副 査 教 授 門 出 健 次

学位論文題名

Oriented immobilization of recombinant glycosyltransferases using site-specific *trans*-peptidase

(部位特異的トランスペプチダーゼを利用した
遺伝子組換え糖転移酵素の配向的固定化)

糖鎖は真核細胞の半数以上が修飾され、細胞間や分子間のコミュニケーションに深く関与することが明らかになりつつある。このため個々の糖鎖の働きを解明しようと多くの研究がなされているが、一方で糖鎖は非常に多様性を持っていることから、均一な糖鎖の調製は極めて重要な研究テーマの一つとなっている。糖鎖合成の主流は有機合成であるが、近年、位置選択性、立体選択性、温和な反応条件などの理由で糖転移酵素を用いた化学酵素的合成も広く研究されている。伊藤氏はこの化学酵素的合成法の酵素反応に着目し、効率的な糖鎖合成を行うために糖転移酵素の固定化について検討した。これまで酵素の固定化のほとんどが非特異的な化学的固定化法によりなされてきたが、多くの場合、活性の低下がみられる。特に糖転移酵素で固定化の報告のある β 1,4-galactosyltransferaseでは、活性の固定化率は非常に低いことが知られている。

本論文は、化学酵素的糖鎖合成法の効率化を目的に糖転移酵素の固定化について検討し、トランスペプチダーゼとして報告されているsortaseを用いて部位特異的配向的に固定化された酵素が繰り返し糖鎖合成反応に使用可能であることを示した。Sortaseにはこれまで詳細に研究されている*Staphylococcus aureus*由来Sortase A (SrtA)を用いた。SrtAはAcyl-donorとしてLPXTG配列を認識し、ThrとGlyの間を切断後、Acyl-acceptorとなる

tri-glycineのN末端アミノ基の求核反応によりペプチド結合を形成する。このAcyl-donorに対する基質特異性の厳格さに比べ、Acyl-acceptorに対しての基質特異性は十分に調べられていないことから、まずAcyl-acceptorに対する基質特異性を検討した。SrtAと類似したSrtBにおいてAcyl-acceptorとなるtri-glycineとの共結晶構造解析から推定した末端にアミノ基と立体障害の少ないアルキル鎖からなる5-amino-1-pentanolをはじめ、種々のアルキルアミン化合物が反応し、SrtAは本来の基質とは異なるアミノアルキル基をAcyl-acceptorとして利用できることを見出した。さらにこのアミノアルキル基との反応をC末端にSrtA認識配列 (LPETG)を導入したヒト β 1,4-galactosyltransferase (hGalT)や*Helicobacter pylori* α 1,3-fucosyltransferase (HFucT)に対しても応用し、部位特異的ピオチン化や市販固相担体への配向的固定化に成功した。構築した2つの固定化酵素はいずれも、遊離酵素と同等の比活性や動力学特性を保持していた。従来の非特異的な化学的固定化法と比較しても活性固定化率は同等以上でかつ比活性は有意に高いものであった。

固定化酵素の最大の利点である繰り返し使用についての評価も検討し、原料及び2種の固定化酵素をone-potで反応開始後、GlcNAcからLacNAcを経てLewis X抗原へ経時的に変換した。その後固定化酵素のみを回収し再びLewis X合成反応に供した。10回繰り返し使用する間、hGalTの酵素活性は低下することなくその初期活性を維持していた。一方、HFucTは最初の3回までに共有結合で固定化されていないdimmerにおける活性損失に相当する約40%程度の活性低下が生じたもののその後は活性を維持した。

これを要するに、伊藤氏は、SrtAによる*trans*-peptidase反応を利用した糖転移酵素の新しい固定化法を開発した。本法は、反応時の構造変化が大きいGalTや2量体構造をとるHFucTなど一般に固定化が困難な酵素について、短いペプチド配列を酵素活性への影響が少ないC末端に遺伝子組換え技術によって導入し、入手が容易な市販担体に固定化できることから非常に汎用性が高いことが予想される。さらに固定化酵素の利点である容易な生成物の分離と酵素の繰り返し使用が可能であることを示した。本技術を利用して調製された固定化糖転移酵素により化学酵素的合成法による糖鎖ライブラリーの構築や複合糖質の合成が高効率で可能となり、糖鎖研究の進展に大いに貢献すると考えられる。また、他の様々な酵素やタンパク質に対しても応用可能な技術であることから、タンパク質工学やバイオテクノロジー分野への波及効果も大きい。

よって伊藤氏は、北海道大学博士（生命科学）の学位を授与されるに十分な資格があるものと認める。