

シアル酸含有糖鎖の合成を中心とした海洋性細菌
由来シアル酸転移酵素に関する生化学的研究

峯 利 喜

目 次

1章 緒言	3
2章 <i>Photobacterium leiognathi</i> JT-SHIZ-119 株由来 α 2,6-シアル酸転移酵素の組換え酵素タンパク質の活性特性	10
3章 <i>Photobacterium</i> 属 JT-ISH-224 株由来の組換え α 2,3-シアル酸転移酵素を用いたシアル酸含有糖鎖の合成と酵素の受容体基質特異性	36
4章 細菌由来シアル酸転移酵素の発現を目指した、バレイショ塊茎からの誘導性プロモーターの単離	74
5章 結論	92
6章 引用文献	95
謝辞	102

1章 緒言

糖は生体内において重要な役割を果たしている。一般的な例としては、単糖であるグルコースを代表とする生物活動のエネルギー源としての役割としての糖である。デンプンやグリコーゲンといった貯蔵多糖は、グルコースなど主に単一の糖から構成されるホモ重合体である。一方、複合糖質として知られる糖タンパク質や糖脂質に含まれる糖は、後述するように情報分子としての役割を有しており、数種類の糖から構成される複雑なヘテロ重合体の形で存在する。これら糖タンパク質や糖脂質に結合している糖部分は「糖鎖」と呼ばれる。糖鎖の一般的な構成成分はヘキソースであり、通常はピラノース型立体配置と呼ばれる六員環構造をとっている。これらの糖鎖を構成する代表的な糖とその構造を表 1-1 に示す。

既存の糖鎖は主に 3 つのグループに大別される。すなわち、脂質に結合する糖脂質糖鎖、タンパク質（アスパラギン酸残基）中の窒素原子を解して結合する *N*-型糖鎖、タンパク質（セリンまたはスレオニン）中の酸素原子を解して結合する *O*-型糖鎖である。複合糖質中に存在するこれら糖鎖の機能は多岐に渡る。こうした意味において糖鎖は、酵素やホルモン等の多様な機能を有する分子群と似ているかもしれない。糖鎖の代表的な機能としては、①構造成分の供給、②タンパク質の物性改変、③タンパク質の輸送管理、④細胞接着の仲介および調節、および⑤情報伝達の仲介および調節が挙げられる。

シアル酸 (Sia) は糖鎖の重要な構成分子であり、主に糖タンパク質や糖脂質を含む複合糖質糖鎖の末端部位に結合している (Angata and Varki 2002 ; Vimr et al. 2004 ; Schauer 2004)。シアル酸とは、9 炭糖を骨格とする α -ケト酸の総称であり、これまでに構造的に異なる 50 種類以上の分子種が存在していることが知られている (Angata and Varki 2002)。糖鎖を構成する他の糖のほとんど全てが 5 炭糖および 6 炭糖であるのに対して、シアル酸は炭素数が 9 であることが大きな特徴である。代表的なシアル酸として、*N*-アセチルノイラミン酸 (Neu5Ac)、*N*-グリコリルノイラミン酸 (Neu5Gc)、デアミノノイラミン酸 (KDN)

が挙げられる (図 1)。複合糖質に見出されるこれらシアル酸は、主に $\text{Sia}\alpha 2\text{-3Gal}$ 、 $\text{Sia}\alpha 2\text{-6Gal}$ 、および $\text{Sia}\alpha 2\text{-6GalNAc}$ などの結合様式で存在し、シアル酸どうしが結合した $\text{Sia}\alpha 2\text{-8Sia}$ および $\text{Sia}\alpha 2\text{-9Sia}$ などの結合様式も見られる。これまでにシアル酸の構造と機能との関係を明らかにするために様々な研究が行われ、複合糖質中においてシアル酸を含む糖鎖が、炎症反応や免疫応答、細胞間の認識、ガン化、そしてウイルス感染といった、多くの生物学的現象において重要な役割を果たしている (Varki 1993 ; Gagneux and Varki 1999)。

ウイルス感染はシアル酸を含む複合糖質が関与する生物学的現象の中でよく理解されている現象の一つで、特にインフルエンザウイルスの感染とシアル酸との関係について詳細に研究されている。A 型および B 型ウイルスは、宿主細胞に存在する Neu5Ac を、ウイルスのヘマグルチニン (HA) が認識することにより、 Neu5Ac を有する糖タンパク質および糖脂質を介して宿主細胞の細胞表層の受容体に結合する (Rogers and Paulson 1983)。しかし、インフルエンザウイルスは、受容体中のシアル酸だけでなく、それと結合した次のような糖鎖構造をも認識する。例えば鳥インフルエンザウイルスは $\text{Neu5Ac}\alpha 2\text{-3Gal}\beta 1\text{-3/4GlcNAc}$ 構造を認識し、ヒトインフルエンザウイルスは $\text{Neu5Ac}\alpha 2\text{-6Gal}\beta 1\text{-3/4GlcNAc}$ 構造を認識する (Rogers and Paulson 1983 ; Connor et al. 1994)。この様にインフルエンザウイルスの宿主細胞の特異性は、隣接するガラクトース残基へのシアル酸の結合様式のみならず、シアル酸残基の数および核となる糖鎖構造の数に依存する。インフルエンザウイルスが宿主細胞に感染するためにはウイルスの HA と宿主細胞表層のシアル酸との間の多価相互作用 (multivalent interaction) が必要で、これら相互作用は多数のシアル酸を利用したクラスター効果により増幅されることが示されている (Sigal et al. 1996)。このことからインフルエンザウイルスの感染阻害を目的として、HA を標的としたシアル酸を含む糖鎖を有する様々な合成糖鎖ポリマーが調製されており、これら糖鎖ポリマーはインフルエンザウイルスの宿主細胞受容体への結合を阻害すること

が示されている (Gamin et al. 1991 ; Spaltenstein and Whitesides 1991 ; Sigal et al. 1996 ; Tsuchida et al. 1998 ; Wu et al. 2000 ; Hidari et al. 2008 ; Umemura et al. 2008)。こうした事例ではシアル酸を有するオリゴ糖を大量かつ効率的に調製・供給することは重要な課題の一つとなっている。

生体内におけるシアル酸の重要性を示す、もう一つの例として、動物の体内における糖タンパク質の半減期への影響が挙げられる。シアル酸含有糖鎖で修飾された糖タンパク質からシアル酸を除去すると、生体内での半減期が本来の糖タンパク質と比較して短くなること、また逆に、シアル酸含有糖鎖にシアル酸含有糖鎖を付加的に導入した場合に、本来の糖タンパク質と比べて半減期が長くなることが示されている。具体的には、赤血球の産生を促進するタンパク質である、エリスロポエチン (EPO) では、*N*-結合型糖鎖が 3 箇所存在するが、遺伝子改変によりポリペプチド鎖の糖鎖修飾部位を増加させた改変 EPO では、血中での持続時間が増加することにより、生理活性が持続することが示されている (Elliott et al. 2003)。

このように、シアル酸を有する複合糖質は生物、特に高等動物において重要な役割を担っている。動物における糖鎖へのシアル酸付加は、特異的なシアル酸転移酵素によって行われており (Angata and Varki 2002)、シアル酸転移酵素はシアル酸を有する糖タンパク質、糖脂質、および糖鎖の生合成における鍵酵素であると言える。

シアル酸転移酵素遺伝子はこれまでに、動物組織や細菌、ウイルスを含む様々な起源より単離されている (Taniguchi et al. 2002 ; Yamamoto et al. 2006)。これらシアル酸転移酵素は全て、共通の供与体基質としてシチジン - 5' - モノホスフェート - *N*- アセチルノイラミン酸 (CMP-Neu5Ac) を用いることが知られている。また、植物界からも、ポリペプチド鎖の一次構造における類似性から、シアル酸転移酵素をコードしていると推定される遺伝子がアラビドプシスおよびイネから単離されている (Takashima et al. 2006, Daskalova et al. 2009)。しかし、植物体内においてシアル酸転移酵素活性が直接的に示された報告は

ない。

細菌を起源とするシアル酸転移酵素は、動物由来のシアル酸転移酵素と比較して幅広い受容体基質特異性を有することが報告されている (Izumi and Wong 2001 ; Yamamoto et al. 2006)。海洋性細菌由来の酵素については、大腸菌で発現・精製した組換え酵素を用いた研究から、*Photobacterium damsela* JT0160 株由来の α 2,6-シアル酸転移酵素は糖受容体基質としてラクトース (Gal β 1-4Glc) や N-アセチルラクトサミン (Gal β 1-4GlcNAc) の両方を良い基質とすること (Yamamoto et al. 1996)、また 3'-シアリルラクトース (Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4Glc, 3'-SL) や 2'-フコシルラクトース (Fuc α 1-2Gal β 1-4Glc)、N-アセチルガラクトサミンへも Neu5Ac を転移させることが示されている (Kajihara et al. 1996)。一方 *Photobacterium. phosphoreum* JT-ISH-467 株由来および *Photobacterium* sp. JT-ISH-224 株由来の α 2,3-シアル酸転移酵素は、いずれも糖受容体基質のアノマー選択性が極めて低く、メチル- α -ガラクトピラノシドおよびメチル- β -ガラクトピラノシドにほぼ同程度シアル酸を転移することができる (Tsukamoto et al. 2007、2008)。

これら海洋性細菌由来の酵素に関しては大量生産方法についても幾つか報告されている (Takakura et al. 2007 ; Yamamoto et al. 2007)。また最近では、内在性の該当遺伝子を破壊した大腸菌に、細菌由来のシアル酸転移酵素を含む、Neu5Ac の生合成に関与する数種の遺伝子を導入することにより、シアリルラクトースを醗酵法により大量製造する方法も報告されている (Drouillard et al. 2010)。このように、細菌由来の酵素は様々な種類のシアル酸含有糖鎖を合成するための有用なツールになりうると考えられている。

日本たばこ産業株式会社の糖鎖ビジネスユニットの山本らはこれまでに多数の海洋性細菌を対象としてシアル酸転移酵素活性を有する細菌のスクリーニングを行い、シアル酸転移酵素活性を有する細菌を 20 以上単離してきた (Yamamoto et al. 2006)。これら細菌は rDNA の配列解析から、フォトバクテリウム属あるいは近縁のビブリオ属に分類されることを示した (Yamamoto et al. 2006)。また山本らは予備的にこれら細菌の粗抽出液を用いて、各々の

細菌由来のシアル酸転移酵素活性について大まかな基質特異性スペクトラムを調べ、シアル酸転移酵素の反応様式および受容体基質特異性の違いから、これら細菌を表 1-2 に示す 5 つのグループに分類した (山本私信)。

Photobacterium damsela JT0160 株由来の α 2,6-シアル酸転移酵素 (グループ 1)、*Photobacterium* sp. JT-ISH-224 株由来の α 2,3-あるいは α 2,6-シアル酸転移酵素 (グループ 2) や *Photobacterium leiognathi*. JT-ISH-467 株由来の α 2,3-シアル酸転移酵素 (グループ 3) は幅広い受容体基質特異性を持ち、これらの細菌は、受容体基質特異性が低いシアル酸転移酵素活性を有するグループとして分類された。これら細菌とは異なり、受容体基質特異性が最も高いグループ 5 に分類されたシアル酸転移酵素活性を有する細菌が JT-SHIZ-119 株であった

こうした背景を受け、本研究ではシアル酸転移酵素の受容体基質特異性の検討を基軸の一つとし、*P. damsela* JT0160 株に代表される受容体基質特異性の低い酵素と、受容体基質特異性の高い酵素との違いを明らかにすることを広義の目的とし、タンパク質の立体構造の検討を将来的な視野に入れ、受容体基質特異性の高い酵素例として JT-SHIZ-119 株由来のシアル酸転移酵素 (グループ 5) を、また基質特異性の低い酵素例として *Photobacterium* sp. JT-ISH-224 株由来の α 2,3-シアル酸転移酵素 (グループ 2) を取り上げ、研究を進めるととした。

本博士論文では 2 章として JT-SHIZ-119 株の同定、同株由来シアル酸転移酵素遺伝子のクローニング、組換え酵素タンパク質の諸性質についての解析結果について述べた。3 章では *Photobacterium* sp. JT-ISH-224 株由来に由来する酵素の α 2,3-シアル酸転移について、既知 cDNA より調製した組換え酵素を利用し、酵素タンパク質の諸性質を調べるとともに、基質特異性の低さから導かれる新規シアル酸含有糖鎖の合成の可能性についても言及した。

4 章では海洋性細菌由来のシアル酸転移酵素の将来的な利用を視野に入れ、植物内在性オリゴ糖のシアリル化および植物細胞内でのタンパク質の糖鎖修飾への適用を目指し植物における誘導プロモーターの探索と単離について述べた。

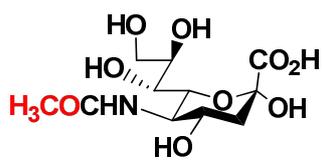
以下、順次報告していく。

表 1-1 糖鎖を構成する主な糖残基

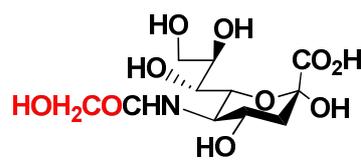
糖	略号	ピラノース構造
グルコース	Glc	
ガラクトース	Gal	
マンノース	Man	
フコース	Fuc	
<i>N</i> -アセチル ノイラミン酸	Neu5Ac	
<i>N</i> -アセチル グルコサミン	GlcNAc	
<i>N</i> -アセチル ガラクトサミン	GalNAc	
<i>N</i> -アセチル マンノサミン	ManNAc	

表 1-2 シアル酸転移酵素の反応様式と受容体基質特異性の違いによる細菌の分類

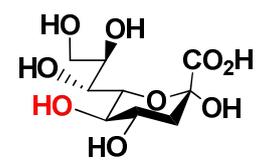
受容体糖鎖構造	海洋性細菌グループ				
	1	2	3	4	5
Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1-6 Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1-3 Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAc-PA	○	○	○	○	○
Neu5Acα2-6Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1-6 Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1-3 Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAc-PA	○	○	○	○	○
Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1-6 Neu5Acα2-6Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1-3 Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAc-PA	×	×	○	○	○
Neu5Acα2-6Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1-6 Neu5Acα2-6Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1-3 Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAc-PA	×	×	×	×	×
Galβ1-4Glc-PA	○	○	○	○	×
GalNAcβ1-4Galβ1-4Glc-PA	○	○	○	○	○
Galβ1-3GalNAcβ1-4Galβ1-4Glc-PA	○	○	○	○	○
Neu5Acα2-3Galβ1-4Glc-PA	○	×	×	×	×
Galα1-4Galβ1-4Glc-PA	×	○	○	×	×



N-アセチルノイラミン酸
(Neu5Ac)



N-グリコリルノイラミン酸
(Neu5Gc)



デアミノノイラミン酸
(KDN)

図 1 代表的なシアル酸の構造

2章 *Photobacterium leiognathi* JT-SHIZ-119 株由来 α 2,6-シアル酸転移酵素の組換え酵素タンパク質の活性特性

Photobacterium sp. JT-ISH-224 株に由来する受容体基質特異性の広い酵素と、他の細菌に由来する受容体基質特異性の狭い酵素との違いを、タンパク質の立体構造から明らかにすることを将来的な目的として、本章では基質特異性の高い酵素活性を有する JT-SHIZ-119 株からシアル酸転移酵素遺伝子のクローニングを行い、組換え酵素タンパク質の諸性質について解析を行った。その結果、JT-SHIZ-119 株は *Photobacterium leiognathi* に分類されることが明らかとなり、この細菌が有するシアル酸転移酵素は β -ガラクトシド α 2,6-シアル酸転移酵素であり、かつ α 2-6 結合したシアル酸に特異的に作用するシアリダーゼ活性をも有することが明らかとなった。本章ではこれら結果について報告する。

2.1 材料と方法

2.1.1 微生物のスクリーニング

マリンアガー2216 (Becton-Dickinson) あるいは 2%塩化ナトリウムを含むニュートリエントアガー (Becton-Dickinson) プレートを用いて、海水、海砂、海草、および魚の表皮を含む様々な分離源より微生物を培養した。分離源からディスポーザブルループを用いてプレーティングを行い、室温で2日~1週間静置して細菌を増殖させた(一次培養)。一次培養で増殖した細菌がコロニーを形成していれば後述の液体培養を行った。一次培養でコロニーを形成しない場合、あるいは外観上複数の細菌が混ざり合ってコロニーを形成していた場合には、一次培養と同じ組成のプレート培地を用いて25°Cで二次培養を行い、増殖させた細菌が単一のコロニーを形成するまで培養を続けた。このようにして分離したプレートより一つのコロニーを取り出して6mlのマリンブロス2216 (Becton-Dickinson) に接種し、15mlチューブ中15°C、25°C、あるいは35°Cで18時間、180rpmで振とう培養を

行った。

2.1.2 シアル酸転移酵素の活性測定

培養液 2~4ml を 5 分間遠心分離 (15000rpm、4 °C) に供し、菌体を回収後、0.2% トライトン X-100 を含む 20mM カコジル酸ナトリウム緩衝液 (pH6.0) 200 μ l に懸濁し、氷中で超音波破碎により溶菌させて粗酵素液を調製し、直ちにシアル酸転移酵素活性の測定を行った。得られた粗酵素液、120mM ラクトース、436Bq のシチジン-5'-モノホスフェート (CMP) -[4,5,6,7,8,9-¹⁴C]-N-アセチルノイラミン酸 (Neu5Ac) を含む 2.3mM のシチジン-5'-モノホスフェート-N-アセチルノイラミン酸 (Amersham Bioscience)、100mM ビスートリス緩衝液 (pH7.0) および 0.5M 塩化ナトリウムから成る 30 μ l の反応液を調製後、山本らの方法 (Yamamoto et al. 1996) に従って酵素反応および測定を行った。1 分間に 1 μ mol の Neu5Ac をラクトースに転移する活性を 1 ユニットとした。

2.1.3 シアリダーゼ活性測定

シアリダーゼ活性は、チオバルビツール法による定量分析および HPLC 法による定性分析の 2 種類の方法で測定を行った。チオバルビツール法では、酵素サンプル、1.3mM の 6'-シアリルラクトース、100mM のカコジル酸ナトリウム緩衝液 (pH6.0)、および 0.5M の塩化ナトリウムから成る 150 μ l の酵素反応液を調製し、35°C で 1~3 時間反応を行った。反応終了後、反応液を水で 500 μ l に希釈し、基質から遊離したシアル酸を、チオバルビツール酸を用いた Aminoff の方法 (Aminoff 1961) により定量した。この方法は、後述するシアリダーゼ活性の pH および温度プロファイルを決定する場合にも用いた。なお、1 分間に 6'-シアリルラクトースから 1 μ mol のシアル酸を遊離する活性を 1 ユニットとした。

HPLC 法では、シアル酸を含む幾つかのピリジルアミノ化糖鎖を基質に用いた。酵素サンプル、1.7mM のピリジルアミノ化糖鎖、100mM のカコジル酸ナトリウム緩衝液 (pH6.0)、

0.5M の塩化ナトリウムから成る 15 μ l の酵素反応液を調製し、35 $^{\circ}$ C で 18.5 時間反応を行った。反応終了後、山本らの方法 (Yamamoto et al. 1996) に従って HPLC による分析を行った。

2.1.4 遺伝子クローニングと DNA 配列の決定

遺伝子クローニングの多くは、Sambrook ら (1989) の方法に基づいて行った。Genomic-tip500/G (Qiagen) を用いて、微生物の細胞塊よりゲノム DNA を調製後、サザンハイブリダイゼーションおよびコロニーハイブリダイゼーションを enhanced chemiluminescence direct labeling and detection system (GE ヘルスケアサイエンス) を用いて添付のマニュアルに従って行った。DNA 配列の決定は、ABI PRISM fluorometric autocycle sequencer (モデル 310 Genetic Analyzer ; Applied Biosystems) を用いてジデオキシ法により行い、両ストランド鎖の配列を決定した。DNA 配列およびアミノ酸配列は、Genetyx バージョン 9.0 (ゼネティクス) により解析を行い、DDBJ および GenBank に対して BLAST 検索を行った。

2.1.5 ハイブリダイゼーションプローブの調製

Carbohydrat-Active enZyme (CAZy) データベース (<http://www.cazy.org/>) 上で、グリコシルトランスフェラーゼファミリー80 (GT80) に分類されている (Coutinho et al. 2003) シアル酸転移酵素間で高度に保存されているアミノ酸配列情報を基に、表 2-1 に示す 2 種類の PCR プライマーを設計・作成した。微生物ゲノム DNA を鋳型に用いて PCR 反応を行い、ハイブリダイゼーションに用いる DNA プローブを合成した。PCR 反応は、300ng の鋳型 DNA、各々 10pmol のプライマー、2.5mM の dNTP、2.5U の *ExTaq* DNA ポリメラーゼ (タカラバイオ)、5 μ l の 10 x *ExTaq* バッファーから成る 50 μ l の反応液を調製し、96 $^{\circ}$ C \cdot 3 分間のホットスタートを行い、96 $^{\circ}$ C \cdot 1 分、55 $^{\circ}$ C \cdot 1 分、および 72 $^{\circ}$ C \cdot 6 分を 1 サイクルとして

30 サイクル実施後、更に 72°C で 6 分間の伸長反応を行った。PCR 反応産物は、pCR4TOPO ベクター (Invitrogen) に添付のプロトコールに従ってクローニングを行い、ハイブリダイゼーション用のプローブとして使用した。

2.1.6 シアル酸転移酵素遺伝子を含む DNA 断片のクローニング

ゲノム DNA を制限酵素で分解後、0.7%アガロースゲルを用いた電気泳動により分画した。シアル酸転移酵素遺伝子を含む DNA 断片は、フェノール抽出、フェノールクロロホルム抽出、およびクロロホルム抽出によりアガロースゲルより回収し、エタノール沈殿で精製を行った。精製した DNA 断片を pUC18 ベクターにサブクローニングし、大腸菌 TB1 株に形質転換後、シアル酸転移酵素をコードする DNA 断片を得るために、コロニーハイブリダイゼーションを行った。

2.1.7 シアル酸転移酵素を発現する発現プラスミドの構築

シアル酸転移酵素遺伝子を増幅するために、表 5-1 に示す 3 種類のプライマー、LSTF1、LSTF2、および LSTR1 プライマーを設計・作成した。LSTF1 および LSTF2 には制限酵素 *Bsp*HI および *Pci*I 認識配列を各々に、LSTR1 には制限酵素 *Bsp*HI および *Bam*HI 認識部位を含ませた。LSTF1 および LSTR1 のプライマー組み合わせで完全長 ORF 領域を含む遺伝子を、LSTF2 および LSTR1 プライマー組み合わせで ORF の N 末端 2 から 15 番目のアミノ酸領域を欠失させた遺伝子を、PCR により増幅した。PCR 反応は、500ng の鋳型ゲノム DNA、各々 50pmol のプライマー、2.5mM の dNTP、2.5 ユニットの *Pyrobest* DNA ポリメラーゼ、および 5 μ l の 10 x *Pyrobest* バッファーII から成る 50 μ l の反応液を調製し、96°C・3 分間のホットスタートを行い、96°C・1 分、55°C・1 分、および 72°C・2 分を 1 サイクルとして 10 サイクル実施後、72°C で 6 分間の伸長反応を行った。PCR 産物は pCR4Blunt TOPO ベクター (Invitrogen) へ、添付の手順書に従ってサブクローニングを行った。サブクロー

ニングした完全長遺伝子の PCR 産物は制限酵素 *Bsp*HI および *Bam*HI で二重消化を、N 末端欠失遺伝子の PCR 産物は制限酵素 *Pci*I および *Bam*HI で二重消化を行い、得られた各々の DNA 断片を発現ベクター pTrc99A の *Nco*I-*Bam*HI 部位に挿入して、発現プラスミド pLST-FL (完全長 ORF の遺伝子カセットを含む) および pLST-ΔN (ORF の N 末端 2 から 15 番目のアミノ酸領域の欠失遺伝子カセットを含む) を得た。そして、これら各々の発現プラスミドを、大腸菌 TB1 株に導入した。

2.1.8 大腸菌中での組換えタンパク質の発現

発現プラスミドを有する大腸菌のシングルコロニーを、100μg/ml のアンピシリンを含む Luria-Bertani 培地 (LB ブロス、Becton-Dickinson) に植菌し、 A_{600} の値が 0.5 に達するまで、30°C で振とう培養を行った。その後、1mM の IPTG を培養液に添加し、更に 30°C で 4 時間培養を行った。培養液 2ml を 2ml の μ チューブに移して 15000rpm、4°C で 5 分間の遠心分離を行い、遠心上清を除去して菌体を回収後、0.3% トライトン X-100 を含む 20mM ビス - トリス緩衝液 (pH6.0) 中に懸濁させて氷中で超音波破碎を行い、その上澄み上清を粗酵素抽出液として実験に供試した。

2.1.9 組換えシアル酸転移酵素タンパク質の精製

pLST-ΔN を有する大腸菌 TB1 を、100μg/ml のアンピシリンを含む 6ml の LB ブロス中、30°C で 8 時間振とう培養を行った。その後、1mM の IPTG および 100μg/ml のアンピシリンを含む 300ml の LB ブロスを種培養液で接種し、同条件で更に 15 時間培養を行った。菌体は 10.8 リットルの培養液から、遠心分離により回収を行った。集めた菌体は、0.3% の トライトン X-100 を含む 1110ml の 20mM ビス - トリス緩衝液 (pH6.0、緩衝液 A) に懸濁後、氷中で超音波破碎を行い溶菌させた。100,000 x g、60 分間の遠心分離により菌体残渣を取り除き、上澄み上清を 0.45μm のセルロースアセテート膜に通してろ過した。ろ液は、緩

緩液 A で平衡化させた HiLoad 26/10 Q Sepharose HP カラム (2.6cm x 10cm、GE ヘルスケアサイエンス) を用いたクロマトグラフィー (ÄKTA、GE ヘルスケアサイエンス) で分画を行った。酵素タンパク質は、緩液 A 中の塩化ナトリウム濃度 0 から 1M の直線濃度勾配で溶出させた。シアル酸転移酵素活性を含む画分をまとめた後、緩液 A で希釈を行い、緩液 A で平衡化させた Mono Q 10/100 GL カラム (1cm x 10cm、GE ヘルスケアサイエンス) にロードした。酵素タンパク質は、緩液 A 中の塩化ナトリウム濃度 0 から 1M の直線濃度勾配で溶出させた。活性画分を集めた後、0.3% トライトン X-100 を含む 20mM のリン酸カリウム緩液 (pH6.0、緩液 B) で希釈を行い、緩液 B で平衡化させたハイドロキシアパタイトカラム (Bio-Scale CHT20-I、1.5cm x 11.3cm、Bio-Rad) に供した。酵素タンパク質は、リン酸カリウム濃度 20 から 500mM の直線濃度勾配で溶出させた。なお、クロマトグラフィーによる精製工程の全ては、4°C で実施した。

2.1.10 酵素反応生成物の決定

シアル酸転移酵素反応により得られた反応生成物を同定するために、ラクトースを糖受容体基質に用いた酵素反応を行い、反応産物を $^1\text{H-NMR}$ 分析に供した。20mg のラクトース、50mg の CMP-Neu5Ac、1 ユニットの精製した N 末端欠失酵素、および 100mM のビス-トリス緩液 (pH6.0) から成る 500 μl の反応液を調製し、35°C で 19 時間反応を行った。反応終了後、合成産物は AG 1-X2 (リン酸フォーム、200–400 メッシュ、Bio-Rad) を用いた陰イオン交換クロマトグラフィーおよび Sephadex G-15 カラム (2.8cm x 74cm、GE ヘルスケアサイエンス) を用いたゲルろ過クロマトグラフィーの組み合わせにより精製を行った。 $^1\text{H-NMR}$ のスペクトルは、重水中 298K で、Bruker AM500 spectrometer (Bruker) を用いて測定した。

2.1.11 タンパク質の定量とポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE)

タンパク質濃度は、Coomassie Protein Assay Reagent (Pierce Chemical) を用いて、ウシ血清アルブミンを標準とする改変 Lowry 法 (Lowry et al. 1951) により測定した。SDS-PAGE は、プレキャストポリアクリルアミドゲル (アトー) および molecular mass standards (Bio-Rad) を用いて行い、ゲルは Coomassie brilliant blue R-250 を用いて染色を行った。

2.1.12 pH および温度プロファイル

至適 pH を決定するにあたり、シアル酸転移酵素活性およびシアリダーゼ活性共に、上述の通り 35°C で 5 分間の測定を行った。ただし、100mM のビス - トリス緩衝液 (pH7.0) の代わりに、100mM の酢酸ナトリウム緩衝液 (pH4.0-5.0)、100mM のカコジル酸ナトリウム緩衝液 (pH5.0-6.0)、100mM のビス - トリス緩衝液 (pH6.0-7.0)、100mM のリン酸緩衝液 (pH7.0-8.0)、100mM の TAPS (*N*-Tris(hydroxymethyl)methyl-3-aminopropanesulfonic acid) 緩衝液 (pH8.0-9.0)、100mM の CHES (*N*-Cyclohexyl-2-aminoethanesulfonic acid) 緩衝液 (pH9.0-10.0)、および 100mM の 3-(cyclohexylamino)-1-propanesulfonic acid (CAPS) 緩衝液 (pH10.0-11.0) を用いた。至適温度については、両酵素活性共に、5、10、15、20、25、30、35、40、および 45°C で測定を行い、シアル酸転移酵素活性については反応時間 5 分間、シアリダーゼ活性については反応時間 15 時間とした。

2.1.13 シアル酸転移酵素の糖受容体基質特異性

糖受容体基質としてメチル- α -D-ガラクトピラノシド (Sigma)、メチル- β -D-ガラクトピラノシド (Sigma)、メチル- α -D-グルコピラノシド (Sigma)、メチル- β -D-グルコピラノシド (Sigma)、メチル- α -D-マンノピラノシド (Fluka)、メチル- β -D-マンノピラノシド (Fluka)、*N*-アセチルガラクトサミン (Sigma)、*N*-アセチルグルコサミン (Sigma)、ラクトース (和光純薬)、Gal-b-1,3-GalNAc (Larodan、スウェーデン)、および *N*-アセチルラクトサミン (生

化学工業) を用いて試験を行った。精製酵素、120mM の受容体基質、436Bq の CMP-[4,5,6,7,8,9-¹⁴C]-Neu5Ac を含む 2.3mM の CMP-Neu5Ac、100mM のカコジル酸ナトリウム緩衝液 (pH6.0)、0.5M の塩化ナトリウム、および 0.03% のトライトン X-100 から成る 30 μ l の反応液を調製し、上述のシアル酸転移酵素アッセイと同条件で反応を行った。

2.2 結果

2.2.1 *Photobacterium leiognathi* JT-SHIZ-119 株からの β - ガラクトシド α 2,6-シアル酸転移酵素遺伝子のクローニングと組換え酵素タンパク質の諸性質

2.2.1.1 JT-SHIZ-119 株の同定

シアル酸転移酵素活性を有する JT-SHIZ-119 はイカの体表から分離された菌株である (山本ら未発表)。この細菌の 16S rRNA 遺伝子の部分 DNA 配列を解析した結果、本細菌は *Photobacterium* 属に分類され、*Photobacterium leiognathi* の塩基配列と 99.5% の相同性を示した。この結果から、JT-SHIZ-119 株を *P. leiognathi* として同定した。

2.2.1.2 シアル酸転移酵素遺伝子ホモログの存在の確認

これまでに、*Photobacterium damsela* JT0160 株 (Yamamoto et al. 1998)、*Photobacterium phosphoreum* JT-ISH-467 株 (Tsukamoto et al. 2007)、*Photobacterium leiognathi* JT-SHIZ-145 株 (Yamamoto et al. 2007)、*Photobacterium* 属 JT-ISH-224 株 (Tsukamoto et al. 2008)、および *Vibrio* 属 JT-FAJ-16 株 (Takakura et al. 2007) から、シアル酸転移酵素遺伝子のクローニングが行われ、それらの遺伝子配列が明らかにされている。そこで、これらの塩基配列情報を基に、JT-SHIZ-119 株のゲノム中にこれまでに単離されている遺伝子のホモログが存在するかを調べるため、GT80 ファミリーで高度に保存されている配列 600bp 由来の

DNA 断片を用いたサザンブロット分析を行った。その結果、制限酵素 *SphI* を用いて切断した 3.4kb 長の JT-SHIZ-119 の DNA 断片とハイブリダイズし (図 2-1)、シアル酸転移酵素遺伝子のホモログが JT-SHIZ-119 ゲノム中に存在することが示された。

2.2.1.3 シアル酸転移酵素遺伝子ホモログのクローニングと発現

2.1.2 で得られた 3.4kb 長の *SphI* 断片を汎用クローニングベクターである pUC18 にサブクローニングして DNA 配列を決定したところ、1436bp から成るオープンリーディングフレーム (ORF) が含まれており、511 アミノ酸残基から成るタンパク質 (アクセッション番号 : AB500947) をコードしていた (図 2-2)。

ORF 領域の DNA 配列は、*P. damselae* JT0160 株由来の α 2,6-シアル酸転移酵素遺伝子 (アクセッション番号 : AB012285) と 68%、*P. leiognathi* JT-SHIZ-145 株由来の α 2,6-シアル酸転移酵素遺伝子 (アクセッション番号 : AB306315) と 96%、そして *Photobacterium* sp. JT-ISH-224 株由来の α 2,6-シアル酸転移酵素遺伝子 (アクセッション番号 : AB293985) と 64%の相同性を有していた。推定アミノ酸配列では、*P. damselae* JT0160 株由来の α 2,6-シアル酸転移酵素と 66%、*P. leiognathi* JT-SHIZ-145 株由来の α 2,6-シアル酸転移酵素と 95%、そして *Photobacterium* sp. JT-ISH-224 株由来の α 2,6-シアル酸転移酵素と 55%の相同性であった。Genetyx を用いた配列解析からは、これら以外のシアル酸転移酵素とは顕著な相同性を示さなかった。幾つかの細菌由来の α 2,6-シアル酸転移酵素間のマルチプルアライメント結果を図 2-2 に示す。アミノ酸配列の比較に用いたシアル酸転移酵素中には、CMP 結合部位を構成する繰り返しモチーフが保存されており、YDDGF モチーフや FKGHP モチーフ、SS モチーフが含まれているが、これらモチーフもまた、JT-SHIZ-119 株由来の遺伝子において推定されるアミノ酸配列中に保存されていた。

完全長 ORF の遺伝子カセットを有する発現プラスミド pLST-FL および ORF の 2 番目のリジンから 15 番目のアラニンまでを欠失させた遺伝子カセットを有する発現プラス

ミド pLST-ΔN を構築し、大腸菌で発現させたところ、IPTG 処理を行った兩大腸菌から調製した粗酵素抽出液は、いずれもシアル酸転移酵素活性を示した。そのシアル酸転移酵素活性は、pLST-ΔN を有する方が pLST-FL を有する方よりも高く、培養液 1 リットルあたり 1477U の活性を示した。

2.2.1.4 組換えシアル酸転移酵素の精製

単位培養液あたりの酵素活性が高い pLST-ΔN プラスミドを有する大腸菌を用いて酵素タンパク質を発現させ、3段階のカラムクロマトグラフィーにより精製を行ったところ、粗酵素液からの収率 53.2%で、15.2 倍に精製することができた (表 2-2)。この精製酵素 rLST-ΔN の比活性は 82.9U/mg であり、SDS-PAGE 上で約 55kDa の分子量を示す単一バンドとして検出することができた (図 2-3)。

2.2.1.5 酵素反応産物の ¹H-NMR 分析

ラクトースを受容体基質として、rLST-ΔN を用いて反応を行い、陰イオン交換クロマトグラフィーおよびゲルろ過クロマトグラフィーにより、反応産物を精製した。この精製方法により、合成反応に使用したラクトース 20mg から 33.7mg の精製産物が得られ、収率は 95.8%であった。精製した反応産物の ¹H-NMR 測定を行い、得られたスペクトル (図 2-4) を解析したところ、その化学シフト値は、δ5.20 (d, 0.4 H, J=3.5 Hz, Glc α H-1)、δ4.67 (d, 0.6 H, J=8.0 Hz, Glc β H-1)、δ4.42 (d, 1 H, J=7.8 Hz, Gal H-1)、δ3.32 (dd ; 0.6 H; J=8.4 Hz, 8.4 Hz ; Glc β H-2)、δ2.71 (dd ; 1 H ; J=4.5 Hz, 12.35 Hz ; Neu5Ac H-3 eq)、δ2.01 (s, 3 H, Ac)、およびδ1.73 (dd ; 1 H ; J=12.3 Hz, 12.3 Hz ; Neu5Ac H-3 ax)であった。これら化学シフト値は、既報の 6'-シアリルラクトースの化学シフト値とよく一致していた (Yamamoto et al. 1998) 。

2.2.1.6 α 2,6-シアル酸転移酵素活性の特徴

rLST- Δ N は pH5.0 および 35°C で最大活性を示した (図 2-5)。また、その活性は、300 から 800mM の塩化ナトリウム存在下で、約 40% 上昇した (図 2-6)。糖受容体基質特異性の解析によると、メチル- α -D-ガラクトピラノシド、メチル- β -D-ガラクトピラノシド、メチル- α -D-グルコピラノシド、メチル- β -D-グルコピラノシド、メチル- α -D-マンノピラノシド、メチル- β -D-マンノピラノシド、*N*-アセチルガラクトサミン、および *N*-アセチルグルコサミンの中ではメチル- β -D-ガラクトピラノシドが最も良い基質となり、 β -アノマーの方がより良い基質であった。さらに、ラクトースや *N*-アセチルラクトサミンといった二糖の方が、メチル- β -D-ガラクトピラノシドと比較して、より良い受容体基質であった (表 2-3)。rLST- Δ N の見かけ上の K_m 値は、CMP-Neu5Ac については 0.3mM、ラクトースおよび *N*-アセチルラクトサミンについては、各々 17.2mM および 15.4mM であった。

2.2.2 組換え酵素タンパク質のシアリダーゼ活性と特異性

rLST- Δ N はまた、シアリダーゼ活性を示し、pH6.0 で 35°C の場合に最大活性を示した (図 2-7)。そして、この条件化におけるシアリダーゼの比活性は、103 μ U/mg であった。シアリダーゼ活性の特異性を確かめるために、表 2-4 に示すピリジルアミノ化糖鎖を用いた HPLC 分析を行ったところ、Neu5Ac α 2-6Gal 結合を有するシアロシドを用いた場合にのみ、この酵素のシアリダーゼ活性が観察された (図 2-8)。

2.3 考察

Photobacterium leiognathi と同定した海洋性細菌 JT-SHIZ-119 株から、新規なシアル酸転移酵素を発見した。クローニングしたシアル酸転移酵素遺伝子の配列より推定したア

ミノ酸配列の N 末端側 14 アミノ酸残基から成る疎水性領域は、シグナルペプチドであると推察された。また、大腸菌で発現・精製した組換えシアル酸転移酵素 rLST- Δ N が、 α 2,6-シアル酸転移酵素活性および α 2,6-結合特異的なシアリダーゼ活性を示すことを見出した。この知見は、 α 2,6-シアル酸転移酵素が 2 種類の酵素活性を示す最初の報告である。なお、最近カリフォルニア大学デービスのグループが *Photobacterium damsela* 由来の組換え α 2,6-シアル酸転移酵素 (Δ 15Pd2,6ST) が、 α 2,6-結合特異的なシアリダーゼ活性および α 2,6-結合特異的なトランスシアリダーゼ活性を示すこと報告した (Cheng et al. 2009)。一方、山本らが単離した *P. damsela* JT0160 株由来の組換え α 2,6-シアル酸転移酵素 pda-rec N2C1 ではシアリダーゼ活性は検出されていない (山本私信)。なお、2.3.2 の項で詳述するように、現在、これらのシアル酸転移酵素は各々の活性の特性から、Carbohydrate-Active enZyme database (CAZy、<http://www.cazy.org/>) (Campbell 1997、Coutinho 2003) のグリコシルトランスフェラーゼファミリー 80 (GT80) 中では異なるサブグループに分類される。GT80 に分類されるシアル酸転移酵素のうち、幾つかについてはそれらの結晶構造が明らかにされており、海洋性細菌由来のシアル酸転移酵素ではそれらの活性中心近傍に存在する Asp 残基が塩基触媒として、また His 残基が酸触媒として機能する可能性があることが報告されている (Kakuta 2007、Yamamoto 2008、Iwatani 2009)。更に *Photobacterium* sp. JT-ISH-224 由来の α 2,3-シアル酸転移酵素の場合、この Asp 残基を部位特異的変異導入により他のアミノ酸に置換した変異酵素では酵素活性が減少する (山本私信)。GT80 に分類されるシアル酸転移酵素間の活性中心近傍のアミノ酸配列は高度に保存されているが完全には一致してないことおよび上述の知見から、各酵素間で活性特性が異なることについては活性中心におけるアミノ酸組成の違いが原因の一つと考えられる。

2.3.1 シアル酸転移酵素の糖供与体および受容体基質認識機構

精製酵素の速度論解析から、rLST- ΔN の CMP-Neu5Ac に対する見かけ上の K_m 値 (0.3 mM) は、pda-recN2C1 の K_m 値 (0.32 mM、Yamamoto et al. 1996) とほぼ同じであった。さらに、rLST- ΔN の糖受容体基質に対する特異性もまた、pda-recN2C1 の特異性と類似していた。すなわち、単糖ではメチル- β -D-ガラクトピラノシドを、二糖ではラクトースおよび *N*-アセチルラクトサミンを最良の受容体基質とした。ところで動物由来の α 2,6-シアル酸転移酵素では、例えばラット肝臓由来の酵素は、ラクトースに対する見かけの K_m 値は 129 mM であり *N*-アセチルラクトサミンに対する見かけの K_m 値は 1.62 mM であり、ラクトースよりも *N*-アセチルラクトサミンの方が良い基質であることが報告されている (Weinstein et al. 1982)。このことから、rLST- ΔN の非還元末端の認識が、動物由来の酵素ほど厳密ではないことを示している。また、これらの結果は、rLST- ΔN は *N*-アセチルグルコサミン残基に存在する 2-アセトアミド基を認識していないことを示している (図 2-9)。従って、rLST- ΔN は動物由来の酵素と比較して、より多様なシアル酸含有糖鎖を合成するために有用であると考えられる。

2.3.2 Carbohydrat-Active enZyme (CAZ y) データベースでの分類

CAZ y データベース (<http://www.cazy.org/>) には、タンパク質の配列類似性に基づいて糖質関連酵素が分類されており、細菌由来の α 2,3-および α 2,6-シアル酸転移酵素はグリコシルトランスフェラーゼ・ファミリー80 (GT80) に分類されている。CAZy データベース中の GT80 には、2010 年 8 月の時点で 12 のシアル酸転移酵素が含まれている。これら 12 のシアル酸転移酵素の中で、8 つのシアル酸転移酵素は、その酵素活性に基づき、更に 3 つのサブグループに分類することができる。サブグループ 1 は、*Pasteurella. multocida* P-1059 株からクローニングされた多機能性 α 2,3-シアル酸転移酵素 (Yu et al. 2005) である。この酵素は、 α 2,3-シアル酸転移酵素、 α 2,6-シアル酸転移酵素、シアリダーゼ、およびトランス - シアリダーゼの 4 つの活性を示す。サブグループ 2 は、*P. phosphoreum*

JT-ISH-467 株、*Photobacterium* sp. JT-ISH-224 株、そして *Vibrio* sp. JT-FAJ-16 株からクローニングされた α 2,3-シアル酸転移酵素から成る。これら酵素は、 α 2,3-シアル酸転移酵素活性ならびに非常に弱いシアリダーゼ活性を示す。サブグループ 3 は、*P. leiognathi* JT-SHIZ-145 株および *Photobacterium* sp. JT-ISH-224 株よりクローニングされた α 2,6-シアル酸転移酵素から成り、これらの酵素は α 2,6-シアル酸転移酵素活性のみを示す。本研究によりクローニングされた *P. leiognathi* JT-SHIZ-1195 株由来の rLST- Δ N は、糖供与体および受容体基質に対する特異性等の酵素学的性質においてサブグループ 3 に属する *P. leiognathi* JT-SHIZ-145 株および *Photobacterium* sp. JT-ISH-224 株よりクローニングされた α 2,6-シアル酸転移酵素の諸性質に関して類似する点が多いものの、シアル酸転移酵素活性および非還元末端において α 2,6-結合しているシアル酸に特異的なシアリダーゼの両活性を示すことから、サブグループ 3 とは異なることが示された。考察の冒頭で述べたように、最近アメリカのグループにより *P. damsela* の別株由来の α 2,6-シアル酸転移酵素に関する報告があり、その N 末端欠損組換え酵素 (Δ 15Pd2,6ST) が、シアル酸転移酵素、シアリダーゼ、およびトランス-シアリダーゼの 3 つの活性を示す結果を報告している (Cheng et al. 2009)。従って、*P. leiognathi* JT-SHIZ-119 株および *P. damsela* 由来のシアル酸転移酵素は、多機能性 α 2,6-シアル酸転移酵素として、GT80 の新規な 4 番目のサブグループとして分類できると考えている。

2.3.3 シアリダーゼ活性の特異性

シアル酸を有するピリジルアミノ化糖鎖を基質に用いた HPLC 分析から、rLST- Δ N が示すシアリダーゼ活性は、Neu5Aca2-3Gal 結合および Neu5Aca2-8Neu5Ac 結合を有する基質には作用せず、Neu5Aca2-6Gal 結合を有する基質を用いた場合にのみ作用した。これらの結果は、このシアリダーゼ活性は Neu5Aca2-6Gal 結合に対して特異的であることを示唆しており、複合糖質糖鎖中の α 2,6-結合しているシアル酸の機能を解明する上で、

例えば、シアル酸を有する複合糖質糖鎖から α 2,6-結合しているシアル酸のみの除去およびそれに続いて α 2,3-シアル酸転移酵素を作用させて α 2,3-結合しているシアル酸に置換する場面において有用なツールになると考えている。

2.3.4 シアル酸含有糖鎖合成への適用

rLST- Δ N は、シアル酸転移酵素およびシアリダーゼの両活性を示すが、各々の比活性は 82.9U/mg および 103 μ U/mg であった。シアル酸転移酵素活性と比較してシアリダーゼ活性は約 1×10^{-6} 程度である。このことから、本酵素のシアリダーゼ活性は、本酵素をシアル酸含有糖鎖合成に用いても影響は非常に少ないと考えられる。小スケールの予備実験で実際に本精製酵素を用いてラクトースから 6'-シアリルラクトースを合成した場合、6'-シアリルラクトースを 90%以上の高収率で単離できることを確認している（未発表データ）。

表 2-1 PCR および塩基配列の決定で使用した DNA プライマー

Name	Sequence*
pp688F	5'-TAYGATGATGGTTCW-3'
pp1311R	5'-YGTTCATCATCAANACYTCAAATGA-3'
sp412F	5'-GAGTATTCACAGAATGAGCG-3'
sp521F	5'-CACAAGAACTTGTAGATGCA-3'
sp325F	5'-GTTGTTGCCCAACACTAGA-3'
sp640F	5'-CTAGGTAGAGAGCATGATCT-3'
sp671F	5'-GTCATCCAAGAGGAGGAATT-3'
LSTF1	5'-GCGCGTCATGAAAAGAATATTTTGTTTAGTCTCTGC-3'
LSTR1	5'-ATTAAGGATCCCTAATATTGAGCAATACAC-3'
LSTF2	5'-GGGACATGTGTAATGATAATCAGAATACAG-3'

* W ; A あるいは T, Y ; C あるいは T

表 2-2 N 末端を欠失させた組み換え α 2,6-シアル酸転移酵素の精製表

段階	容量 (ml)	総タンパク質量 (mg)	総活性 (U)	比活性 (U/mg)	収率 (%)	精製度 (fold)
Crude extract	370	850.0	4646.4	5.5	100.0	1.0
Q-sepharose	30	84.3	3001.6	35.6	64.6	6.5
Mono-Q	13	63.8	2308.3	36.2	49.7	6.6
Hydroxyapatite	16	29.8	2471.3	82.9	53.2	15.2

表 2-3 単糖および二糖へのシアル酸転移

受容体基質	Neu5Ac 転移 (nmol/min)	相対活性 (%)
Methyl- α -D-galactopyranoside	0.04	1
Methyl- β -D-galactopyranoside	1.10	38
Methyl- α -D-glucopyranoside	<0.01	-
Methyl- β -D-glucopyranoside	<0.01	-
Methyl- α -D-mannopyranoside	<0.01	-
Methyl- β -D-mannopyranoside	0.04	1
N-Acetylgalactosamine	0.29	10
N-Acetylglucosamine	<0.01	-
Lactose (Gal- β -1,4-Glc)	2.88	100
N-Acetyllactosamine (Gal- β -1,4-GlcNAc)	2.96	103
Gal- β 1,3-GalNAc	1.68	58

表 2-4 シアリダーゼ活性測定に用いたピリジルアミノ化糖鎖

Linkage type	Structure	Abbreviation name
α 2,3	Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4Glc-PA	PA1
	Gal β 1-4Glc-PA	PA2
α 2,6	Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1-6 Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1-3 Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc-PA	PA3
	Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1-6 Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1-3 Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc-PA	PA4
	Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1-6 Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1-3 Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc-PA	PA5
	Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1-6 Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1-3 Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc-PA	PA6
α 2,8	Gal β 1-3GalNAc β 1-4 Neu5Ac α 2-8Neu5Ac α 2-3 Gal β 1-4Glc-PA	PA7
	Gal β 1-3GalNAc β 1-4 Neu5Ac α 2-3 Gal β 1-4Glc-PA	PA8
	Gal β 1-3GalNAc β 1-4Gal β 1-4Glc-PA	PA9

E H B K N Ps Pv S PC



図 2-1 サザンブロット分析による *P. leiognathi* JT-SHIZ-119 ゲノム中のシアル酸転移酵素遺伝子ホモログの確認

pp688F および pp1311R をプライマーとして、*P. leiognathi* JT-SHIZ-119 株より調製したゲノム DNA を鋳型にして PCR 増幅させた断片をプローブに用いたゲノミックサザンハイブリダイゼーション。ゲノム DNA を制限酵素で処理後、0.7%アガロースゲルで分画し、ニトロセルロース膜へ転写を行った。標識プローブの調製およびハイブリダイゼーションの条件は、enhanced chemiluminescence direct labeling and detection system (GEヘルスケアサイエンス) に添付のマニュアルに従って実施した。E、*EcoRI* ; H、*HindIII* ; B、*BglII* ; K、*KpnI* ; N、*NdeI* ; Ps、*PstI* ; Pv、*PvuI* ; S、*SphI* ; PC、ポジティブコントロール。

SHIZ119-2, 6ST	1	MKRLEFCVSAFLLSACN-DNQNTVDVVSTVNDVIEENNYQVKPIDTP-TTFDSYSWQTCGTP-ILKDDERKSLSFDFVAPELDQDEK	87
SHIZ145-2, 6ST	1	MKRLEFCVSAFLLSACN-DNQNTVDVVSTVNDVIEENNYQVKPIDTP-TTFDSYSWQTCGTP-ILKDDERKSLSFDFVAPELDQDEK	87
PD-2, 6ST	1	MKRLEFCVSAFLLSACN-SDNTSLKETVSSNSADVETETTYQLTPIDAP-SSFLSSSWQTCGTP-ILNESDKQATISFDFVAPELDQDEK	87
ISH224-2, 6ST	1	---MKRLEFCVSAFLLSACN-SDNTSLKETVSSNSADVETETTYQLTPIDAP-SSFLSSSWQTCGTP-ILNESDKQATISFDFVAPELDQDEK	89
PM-2, 3 (6) ST	1	---MKRRLRLNFKLFFIIFSS-----LFTLSWSK-----	26
SHIZ119-2, 6ST	88	FCRFEFSGVD-CRRYVTCNLTVVAPTLEVVVDHASLPSLQQLMKTIQCKNEYSCNERFISWGRIRLLEDNAEKLNAHYPLAGNNTSCE	176
SHIZ145-2, 6ST	88	FCRFEFSGVD-CRRYVTCNLTVVAPTLEVVVDHASLPSLQQLMKTIQCKNEYSCNERFISWGRIRLLEDNAEKLNAHYPLAGNNTSCE	176
PD-2, 6ST	88	YCFEFGGITG-DHRYITNLTVVAPTLEVVVDHASLPSLQQLMKTIQCKNEYSCNERFISWGRIRLLEDNAEKLNAHYPLAGNNTSCE	176
ISH224-2, 6ST	90	YCFDENVSNSKSEYDITKVTLLVVAHSLLEVYVDHASLPTLQQLMKTIQCKNEYSCNERFISWGRIRLLEDNAEKLNAHYPLAGNNTSCE	179
PM-2, 3 (6) ST	27	---HTITMLDASLPAALNQLMDFTC-NNEDEKTHFRIFGLSFKFKIPDNIITQYQNIHFVELKDNRPTE	89
SHIZ119-2, 6ST	177	LVDVAVIDYADSKNRLNELNTNTAHSFNLAPIIR-IISKSNILISNINLYDDGSAEYVNLNWKDTEDEKSLKSDSFLVLDKDYENG-H	264
SHIZ145-2, 6ST	177	LVDVAVIDYADSKNRLNELNTNTAHSFNLAPIIR-ATSSKSNILISNINLYDDGSAEYVNLNWKDTEDEKSLKSDSFLVLDKDYENG-H	264
PD-2, 6ST	177	LVRAIDYADSKNRLNELNTNTAHSFNLAPIIR-ATSSKSNILISNINLYDDGSAEYVNLNWKDTEDEKSLKSDSFLVLDKDYENG-H	264
ISH224-2, 6ST	180	LVDVAVIDYADSKNRLNELNTNTAHSFNLAPIIR-ELNSFNVVTNIDLYDDGSAEYVNLNWKDTEDEKSLKSDSFLVLDKDYENG-H	267
PM-2, 3 (6) ST	90	ALFTTLLDYPGNIELNLELN--IAHSVQLIRPILAYRFKHLDRVSTQQLNLYDDGSAEYVNLNWKDTEDEKSLKSDSFLVLDKDYENG-H	177
SHIZ119-2, 6ST	265	SSKEF-SSELYGRYNNWQLYNTSYFPLRKYDYLTVPEQLHDLREYLGSSLKQMSWDFESQLSGDKELFNLIVGFDCEKLOQEQYQSSPLPNF	353
SHIZ145-2, 6ST	265	SSKEF-NGIYSIYNWQLYNTSYFPLRKYDYLTVPEQLHDLREYLGSSLKQMSWDFESQLSGDKELFNLIVGFDCEKLOQEQYQSSPLPNF	353
PD-2, 6ST	265	SSKEF-KCMGNRYNNWQLYNTSYFPLRKYDYLTVPEQLHDLREYLGSSLKQMSWDFESQLSGDKELFNLIVGFDCEKLOQEQYQSSPLPNF	353
ISH224-2, 6ST	268	NEETSNTTSSVYNNWQLYNTSYFPLRKYDYLTVPEQLHDLREYLGSSLKQMSWDFESQLSGDKELFNLIVGFDCEKLOQEQYQSSPLPNF	357
PM-2, 3 (6) ST	178	KFNA---TIARYVQSAPFVRYEFLSTDYFEKAEFLQFLREYLAENYQRDMTAYQQLTPPQAFYLLVGFENDEVKSLVLEQ---AKH	262
SHIZ119-2, 6ST	354	VFTGTTTWAGG-ETKEYYAQQQVNVNNAINETSPPYLGREDLFFKGHPRGGIINDIILGSFNMMIDIPAKVSFEVLMMTGMLPDTVGG	442
SHIZ145-2, 6ST	354	VFTGTTTWAGG-ETKEYYAQQQVNVNNAINETSPPYLGREDLFFKGHPRGGIINDIILGSFNMMIDIPAKVSFEVLMMTGMLPDTVGG	442
PD-2, 6ST	354	VFTGTTTWAGG-ETKEYYAQQQVNVNNAINETSPPYLGREDLFFKGHPRGGIINDIILGSFNMMIDIPAKVSFEVLMMTGMLPDTVGG	442
ISH224-2, 6ST	358	VFTGTTTWAGG-HEREYVAQQQVNVNNAINETSPPYLGREDLFFKGHPRGGIINDIILGSFNMMIDIPAKVSFEVLMMTGMLPDTVGG	446
PM-2, 3 (6) ST	263	VFTGTTTWAGG-ETKEYYAQQQVNVNNAINETSPPYLGREDLFFKGHPRGGIINDIILGSFNMMIDIPAKVSFEVLMMTGMLPDTVGG	352
SHIZ119-2, 6ST	443	IASSLYFSIPAERKVSFIVFTSSDTITDREDALKSPLVQVMTLGIVKEKDVLFWFDLPDCSSGVCIAQY-----	511
SHIZ145-2, 6ST	443	IASSLYFSIPAERKVSFIVFTSSDTITDREDALKSPLVQVMTLGIVKEKDVLFWFDLPDCSSGVCIAQY-----	497
PD-2, 6ST	443	IASSLYFSIPAERKVSFIVFTSSDTITDREDALKSPLVQVMTLGIVKEKDVLFWFDLPDCSSGVCIAQY-----	532
ISH224-2, 6ST	447	IASSLYFSIPAERKVSFIVFTSSDTITDREDALKSPLVQVMTLGIVKEKDVLFWFDLPDCSSGVCIAQY-----	514
PM-2, 3 (6) ST	353	VASSLYFSEFEKISSEIFTSNKQVKSREDALNDFKVRVRRLEGLTDSQVFWDSLKQL-----	412
SHIZ119-2, 6ST	511	-----	511
SHIZ145-2, 6ST	497	-----	497
PD-2, 6ST	533	IKTITDLERIGDVAESIAKVALESFNSKQYNNLVLSLESLGQHTVRMLHEVLDAFARMVKAALIEVYQEDDRIDQEYESIVRQLMAHMMED	622
ISH224-2, 6ST	514	-----	514
PM-2, 3 (6) ST	412	-----	412
SHIZ119-2, 6ST	511	-----	511
SHIZ145-2, 6ST	497	-----	497
PD-2, 6ST	623	PSSIPNVMKVMWAARSIERVGDRCQNICIYIYFVKKDVRRHTKDDPDTMLD	675
ISH224-2, 6ST	514	-----	514
PM-2, 3 (6) ST	412	-----	412

図 2-2 *P. leiognathi* JT-SHIZ-119 株由来のシアル酸転移酵素のアミノ酸配列および GT80 に属する細菌由来の α 2,6-シアル酸転移酵素活性を示すシアル酸転移酵素のアミノ酸配列間のマルチプルアライメント

P. damsela 由来 α 2,6-シアル酸転移酵素 (PD-2,6ST、Protein ID BAA25316)、*Photobacterium* sp. JT-ISH-224 株由来 α 2,6-シアル酸転移酵素 (ISH224-2,6ST、Protein ID BAF02026)、*P. leiognathi* JT-SHIZ-145 株由来 α 2,6-シアル酸転移酵素 (SHIZ145-2,6ST、Protein ID BAF91416)、*Pasteurella multocida* 由来シアル酸転移酵素 (PM-2,3(6)ST、Protein ID AAY89061)、および *P. leiognathi* JT-SHIZ-119 株由来 α 2,6-シアル酸転移酵素 (SHIZ119-2,6ST、Protein ID BAI49484) のアミノ酸配列を Genetyx ソフトウェアを用いてアライメントした。各シアル酸転移酵素間で保存されているアミノ酸配列を黒枠で囲んだ。赤下線は YDDGS モチーフ、FKGHP モチーフ、および SS モチーフを示す。

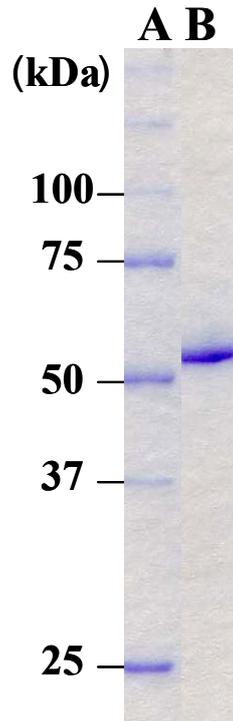


図 2-3 *P. leiognathi* JT-SHIZ-119 株由来の精製組み換えシアル酸転移酵素の SDS-PAGE 分析

3 段階のクロマトグラフィーにより精製した酵素タンパク質について 12.5%アクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE に供試後、Coomassie brilliant blue 染色を行った。A ; 分子量マーカ、B ; 精製した酵素タンパク質

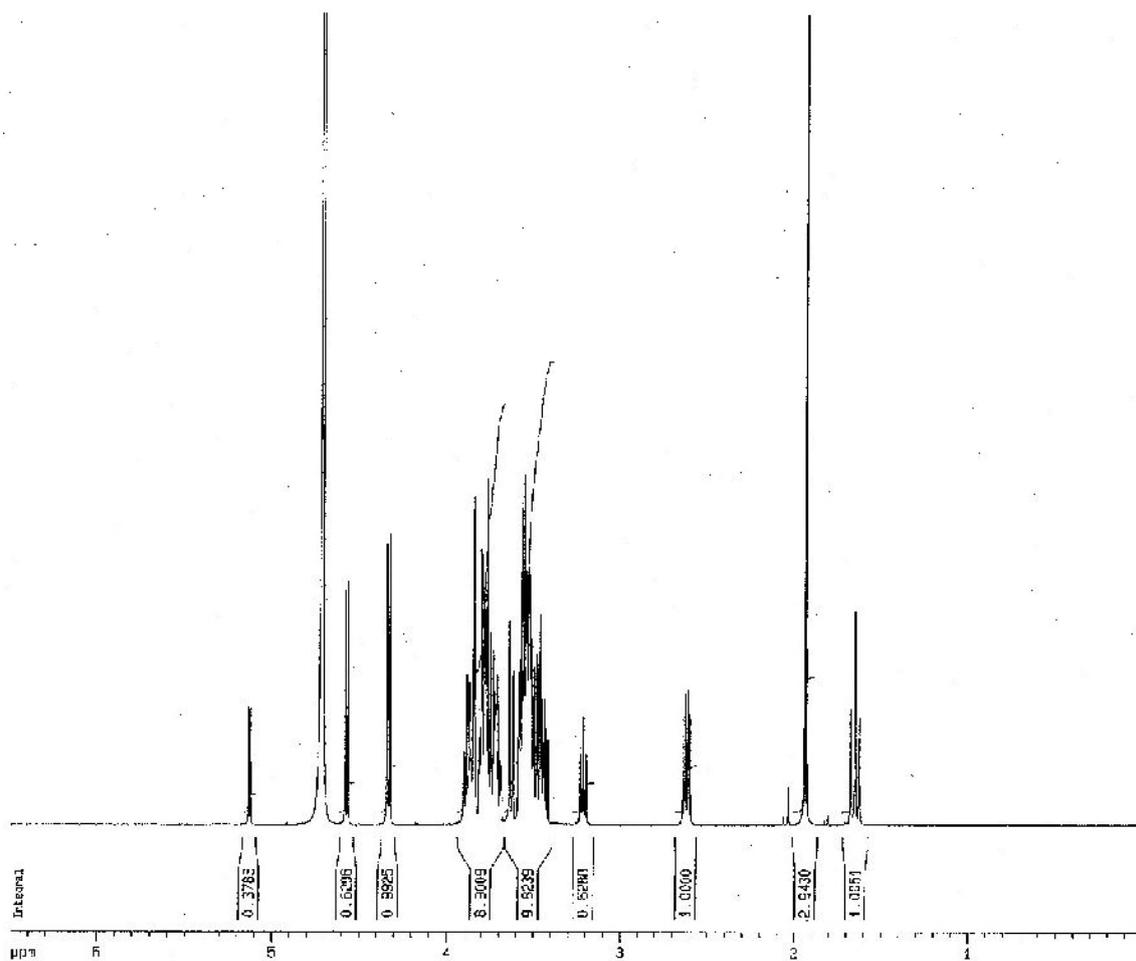


図 2-4 ラクトースを糖受容体基質として組み換え酵素を用いて得られた反応産物の¹H-NMR スペクトル

反応産物を精製後、D₂O に溶解して Bruker AM500 spectrometer を用いて 298K で測定を行った。

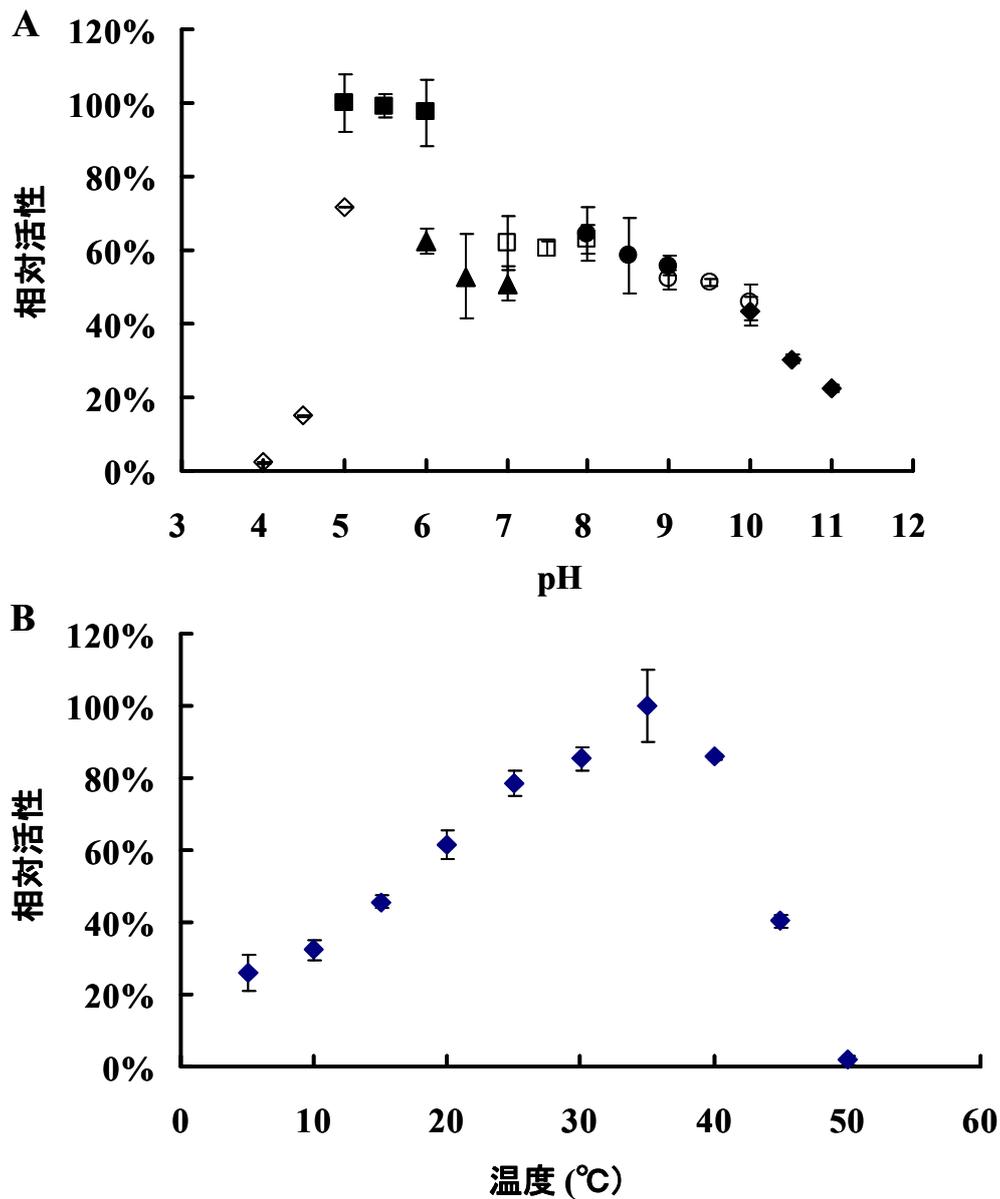


図 2-5 *P. leiognathi* JT-SHIZ-119 株由来の組み換えシアル酸転移酵素の活性に及ぼす pH および温度の影響

酵素活性は、最大活性に対する相対値で示す。酵素反応条件は、材料と方法の項で記載の通りに行った。各点は 3 反復の平均値を表し、標準誤差をエラーバーで示した。(A) 35°C でのシアル酸転移酵素活性に及ぼす pH の影響。◇、100mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH4.0～5.0)；■、100mM カコジル酸ナトリウム緩衝液 (pH5.0～6.0)；▲、100mM ビス - トリス緩衝液 (pH6.0～7.0)；□、100mM リン酸緩衝液 (pH7.0～8.0)；●、100mM TAPS (*N*-Tris(hydroxymethyl)methyl-3-aminopropanesulfonic acid) 緩衝液 (pH8.0～9.0)；○、100mM CHES (*N*-Cyclohexyl-2-aminoethanesulfonic acid) 緩衝液 (pH9.0～10.0)；◆、100mM CAPS (3-(cyclohexylamino)-1-propanesulfonic acid) 緩衝液 (pH10.0～11.0)。(B) pH6.0 でのシアル酸転移酵素活性に及ぼす温度の影響。

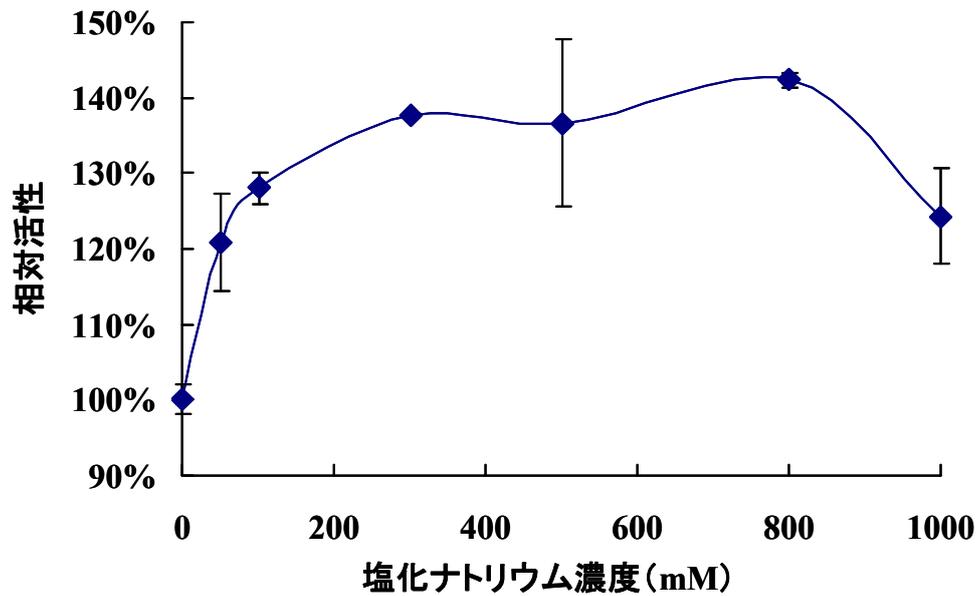


図 2-6 *P. leiognathi* JT-SHIZ-119 株由来の組み換えシアル酸転移酵素の活性に及ぼす NaCl 濃度の影響

精製酵素 0.77mU、120mM ラクトース、436Bq の CMP-Neu5Ac を含む 2.3mM の CMP-Neu5Ac、100mM カコジル酸ナトリウム緩衝液 (pH6.0) および塩化ナトリウムを 0、50、100、300、500、800、あるいは 1000mM 含む反応液 30 μ l を調製し、35 $^{\circ}$ C で 5 分間反応を行った。酵素活性は、塩化ナトリウムを含まない場合の活性を 100%とした、相対活性で表した。各プロットは反応 2 反復の平均で、誤差をエラーバーで示した。

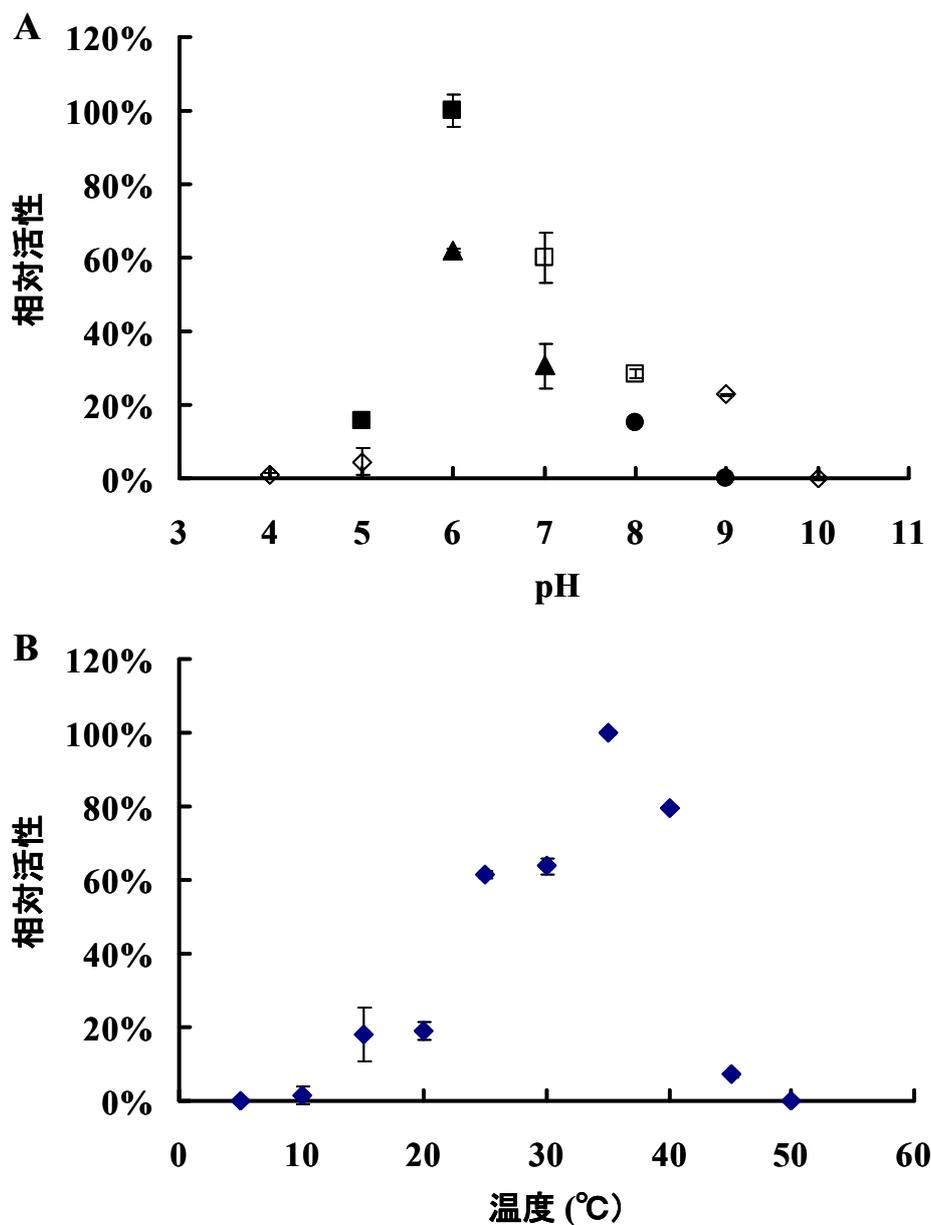


図 2-7 *P. leiognathi* JT-SHIZ-119 株由来の組み換えシアル酸転移酵素のシアリダーゼ活性に及ぼす pH および温度の影響

酵素活性は、最大活性に対する相対値で示した。酵素反応条件は、材料と方法の項で記載の通りに行った。各点は 3 反復の平均値を表し、エラーバーは標準誤差を表す。(A) 35°C でのシアリダーゼ活性に及ぼす pH の影響。◇、100mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH4.0~5.0)；■、100mM カコジル酸ナトリウム緩衝液 (pH5.0~6.0)；▲、100mM ビス-トリス緩衝液 (pH6.0~7.0)；□、100mM リン酸緩衝液 (pH7.0~8.0)；●、100mM TAPS (*N*-Tris(hydroxymethyl)methyl-3-aminopropanesulfonic acid) 緩衝液 (pH8.0~9.0)；○、100mM CHES (*N*-Cyclohexyl-2-aminoethanesulfonic acid) 緩衝液 (pH9.0~10.0)。(B) pH6.0 でのシアリダーゼ活性に及ぼす温度の影響。

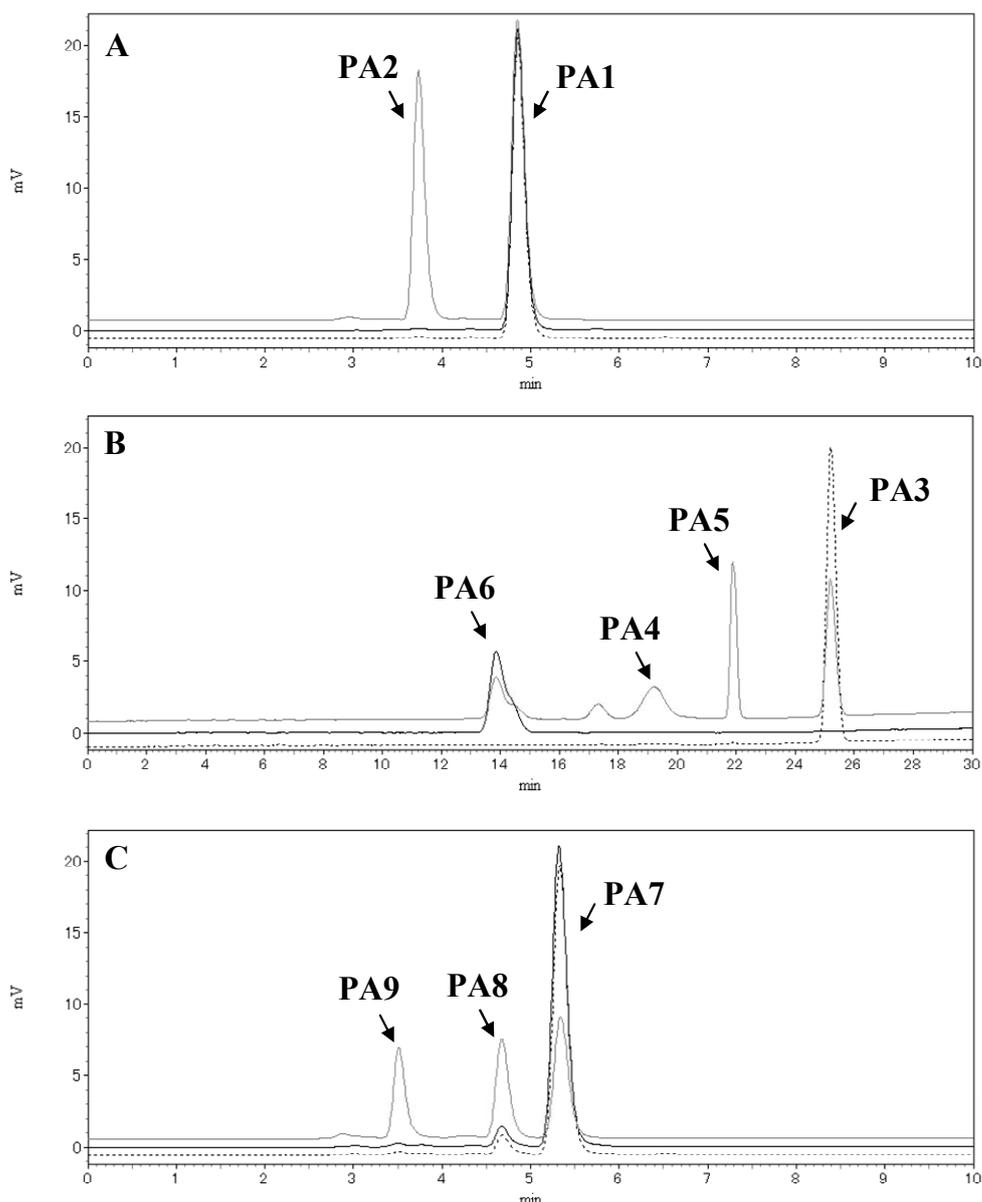


図 2-8 ピリジルアミノ化糖鎖を用いたシアリダーゼ反応産物の HPLC 分析

反応液を 0.15% の *n*-ブタノールを含む 100mM 酢酸-トリエチルアミン緩衝液 (pH5.2) で平衡化させた PALPAK タイプ R カラム (0.46 x 25cm) を用いた HPLC で分析を行った。カラム温度: 40°C、流速: 1ml/分、溶出液: *n*-ブタノールを含む 100mM 酢酸-トリエチルアミン緩衝液 (pH5.2)。溶出条件: 0~35 分で *n*-ブタノールを 0.15% から 0.5% に上げる直線勾配溶出。ピリジルアミノ化糖鎖の検出: 蛍光検出 (励起波長 320nm、蛍光波長 400nm)。

(A) PA1/PA2 混合物、および PA1 糖鎖 (Neu5Ac α 2-3Gal 結合を有する) を含むシアリダーゼ反応液。(B) PA3/PA4/PA5/PA6 混合物、および PA3 (Neu5Ac α 2-6Gal 結合を有する) を含むシアリダーゼ反応液。(C) PA7/PA8/PA9 混合物、および PA7 (Neu5Ac α 2-8Neu5Ac 結合を有する) を含むシアリダーゼ反応液。

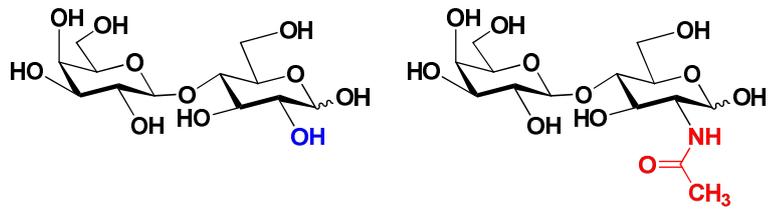


図 2-9 ラクトースおよび *N*-アセチルラクトサミンの構造

3章 *Photobacterium* 属 JT-ISH-224 株由来の組換え α 2,3-シアル酸転移酵素を用いたシアル酸含有糖鎖の合成と酵素の受容体基質特異性

Photobacterium phosphoreum JT-ISH-467 株に由来する組換え α 2,3-シアル酸転移酵素 (Tsukamoto et al. 2007)、および *Photobacterium* sp. JT-ISH-224 株に由来する組換え α 2,3-シアル酸転移酵素 r Δ 23pspST3 (Tsukamoto et al. 2008) を利用して幾つかの糖受容体基質へのシアル酸転移反応を解析したところ、r Δ 23pspST3 を用いてラクトースより 3'-シアリルラクトース (Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4Glc) の合成過程において、目的とする 3'-シアリルラクトース以外に、合成副産物が存在することを見出した。また、この副産物の構造解析の結果から r Δ 23pspST3 はガラクトースの C2-C4 の立体配置を受容体基質として認識していることが予想されたことから、マンノースおよびマンノビオースを糖受容体基質に用いて酵素反応を行ったところ、いずれを用いた場合にも Neu5Ac が転移した産物を得られることを見出した。各種イノシトールを糖受容体基質とした場合にも、幾つかのイノシトールについて合成産物を得ることを見出した。これらの結果は主論文 2、3、および 4 として公表されている。本章ではこれら産物の構造解析の結果と、そこから推察される r Δ 23pspST3 の受容体基質特異性に関して考察を行ったので述べる。

3.1 材料と方法

3.1.1 試薬

シチジン-5'-モノホスフェート-*N*-アセチルノイラミン酸 (CMP-Neu5Ac) はジャパン・フード&リカー・アライアンス (京都) より、陰イオン交換樹脂 AG 1-X2 はバイオラッド・ラボラトリーズ (カリフォルニア、米国) より、Sephadex G-15 は GE・ヘルスケア・バイオサイエンス (東京) より、薄層クロマトグラフィー (TLC) プレートはメルク (ダルムシュタット、ドイツ) より購入した。6-マンノビオース (Man α 1-6Man) は新潟薬科大学・応用生命科学科の鯨坂勝美教授から供与していただいたものを使用した (Ajisaka et al. 1995)。*myo*-inositol は和光純薬より、*allo*-inositol、1*D*-*chiro*-inositol、1*L*-*chiro*-inositol、*epi*-inositol、*muco*-inositol、および *scyllo*-inositol は東京化成工業より購入した。他の全ての試薬は市販の分析グレード品を使用した。

3.1.2 *Photobacterium* sp. JT-ISH-224 株由来の組換え α 2,3-シアル酸転移酵素の調製

本研究で使用した組換え α 2,3-シアル酸転移酵素 Δ 23pspST3 (完全長 ORF より N 末端のアミノ酸 2 から 24 番目のアミノ酸残基を欠失させた酵素) は、塚本らが報告した方法 (Tsukamoto et al. 2008) に従って調製した。酵素活性は、CMP-Neu5Ac から 1 分間に 1 μ mol の Neu5Ac をラクトースに転移する活性を 1 ユニットとした。

3.1.3 シアル酸含有糖鎖の酵素合成

ラクトース 100 mg (280 μ mol)、CMP-Neu5Ac 250 mg (353 μ mol)、5.05U の *Photobacterium* sp. JT-ISH-224 由来精製組換え α 2,3-シアル酸転移酵素、および 100 mM B ビストリス緩衝液 (pH 6.0) から成る 0.5 ml の反応液を調製し、30°C で 2 時間反応を行った。

マンノース 10mg (55.6 mmol) および 40 mg の CMP-Neu5Ac (60.8 mmol)、あるいは 18.8 mg の 6-マンノビオース (54.9 mmol) および 76.8 mg の CMP-Neu5Ac (116.6 mmol) を 2U の酵素とともに、100 mM ビスートリス緩衝液 (pH 6.0) から成る 0.5 ml の反応液中、30°C で 2 時間反応を行った。

myo-inositol を受容体基質に用いた合成反応では、10 mg (55.6 μ mol) の受容体基質、43 mg (62.5 μ mol) の CMP-Neu5Ac、1U の *Photobacterium* sp. JT-ISH-224 由来精製 α 2,3-シアル酸転移酵素 (Δ 23pspST3)、および 100 mM ビスートリス緩衝液 (pH6.0) から成る 0.5 ml の反応液を調製し、30°C で 2 時間反応を行った。他のイノシトールを受容体基質に用いた合成反応では、20 mg (73.2 μ mol) の受容体基質、90 mg (130.8 μ mol) の Δ 23pspST3、および 100 mM ビスートリス緩衝液 (pH 6.0) から成る 0.5 ml の反応液を調製し、30°C で 2 時間反応を行った。

3.1.4 シアル酸含有糖鎖の精製

酵素合成産物は、Sabesan and Paulson の方法 (Sabesan and Paulson 1986) に準じ、以下の方法により精製を行った。反応後、反応液を脱イオン水で 10 ml に希釈し、AG 1-X2 陰イオン交換樹脂を充填したエコノカラム (1.0 cm x 10 cm、バイオラッド・ラボラトリーズ) に添加した。カラムを脱イオン水 10 ml で 3 回洗浄し、5、10、50、100、500、および 1000 mM のリン酸緩衝液 (pH 6.8) 10 ml を用いて、各濃度で少なくとも 2 回送液を行い、合成産物を溶出させた。各溶出画分の一部を、後述する TLC で分析し、シアル酸含有糖鎖を含む画分をエバポレーターで乾固させた。乾固させた各々の残渣を、2.5 ml の脱イオン水で再溶解させ、Sephadex G-15 カラム (1.6 cm x 70 cm) にロードした。目的の合成産物は脱イオン水を用いて溶出させ、TLC 分析でシアル酸含有糖鎖を含む画分を集めた後、ロータリーエバポレーターで濃縮を行った。その後、凍結乾燥させた乾燥物を、最終的な精製物とした。

3.1.5 シアル酸含有糖鎖の分析

酵素反応により得られたシアル酸含有糖鎖は、TLC あるいは TSKgel Amide-80 カラム (4.6mm x 25cm、東ソー) を用いた高速液体クロマトグラフィー (HPLC、島津製作所) により分析を行った。

TLC 分析では、酵素反応液の極少量 (<1.0 μ l) を HPTLC プレート (60 F254、メルク) にスポットし、2-プロパノール/酢酸/水 (3:2:1, v/v) 溶媒を用いて展開させた。溶媒の先端がプレートの最上部付近まで移動した時点で展開を終了し、プレートを乾燥させた後、5%硫酸を含むエタノール中に浸漬し、プレートを加熱して有機化合物を呈色させた。HPLC 分析は、遠藤らの方法 (Endo et al. 2009) に従って行った。精製した合成産物は、重水中で Bruker DMX-500 あるいは Bruker Avance DPX250 (Bruker) を用いた NMR 分析に供試した。全てのスペクトルは、Bruker の標準プログラムにより測定を行った。また一部の産物については、塚本らの方法 (Tsukamoto et al. 2008) に従って Electrospray Ionization Mass Spectroscopy (ESI-MASS) も行った。

3.1.6 イノシトールに対する基質特異性

myo-inositol、1D-*chiro*-inositol、1L-*chiro*-inositol、*epi*-inositol、*muco*-inositol、*scyllo*-inositol、およびラクトースを糖受容体基質として試験を行った。5 mU の精製酵素、42mM の受容体基質、418Bq の CMP-[6-¹⁴C]-Neu5Ac を含む 2.3mM の CMP-Neu5Ac、100mM のビストリス緩衝液 (pH6.0)、0.5M の塩化ナトリウム、および 0.05% のトライトン X-100 から成る 30 μ l の反応液を調整し、山本らの方法 (Yamamoto et al. 1996) に従って酵素反応および測定を行った。反応時間は、ラクトースについては 1 分間、*epi*-inositol、1D-*chiro*-inositol、および *myo*-inositol は 5 分間、1L-*chiro*-inositol、*muco*-inositol および *scyllo*-inositol は 10 分間で行った。

3.2 結果

3.2.1 3'-シアリルラクトースの酵素合成時に見出された反応副産物の単離

r Δ 23pspST3 を用いて、ラクトースから 3'-シアリルラクトースの合成を行い、その精製を行っている過程で、酵素反応液中に主産物である 3'-シアリルラクトース以外に副産物が存在することを見出した。陰イオン交換クロマトグラフィー溶出画分の TLC 分析を行った際、副産物と考えられるシグナルが 100 mM リン酸緩衝液溶出画分に検出された(図 3-1)。*Photobacterium damsela*e JT160 株由来の組換え α 2,6-シアル酸転移酵素を用いて、3'-シアリルラクトースから 3',6'-ジシアリルラクトースを合成した際に、反応液を陰イオン交換クロマトグラフィーに供し、リン酸緩衝液による溶出画分を TLC で分析を行うと、反応の過程で CMP-Neu5Ac の加水分解により生じた Neu5Ac は 50 mM リン酸緩衝液溶出画分に、未反応の CMP-Neu5Ac は 500 mM リン酸緩衝液溶出画分に、そして産物である 3',6'-ジシアリルラクトースは 100 mM リン酸緩衝液溶出画分に溶出されたことから、この副産物はラクトースに Neu5Ac が 2 分子転移した、ジシアリル糖鎖であると推察した。そこで 3'-シアリルラクトースおよび副産物をサイズ排除カラムクロマトグラフィーにより精製を行い、140.3mg の 3'-シアリルラクトースおよび 9.3 mg の副産物を単離した。合成反応に用いた糖供与体基質 (353 mmol) を基準とした収率は、3'-シアリルラクトースが 62.1%、副産物は 5.6%であった。各々の精製物を TSKgel Amide-80 カラムを用いた HPLC で分析したところ、その保持時間は 3'-シアリルラクトースが 21.8 分、副産物は 29.5 分であった(図 3-2)。

3.2.2 合成副産物の構造解析

3.2.1 において精製した副産物の構造を明らかにするため、ESI-MASS 分析および NMR 分析を行った。質量分析の結果、この副産物は 923.5 に(M-H)⁻のイオンピークを示すスペ

クトルを示した (図 3-3)。2つの Neu5Ac を有するラクトースから推定される分子量は 924.3 となるため、質量分析結果からもこの副産物が 2つの Neu5Ac を有することを強く示唆していた。この副産物の $^1\text{H-NMR}$ 分析を行ったところ、還元末端 Glc 残基の β -アノマーシグナルは観測されず、 α -アノマーを示す δ 5.19 ppm のシグナルのみが検出された。3',6'-ジシアリルラクトースでは Glc 残基の β H-1 シグナルは δ 4.74 ppm に、 α H-1 シグナルは δ 5.29 ppm に観測されることが示されている (Kajihara et al. 1996)。これらの結果から、この副産物は α 型のみから成ると判断した。また Glc の H-2 化学シフト値は 3'-シアリルラクトースの化学シフト値と比較して 0.3 ppm 低磁場にシフトしていた (図 3-4I)。次に $^1\text{H-}^{13}\text{C}$ 間の相関スペクトルの測定を、HSQC、HMBC、HOHAHA、および COSY 法により行った。これらスペクトルを各々図 3-4II-V に示す。これらスペクトルから得た ^1H および ^{13}C 化学シフト値を表 3-1 に示す。ラクトース中のシアリル化された部位は、この副産物と 3',6'-ジシアリルラクトースとの間でみられる ^{13}C の化学シフト値の差異から同定した (Kajihara et al. 1996)。副産物の Glc の C-2 は低磁場にシフトしており、HMBC スペクトルより Neu5Ac の C-2 および Glc の H-2 との間に相関を、また Neu5Ac の C-2 および Gal の H-3 との間に相関を観測した (図 3-4III)。これらの結果より、Neu5Ac はラクトースの Gal の 3 位の水酸基 (O-3') および Glc の 2 位の水酸基 (O-2) に結合していることが明らかとなった。そこで、この副産物を 2,3'-ジシアリルラクトースと命名した。構造を図 3-5 に示す。

3.2.3 マンノースおよび 6-マンノビオースからの合成産物の単離

マンノースあるいは 6-マンノビオースを受容体基質に用いた合成反応液を、陰イオン交換クロマトグラフィーに供し、TLC 分析を行ったところ、いずれの場合にも 10 mM のリン酸緩衝液溶出画分において反応産物が検出された (図 3-6)。この結果は、これら産物がいずれもモノシアロシドであることを示していた。これら各々の産物をサイズ排除クロマ

トグラフィーにより更に精製した結果、マンノースからの産物（化合物 1）を 4.6 mg、6-マンノビオースからの産物（化合物 2）を 9.1 mg 得た。収率は化合物 1 が 18 %、化合物 2 は 26 %であった。

3.2.4 マンノースおよび 6-マンノビオースに由来する合成産物の構造解析

上記で単離した化合物 1 および化合物 2 の構造を明らかにするため、NMR 分析を行った。得られたスペクトルを図 3-7I~III に示す。化合物 1 および化合物 2 の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルにおいて、Neu5Ac 残基の H-3 エクアトリアルシグナルが各々 δ 2.89 ppm および δ 2.88 ppm に、Neu5Ac 残基の H-4 シグナルが各々 δ 3.82 ppm および δ 3.82 ppm に観測された（図 3-7I）。また HMBC スペクトルにおいては両化合物共に、Neu5Ac の C-2 と還元末端マンノースの H-1 との間に相関が観測された（図 3-7II）。更に、 ^{13}C デカップリングなしの HMQC スペクトルにおいて、H-1 と C-1 との間の単結合カップリング定数は、化合物 1 については 159.7 Hz、化合物 2 については 160.1 Hz であった（図 3-7III）。以上の結果より、化合物 1 は Neu5Ac がマンノースの β -アノマー位に α 型で結合し、化合物 2 は Neu5Ac が 6-マンノビオースの β -アノマー位に α 型で結合していることが示された。これら新規な化合物 1 および化合物 2 の構造を図 3-8 に示す。化合物 1 の ^1H および ^{13}C 化学シフト値、そして代表的な結合定数を表 3-2 に、化合物 2 の ^1H および ^{13}C 化学シフト値、そして代表的な結合定数を表 3-3 に示す。

3.2.5 各種イノシトールに由来する合成産物の確認

allo-inositol、1*D-chiro*-inositol、1*L-chiro*-inositol、*epi*-inositol、*myo*-inositol、*muco*-inositol、および *scyllo*-inositol を受容体基質に用いて合成反応を行った結果、*allo*-inositol、1*D-chiro*-inositol、*epi*-inositol、*myo*-inositol、および *muco*-inositol より反応産物を確認することができた。これらイノシトールはいずれも、ガラクトース残基の

3-OH と 4-OH に似たシス-ジオール構造を有する (図 3-9)。しかし、1*L*-*chiro*-inositol および *scyllo*-inositol からは反応産物を確認することはできなかった。これら両イノシトールはガラクトース残基の 3-OH と 4-OH に似たシス-ジオール構造を持たない (図 3-9)。

3.1.4 の項で述べた方法により各々の反応産物を精製し、得られた産物、Neu5Ac、および CMP-シアル酸について TSKgel Amide-80 カラムを用いた HPLC 分析の結果を図 3-10 に示す。1*D*-*chiro*-inositol、*epi*-inositol、*muco*-inositol、および *myo*-inositol からは単一の合成産物を得ることができ、各産物の保持時間は、各々 18.0 分、22.1 分、15.0 分、および 21.2 分であった。*allo*-inositol からの精製産物は、14.8 分、16.7 分、および 17.3 分の保持時間を示す少なくとも 3 成分を含む混合物であった。いずれの産物も陰イオン交換クロマトグラフィー精製過程において 5~10mM リン酸カリウム緩衝液溶出画分に検出されたことから、Neu5Ac が 1 分子転移したと考えた。

以上の結果より、単一の化合物として精製することができたと考えられる 1*D*-*chiro*-inositol、*epi*-inositol、*myo*-inositol、および *muco*-inositol 由来の合成産物について構造解析を行った。

3.2.6 1*D*-*chiro*-イノシトールに由来する合成産物の構造解析

反応液から合成産物を、陰イオン交換クロマトグラフィーおよびサイズ排除カラムクロマトグラフィーにより精製を行い、36.3 mg (収率 69 %) の化合物 3 を得た。陰イオン交換クロマトグラフィー精製過程における溶出画分の TLC 分析結果を図 3-11 に示す。

次に精製した化合物 3 の構造を明らかにするため、NMR 分析および質量分析を行った。得られたスペクトルを図 3-12I~IV に示す。¹H-NMR スペクトルでは Neu5Ac の H-3 エクアトリアルおよび H-4 の各シグナルが、各々 δ 2.73 ppm および δ 3.69 ppm に観測された (図 3-12I)。このことは化合物 3 には Neu5Ac が α -結合していることを示していた (Shauer Eds.

1982)。¹³C-NMR スペクトルでは、1D-*chiro*-inositol に由来する C-2 のシグナルが低磁場にシフトしていた (δ 70.32 ppm から δ 73.76 ppm、図 3-12II)。更に HMBC スペクトルでは、Neu5Ac の C-2 および 1D-*chiro*-inositol の H-2 との間に相関が見られた (図 3-12III)。また質量分析からは、ネガティブ ([M-H]⁻) イオンピークが 470.05 に観測された (図 3-12IV)。これらの結果から、1D-*chiro*-inositol に由来する化合物 3 は 1D-*chiro*-inositol の 2 位の水酸基に Neu5Ac が結合していることが明らかとなり、1D-2-*O*-(α-sialosyl)-*chiro*-inositol と決定した。構造を図 3-13 に、¹H および ¹³C 化学シフト値、そして代表的な結合定数を表 3-4 に示す。

3.2.7 *epi*イノシトールに由来する合成産物の構造解析

反応液から合成産物を、陰イオン交換クロマトグラフィーおよびサイズ排除カラムクロマトグラフィーにより精製を行い、30.4 mg (収率 58 %) の化合物 4 を得た。陰イオン交換クロマトグラフィー精製過程における溶出画分の TLC 分析結果を図 3-14 に示す。

次に精製した化合物 4 の構造を明らかにするため、NMR 分析および質量分析を行った。得られたスペクトルを図 3-15I~IV に示す。¹H-NMR スペクトルでは Neu5Ac の H-3 エクアトリアルおよび H-4 の各シグナルが、各々 δ 2.80 ppm および δ 3.67 ppm に観測された (図 3-15I)。また、*epi*-inositol の H-1 と H-5、および H-2 と H-4 に由来する化学シフト値が、各々非対称な成分に分かれて観測された。¹³C-NMR スペクトルでは、*epi*-inositol に由来する C-3 のシグナルが低磁場にシフトしていた (δ 66.69 ppm から δ 70.20 ppm、図 3-15II)。更に HMBC スペクトルでは、Neu5Ac の C-2 および *epi*-inositol の H-3 との間に相関が見られた (図 3-15III)。質量分析からは、ネガティブ ([M-H]⁻) イオンピークが 470.20 に観測された (図 3-15IV)。これらの結果から、*epi*-inositol 由来の化合物 4 については *epi*-inositol の 3 位の水酸基に Neu5Ac が結合していることが明らかとなり、1L-3-*O*-(α-sialosyl)-*epi*-inositol と決定した。構造を図 3-16 に、¹H および ¹³C 化学シフト

値、そして代表的な結合定数を表 3-5 に示す。

3.2.8 *muc*-inositol に由来する合成産物の構造解析

反応液から合成産物を、陰イオン交換クロマトグラフィーおよびサイズ排除カラムクロマトグラフィーにより精製を行い、4.0 mg (収率 7.6 %) の化合物 5 を得た。陰イオン交換クロマトグラフィー精製過程における溶出面分の TLC 分析結果を図 3-17 に示す。

次に精製した化合物 5 の構造を明らかにするため、NMR 分析および質量分析を行った。得られたスペクトルを図 3-18I~IV に示す。¹H-NMR スペクトルでは Neu5Ac の H-3 エクアトリアルおよび H-4 の各シグナルが、各々 δ 2.86 ppm および δ 3.79 ppm に観測された (図 3-18I)。また、*muc*-inositol 残基の H-1、H-2、H-4、および H-5 に由来する化学シフト値は、各々非対称な成分に分かれて観測された (*muc*-inositol の H-1、H-2、H-4、および H-5 の化学シフト値は δ 3.87 ppm)。¹³C-NMR スペクトルでは、*muc*-inositol 残基に由来する C-1 あるいは C-5 のシグナルが低磁場にシフトしていた (δ 70.07 ppm から δ 75.40 ppm、図 3-18II)。更に HMBC スペクトルでは、Neu5Ac の C-2 および *muc*-inositol の H-1 あるいは H-5 との間に相関を観測した (図 3-18III)。質量分析からは、ネガティブ ([M-H]⁻) イオンピークが 470.15 に観測された (図 3-18IV)。これらの結果から、*muc*-inositol 由来の化合物 5 については *muc*-inositol の 1 位あるいは 5 位の水酸基に Neu5Ac が結合していることが明らかとなった。¹H および ¹³C 化学シフト値、そして代表的な結合定数を表 3-6 に示す。

3.2.9 *myo*-inositol に由来する合成産物の構造解析

反応液から合成産物を、陰イオン交換クロマトグラフィーおよびサイズ排除カラムクロマトグラフィーにより精製を行い、9.5 mg (収率 36 %) の化合物 6 を得た。陰イオン交換クロマトグラフィー精製過程における溶出面分の TLC 分析結果を図 3-19 に示す。

次に精製した化合物6の構造を明らかにするため、NMR分析および質量分析を行った。得られたスペクトルを図3-20I~IVに示す。¹H-NMRスペクトルではNeu5AcのH-3エクアトリアルおよびH-4の各シグナルが、各々 δ 2.86 ppmおよび δ 3.84 ppmに観測された(図3-20I)。また、*myo*-inositol残基のH-1およびH-3に由来する化学シフト値は、各々非対称な成分に分かれて観測された(*myo*-inositolのH-1およびH-3の化学シフト値は δ 3.52 ppm)。¹³C-NMRスペクトルでは、*myo*-inositol残基に由来するC-1あるいはC-3のシグナルが低磁場にシフトしていた(δ 72.35 ppmから δ 74.00 ppm、図3-20II)。更にHMBCスペクトルでは、Neu5AcのC-2および*myo*-inositolのH-1あるいはH-3との間に相関が見られた(図3-20III)。質量分析からは、ネガティブ([M-H]⁻)イオンピークが470.10に観測された(図3-20IV)。これらの結果から、*myo*-inositol由来の化合物6については*myo*-inositolの1位もしくは3位の水酸基に、Neu5Acが結合していることが明らかとなった。¹Hおよび¹³C化学シフト値、そして代表的な結合定数を表3-7に示す。

3.2.10 各種イノシトールに対する特異性

r Δ 23pspST3の各種イノシトールに対する基質特異性を明らかにするため、*myo*-inositol、1*D*-*chiro*-inositol、1*L*-*chiro*-inositol、*epi*-inositol、*muco*-inositol、および*scyllo*-inositolを用いてラクトースを基準とした酵素の相対活性について解析を行った。その結果、高い単離収率を示した1*D*-*chiro*-inositolおよび*epi*-inositolに対する相対活性が最も高く、最も低い単離収率であった*muco*-inositolに対する相対活性は最も低かった。合成産物が確認できなかった1*L*-*chiro*-inositolおよび*scyllo*-inositolに対して活性は検出されなかった。これらの結果を表3-8に示す。

3.3 考察

3.3.1 *Photobacterium* sp. JT-ISH-224 株由来の組換え α 2,3-シアル酸転移酵素 r Δ 23pspST3 の受容体基質特異性 (1)

r Δ 23pspST3 を用いて 3'-シアリルラクトースの合成を行い、その精製過程において副産物の存在を見出した。構造解析により、この副産物は 2,3'-ジシアリルラクトースであることを明らかにした。この結果は、シアル酸転移酵素の regio-mistaken 反応に関する最初の報告である。regio-mistaken 反応とは、本来の基質と立体配置が類似する基質に対して酵素が誤認識した結果生じる反応である。糖転移酵素の regio-mistaken 反応に関しては、既にガラクトース転移酵素について西田らにより報告されている (Nishida et al. 1993)。その中で西田らは、ウシ乳より調製したガラクトース転移酵素は通常、ウリジン二リン酸ガラクトース (UDP-Gal) より Gal を Glc および *N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc) に転移するが、この酵素はまた、UDP-Gal より β Gal を *N*-アセチルカノサミン (Glc3NAc) のアノマー位に転移することを報告している (Nishida et al. 1993)。この場合、Glc3NAc の β -アノマーの C-1 から C-4 の立体配置は、GlcNAc の C-4 から C-1 の立体配置と同一である。従って、ガラクトース転移酵素は Glc3NAc を受容体基質として認識し、GlcNAc の C-4 位に対応する Glc3NAc の C-1 位、即ちアノマー位にガラクトースを転移していると考えられる。

本研究で用いた r Δ 23pspST3 の場合も、受容体基質として α -ラクトースを使用すると、 α -Glc の C-1 から C-3 の立体配置は Gal の C-4 から C-2 の立体配置と重ね合わせることができる (図 3-21)。今回合成反応に使用したラクトースは α -型と β -型を含むため、水溶液中では両アノマーの平衡状態で存在しているが、 $^1\text{H-NMR}$ スペクトルからは 2,3'-ジシアリルラクトースの β -アノマーを示すシグナルは観測されず、その構造は α -アノマーに固定されていた。このことは、本研究で使用した r Δ 23pspST3 が、 α -Glc の C-1 から C-3 部分を受容体

基質として認識し、CMP-Neu5Ac から Neu5Ac を α -Glc の O-2 水酸基に転移していることを強く示唆している。なお、 β -Glc の場合は、C-1 から C-3 の水酸基の立体配置は Gal の C-4 から C-2 の立体配置と重なり合わない (図 3-21)。2,3'-ジシリアルラクトースの構造が α -型に固定されている理由は、現時点では不明であるが、酵素反応により α -Glc の O-2 水酸基に Neu5Ac が転移すると、Neu5Ac のカルボキシル基と α -Glc の O-1 水酸基との間で直ちに水素結合が形成され、分子構造が安定化されるのではないかと考えている。

3.3.2 *Photobacterium* sp. JT-ISH-224 株由来の組換え α 2,3-シアル酸転移酵素 r Δ 23pspST3 の受容体基質特異性 (2)

r Δ 23pspST3 がラクトースから 2,3'-ジシリアルラクトースを産生し、しかもその構造は α -型のみから構成されることが示された (図 3-5)。この r Δ 23pspST3 が有する特殊な受容体基質特異性について、更にマンノースおよび 6-マンノビオースを受容体基質に用いてシリアル化反応を行ったところ、両受容体基質より産物 (各々化合物 1 および化合物 2) を得ることができ、Neu5Ac がマンノースおよび 6-マンノビオースの β -アノマー位に結合している構造となっていることを示した (図 3-8)。化学合成によりグリコシル化反応を行う場合、 α -シリアル化および β -マンノシル化は最も困難な反応であることが知られている (Brito-Arias 2007)。今回これら 2 種類の困難な反応が r Δ 23pspST3 を用いることによって一段階で同時に行うことができ、今後の応用展開が強く期待される。

2,3'-ジシリアルラクトースの合成とその構造解析から、r Δ 23pspST3 は、ラクトースの α -アノマーの Glc、即ち α -Glc の C-1 から C-3 の立体配置を受容体部位と認識し、ガラクトピラノースの 3 位の水酸基に対応する α -Glc の 2 位の水酸基に Neu5Ac を転移する活性を有することを 3.3.1 で述べた。マンノピラノースの β -アノマーにおける C-2 から O-5 の立体配置もまた、ガラクトピラノースの C-4 から C-2 の立体配置と重ね合わせることができる (図 3-22)。この場合、ガラクトピラノースの C-2 とマンノピラノースの O-5 との間の

構造は異なっていることから、**r** Δ 23pspST3 は、ガラクトピラノースの C-4 と C-3 の立体配置構造を主に受容体基質として認識しているものと推察される。また、6-マンノビオースでは C-5 が Gal 残基のアノマー位に対応することから、非還元末端マンノースが、通常受容体基質であるラクトースあるいは LacNAc の還元末端 Glc あるいは GlcNAc と誤認されている可能性もある。この点を明らかにするためには単糖マンノースおよび 6-マンノビオースの反応動力学パラメータを明らかにして、ラクトースおよび LacNAc のそれらと比較する必要があると考えている

3.3.3 *Photobacterium* sp. JT-ISH-224 株由来の組み換え α 2,3-シアル酸転移酵素 **r** Δ 23pspST3 を用いた各種シアリルイノシトールの合成と構造解析

2,3'-ジシアリルラクトース、シアリルマンノース、およびシアリル-6-マンノビオースの合成とその構造解析から、**r** Δ 23pspST3 は、ガラクトピラノースの C-4 と C-3 の立体配置構造を受容体基質として認識し、ガラクトピラノースの O-3 水酸基に相当する水酸基に Neu5Ac を転移していると考えられた。そこで、糖アルコールのシクリトールに分類される各種イノシトールを受容体基質に用いて酵素反応を行った結果、予想通りガラクトピラノースの C-4 と C-3 の立体配置を有する、1D-*chiro*-inositol、*epi*-inositol、*muco*-inositol、および *myo*-inositol から産物を合成することができた。

各種スペクトル分析の結果から、1D-*chiro*-inositol 由来の化合物 3 は 1D-2-*O*-(α -sialosyl)-*chiro*-inositol、*epi*-inositol 由来の化合物 4 は 1L-3-*O*-(α -sialosyl)-*epi*-inositol と決定した (図 3-13 および図 3-16)。

一方、*muco*-inositol 由来の化合物 5 および *myo*-inositol 由来の化合物 6 に関しては構造の対称性により、NMR 分析のみでは Neu5Ac が結合している正確な部位を特定することができなかった。しかし、3.3.1 および 3.3.2 で明らかにしてきたように Δ 23pspST3 酵素はガラクトピラノースの 3 位および 4 位のシス-ジオール構造を強く認識している点を考える

と、化合物 5 は *muc*-inositol の 1 位の水酸基に Neu5Ac が結合した sialyl-*muc*-inositol、化合物 6 は *myo*-inositol の 3 位の水酸基に Neu5Ac が結合した sialyl-*myo*-inositol である可能性が高いものと予想された (図 3-23)。

3.3.4 *Photobacterium* sp. JT-ISH-224 株由来の組換え α 2,3-シアル酸転移酵素 r Δ 23pspST3 の受容体基質特異性 (3)

3.2.5 から 3.2.9 において r Δ 23pspST3 は、4 種類のイノシトール、1D-*chiro*-inositol、*epi*-inositol、*muc*-inositol、および *myo*-inositol に Neu5Ac を転移する活性を有することを示し、本研究によりシアル酸転移酵素がシアリルイノシトールを合成できることを初めて明らかにした。これら基質は、本酵素の典型的な受容体基質であるガラクトース残基と一部類似の構造を有している (図 3-9)。シアル酸が転移した位置は全てガラクトースの C-3 から C-4 に対応するシス-ジオール構造のエクアトリアル水酸基であった。*epi*-inositol を基質に用いた反応では、このイノシトールは 2 つのシス-ジオール構造 (3,4-ジオールおよび 1,2-ジオール) を有することから、2 種類の産物が合成されることが予想されたが、シアル酸残基は 3 位の水酸基にしか転移せず、1 位の水酸基には転移しなかった。*epi*-inositol の 3 位および 4 位の水酸基をガラクトースの 3 位および 4 位の水酸基と重ね合わせた場合には、ガラクトースの環酸素はエクアトリアルの CH-OH に置き換えられる。一方、*epi*-inositol の 1 位および 2 位の水酸基をガラクトースの 3 位および 4 位の水酸基と重ね合わせた場合は、環酸素はアキシアルの CH-OH に置き換えられる。また、ガラクトースの環酸素の位置がアキシアルな CH-OH を有する *muc*-inositol に由来する反応産物の収率 (7.6%) は、他の 3 種のイノシトールに由来する反応産物の収率 (36-69%) よりも著しく低い。更に、これら 4 種のイノシトールに対する本酵素のシアル酸転移活性の解析より、本酵素は *epi*-inositol および 1D-*chiro*-inositol を良い基質とし、*muc*-inositol は基質になりにくかった (表 3-8)。これらの結果は、r Δ 23pspST3 は、ガラクトースの環酸素位置で

の配向性に関してアキシシャルよりもエクアトリアルをより良い基質として認識していることを示している。受容体基質として用いた各イノシトールから得られた合成産物の単離収率と各イノシトールに対する酵素の相対活性の結果を総合的に勘案すると、ガラクトピラノースの 5 位に対応する水酸基の配向性はエクアトリアルよりもアキシシャルであるイノシトールを、ガラクトピラノースの 2 位に対応する水酸基の配向性はエクアトリアルよりもアキシシャルであるイノシトールをより良い基質としていると考えられる。水酸基がこれらの配向性を有するイノシトールは *allo*-inositol である。3.2.5 で r Δ 23psp23ST は *allo*-inositol にも Neu5Ac を 1 分子転移させることができ、反応産物は少なくとも 3 成分を含む混合物であることを述べた。*allo*-inositol から複数の産物が得られるのは *allo*-inositol がガラクトピラノースの 3,4-シスジオール構造を複数もつことに起因すると考えられる。将来的に各産物の分離・精製を行って単離収率を求めるとともに、シアル酸が転移する各々の水酸基が保護基で保護された化合物を用いることで酵素の受容体基質認識機構についてのより詳細な知見を得ることが出来ると考えている。

これまでに、海洋性細菌由来のシアル酸転移酵素は、広い受容体基質特異性を有していることが示されてきた (Izumi and Wong 2001 ; Yamamoto et al. 2006)。今回はその受容体基質特異性を詳細に解析することにより、*Photobacterium* sp. JT-ISH-224 株由来の r Δ 23pspST3 はガラクトース残基に類似した構造を有していれば、様々な糖を基質としてシアロシドを合成できることを示した。

表 3-1 ラクトースを受容体基質に用いて得られた合成副産物の化学シフト値および代表的な結合定数

	Neu5Ac			Gal			Glc		
	¹ H	<i>J</i>	¹³ C	¹ H	<i>J</i>	¹³ C	¹ H	<i>J</i>	¹³ C
1			176.3	4.49	d, 7.85	104.9	5.19 (α)	d, 3.53	93.1
2			102.5	3.52		71.8	3.95 (α)	dd, 9.82, 3.53	75.9
2			102.2						
3 _{ax}	1.75	dd, 12.63	41.7	4.06	dd, 9.90, 3.06	77.9	3.79 (α)		72.1
3 _{ax}			42.1						
3 _{eq}	2.67	dd, 12.63, 4.65	41.7						
3 _{eq}	2.70	dd, 12.49, 4.54	42.1						
4	3.62		71.0	3.90		69.9	3.69 (α)		80.1
4			70.8						
5	3.79		54.1	3.65		77.6	3.89 (α)		72.4
6	3.56		75.3	3.72		63.5	3.82 (α)		62.4
6			75.2	3.65					
7	3.53		70.6						
7			70.5						
8	3.85		74.2						
8	3.82		74.2						
9	3.58		65.0						

¹H および ¹³C の化学シフト値は、各々重水 (HOD) = 4.75 ppm (298 K) および 1,4-ジオキササン = 69.1 ppm (298 K) に対する相対値で表した。

表 3-2 化合物 1 の化学シフト値^a および代表的な結合定数

	Neu5Ac			Man			
	¹ H	<i>J</i> (Hz)	¹³ C	¹ H	<i>J</i> (Hz)	¹³ C	<i>J</i> (Hz)
1			173.10	1	5.18	d, ³ <i>J</i> _{1,2} 1.0	95.04 ¹ <i>J</i> _{C1,H1} 159.7
2			100.73	2	3.99 ^b		71.08
3 _{ax}	1.89	dd, ³ <i>J</i> _{3ax,4} 12.1	39.77	3	3.76 ^b		72.63
3 _{eq}	2.89	dd, ³ <i>J</i> _{3eq,4} 4.6 ³ <i>J</i> _{gem} 12.5					
4	3.82 ^b		68.11	4	3.69	dd, ³ <i>J</i> _{3,4} 9.4	66.28
5	3.98 ^b		51.57	5	3.48	ddd, ³ <i>J</i> _{4,5} 9.2	76.66
6	3.80 ^b		72.99	6a	4.00 ^b	³ <i>J</i> _{5,6a} 2.3	60.81
				6b	3.85	dd, ³ <i>J</i> _{5,6b} 5.6 ³ <i>J</i> _{gem} 12.4	
7	3.69	dd, ³ <i>J</i> _{6,7} 1.7	68.11				
8	3.96 ^b	³ <i>J</i> _{7,8a} 8.6	71.87				
9a	3.98 ^b		62.51				
9b	3.76 ^b						
CH _b	2.14		21.97				
C=O			174.95				

^a ¹H および ¹³C の化学シフト値は、各々重水 (HOD) = 4.81 ppm (303 K) および 1,4-ジオキササン = 67.4 ppm (303 K) に対する相対値で表した。

^b 250 MHz の HMQC スペクトルより測定した。

表 3-3 化合物 2 の化学シフト値 ^a および代表的な結合定数

Neu5Ac			Man				Man'			
	¹ H	¹³ C		¹ H	¹³ C	¹³ C	¹ H	¹³ C	¹³ C	¹³ C
1		173.11	1	5.21	d, ³ J _{1,2} 1.0	94.98	5.02	d, ³ J _{1,2} 1.7	99.50	¹ J _{C1,H1} 171.5
2		100.71	2	4.00 ^b		71.08	4.12	dd, ³ J _{2,3} 3.4	69.84	
3 _{ax}	1.91	dd, ³ J _{3ax,4} 12.0	3	3.82 ^b		72.78	3.99 ^b		70.42	
3 _{eq}	2.88	dd, ³ J _{3eq,4} 4.6								
		³ J _{gem} 12.5								
4	3.82 ^b	68.15	4	3.81 ^b		66.13	3.76 ^b		66.74	
5	3.97 ^b	51.53	5	3.63 ^b		74.55	3.79 ^b		72.61	
6	3.77 ^b	72.94	6a	4.08 ^b	dd, ³ J _{5,6a} 4.5	65.45	4.01 ^b		60.86	
			6b	3.86 ^b	³ J _{gem} 11.6		3.88 ^b			
7	3.69	dd, ³ J _{6,7} 1.8								
8	3.94 ^b	³ J _{7,8} 8.9								
9a	3.98 ^b	62.57								
9b	3.75 ^b									
CHb	2.14	21.97								
C=O		174.96								

^a ¹H および ¹³C の化学シフト値は、各々重水 (HOD) = 4.81 ppm (303 K) および 1,4-ジオキサン = 67.4 ppm (303 K) に対する相対値で表した。

^b 250 MHz の HMQC スペクトルより測定した。

表 3-4 化合物 3 の化学シフト値 ^a および代表的な結合定数

Neu5Ac			<i>chiro</i> -inositol			
	¹ H	¹³ C		¹ H	¹³ C	
1		173.93	1	4.07	dd, ³ J _{1,2} 3.5 ³ J _{1,6} 3.5	70.58
			2	4.22	bdd, ³ J _{2,3} 9.1	73.76
2		100.07	3,4	3.63 ^b		71.05
				3.62 ^b		72.47
3 _{ax}	1.83	dd, ³ J _{3ax,4} 11.8	5	3.72	bdd, ³ J _{4,5} 9.1 ³ J _{5,6} 3.5	70.08
3 _{eq}	2.73	dd, ³ J _{3eq,4} 4.6	6	3.99		71.30
		² J _{gem} 12.3				
4	3.69	ddd, ³ J _{4,5} 10.0				68.39
5	3.85	dd, ³ J _{5,6} 10.0				51.61
6	3.63	dd, ³ J _{6,7} 1.6				72.74
7	3.60	dd, ³ J _{7,8} 8.5				68.03
8	3.90	ddd, ³ J _{8,9a} 2.5				71.62
		³ J _{8,9b} 6.1				
9a	3.87 ^b	dd, ³ J _{gem} 9.9				62.45
9b	3.65 ^b					
CHb	2.03	21.95				
C=O		174.92				

^a ¹H および ¹³C の化学シフト値は、各々重水 (HOD) = 4.81 ppm (298 K) および 1,4-ジオキサン = 67.4 ppm (298 K) に対する相対値で表した。

^b 250 MHz の HMQC スペクトルより測定した。

表 3-5 化合物 4 の化学シフト値^a および代表的な結合定数

Neu5Ac			<i>epi</i> -inositol		
	¹ H	¹³ C		¹ H	¹³ C
1		173.42	1, 5	3.50 3.47	71.41 71.41
2		101.31	2, 4	4.20 4.02	74.75 73.85
3 _{ax}	1.81	40.30	3	3.90	70.20
3 _{eq}	2.80		6	3.82	69.78
4	3.67	68.24			
5	3.84	51.63			
6	3.65	72.74			
7	3.59	67.97			
8	3.78	72.09			
9a	3.87	62.52			
9b	3.62				
CHs	2.03	21.95			
C=O		174.95			

^a ¹H および ¹³C の化学シフト値は、各々重水 (HOD) = 4.81 ppm (298 K) および 1,4-ジ
オキサン=67.4 ppm (298 K) に対する相対値で表した。

表 3-6 化合物 5 の化学シフト値^a および代表的な結合定数

Neu5Ac			<i>muco</i> -inositol		
	¹ H	¹³ C		¹ H	¹³ C
1		173.48	1, 5	4.34 3.97 ^b	75.40 72.06
2		100.90	2, 4	4.02 ^b 3.95 ^b	72.06 71.25
3 _{ax}	1.89	39.65	3	4.10	70.08
3 _{eq}	2.86		6	4.21	68.89
4	3.79	68.33			
5	3.95	51.61			
6	3.76	72.82			
7	3.69	68.09			
8	3.97 ^b	71.76			
9a	3.98 ^b	62.54			
9b	3.75 ^b				
CHs	2.13	21.95			
C=O		174.93			

^a ¹H および ¹³C の化学シフト値は、各々重水 (HOD) = 4.81 ppm (303 K) および 1,4-ジ
オキサン=67.4 ppm (303 K) に対する相対値で表した。

^b 250 MHz の HMQC スペクトルより測定した。

表 3-7 化合物 6 の化学シフト値^a および代表的な結合定数

	Neu5Ac			<i>myo</i> -inositol		
	¹ H	<i>J</i>	¹³ C	¹ H	<i>J</i>	¹³ C
1			173.77	1, 3	3.62	70.57
2			99.72		4.07	74.00
3 _{ax}	1.91	dd, ³ <i>J</i> _{3ax,4} 12.2	39.41	2	4.18	70.79
3 _{eq}	2.86	dd, ³ <i>J</i> _{3eq,4} 4.5 ² <i>J</i> _{gem} 12.2		4, 6	3.76 ^b 3.72 ^b	70.65 71.99
4	3.84 ^b		68.23	5	3.43	73.79
5	3.95	dd, ³ <i>J</i> _{4,5} 9.8 ³ <i>J</i> _{5,6} 9.8	51.49			
6	3.70 ^b		72.57			
7	3.70 ^b		67.91			
8	4.00 ^b		71.57			
9a	3.98 ^b		62.36			
9b	3.75 ^b					
CH ₃	2.14		21.85			
C=O			174.81			

^a ¹H および ¹³C の化学シフト値は、各々重水 (HOD) = 4.81 ppm (303 K) および 1,4-ジオキサン = 67.4 ppm (303 K) に対する相対値で表した。

^b 250 MHz の HMQC スペクトルより測定した。

表 3-8 各種イノシトールに対する rΔ23pspST3 の特異性

受容体基質	Neu5Ac 転移活性 (nmol/min)	相対活性* (%)	単離収率 (%)
<i>myo</i> -inositol	0.21	4.5	36
1L- <i>chiro</i> -inositol [#]	-	-	-
1D- <i>chiro</i> -inositol	0.68	15	69
<i>epi</i> -inositol	0.85	18	58
<i>muco</i> -inositol	0.08	1.7	7.6
<i>scyllo</i> -inositol [#]	-	-	-
ラクトース	4.65	100	60 - 80 ¹

* ラクトースを基質とした場合の転移活性を 100%とした場合の相対値を示す。

[#] ガラクトースの 3,4-シス-ジオール構造を持たないイノシトール。

¹ 合成反応条件 (使用基質量・酵素量) はイノシトールの場合と異なるため、参考値。



L D N SL FT W 5mM 10mM 50mM 100mM 500mM 1M

図 3-1 3'-シアリルラクトース合成反応液の陰イオン交換クロマトグラフィーでの溶出画分の TLC 分析

コントロール化合物および溶出画分 (5 μ l) を HPTLC プレート (60 F254、メルク) にスポットし、2-プロパノール/酢酸/水 (3:2:1, v/v) を用いて展開させた。プレートを硫酸-エタノールに浸漬後、ホットプレート上で加熱して有機化合物を呈色させた。副産物を矢印で示した。L: ラクトース、D: CMP-Neu5Ac、N: Neu5Ac、SL: 3'-シアリルラクトース、FT: 素通り画分、W: 洗浄画分、5 mM~1 M: 記載濃度のリン酸緩衝液 (pH6.8) による溶出画分。

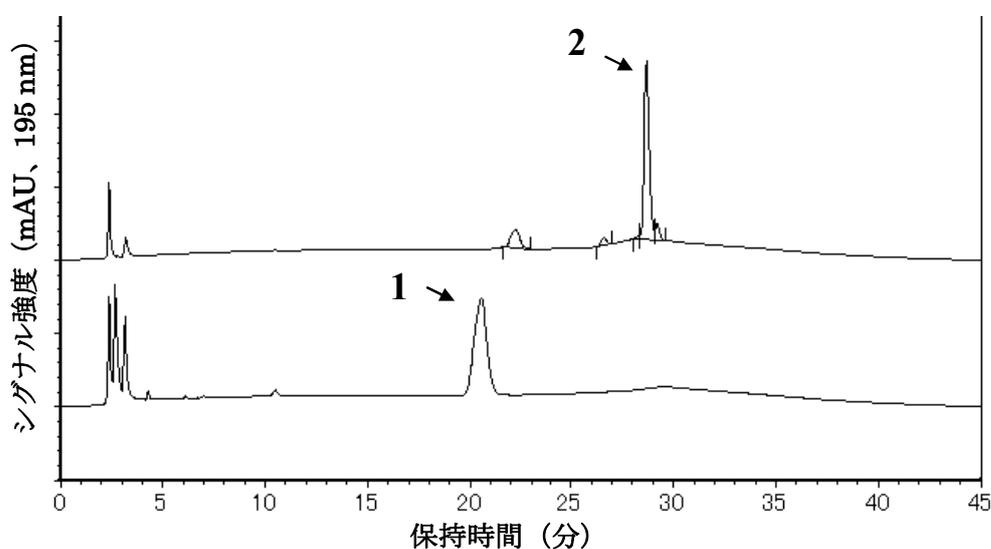


図 3-2 3'-シアリルラクトースおよび副産物の HPLC 分析

精製した各々の産物を 150 μ l のアセトニトリル/15 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH5.2) (75:25, v/v) に溶解し、TSKgel Amide-80 カラムを用いた HPLC で分析を行った。カラム温度: 40 $^{\circ}$ C、流速: 1ml/分、溶出液 A: アセトニトリル/15 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH5.2) (50:50)、溶出液 B: アセトニトリル/15 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH5.2) (75:25)、溶出条件は、0~15 分: 溶出液 B によるイソクラティック溶出、15~45 分: 溶出液 B を 100%から 0%に下げる直線勾配溶出。1: 3'-シアリルラクトース、2: 副産物。

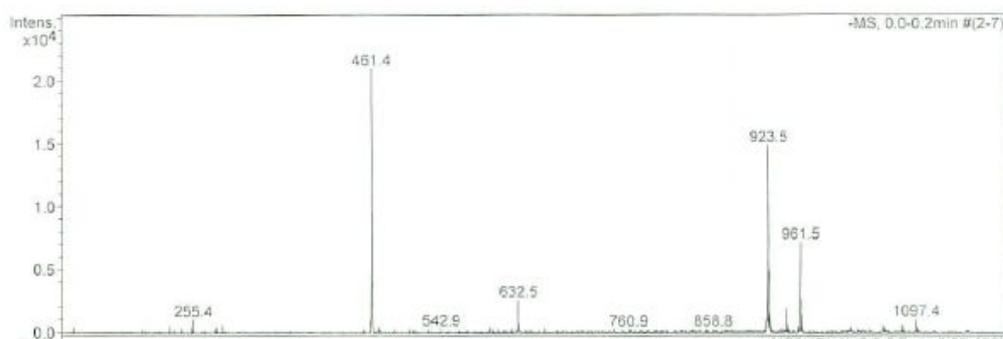


図 3-3 副産物の質量分析

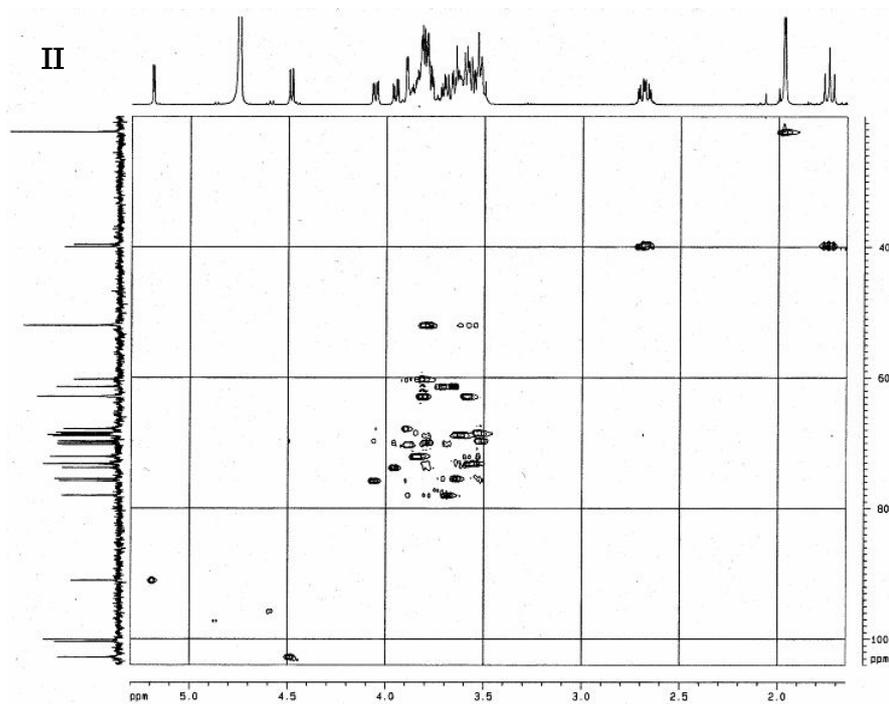
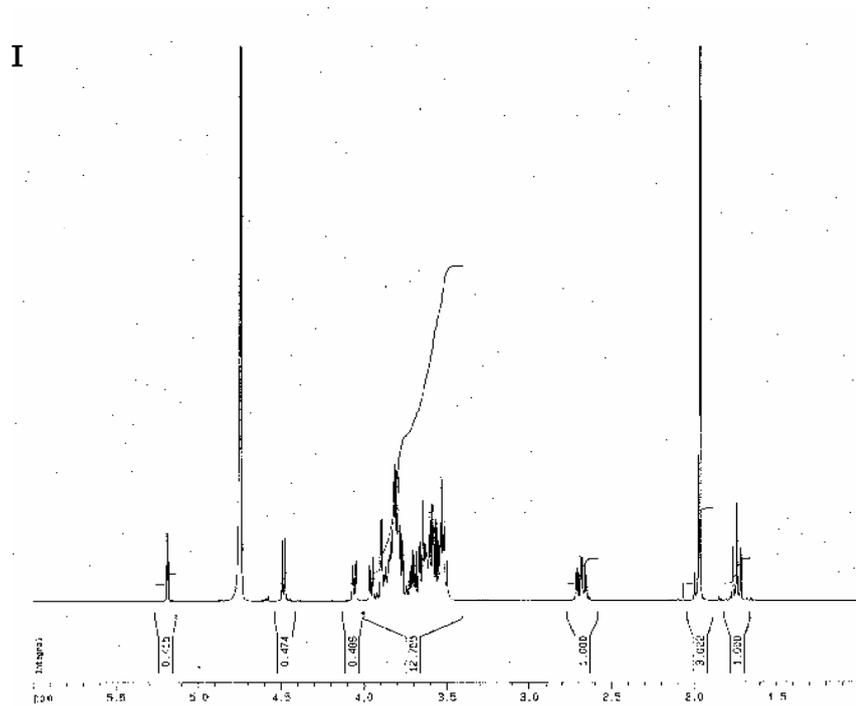


図 3-4 副産物の NMR スペクトル

I、 ^1H -NMR スペクトル ; II、HSQC スペクトル

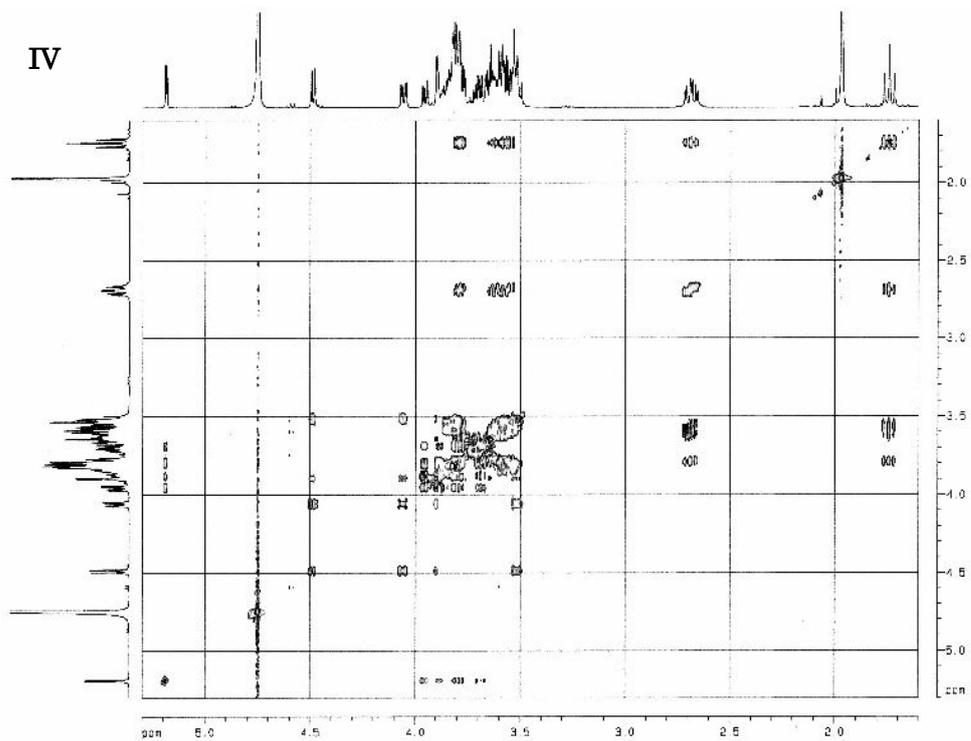
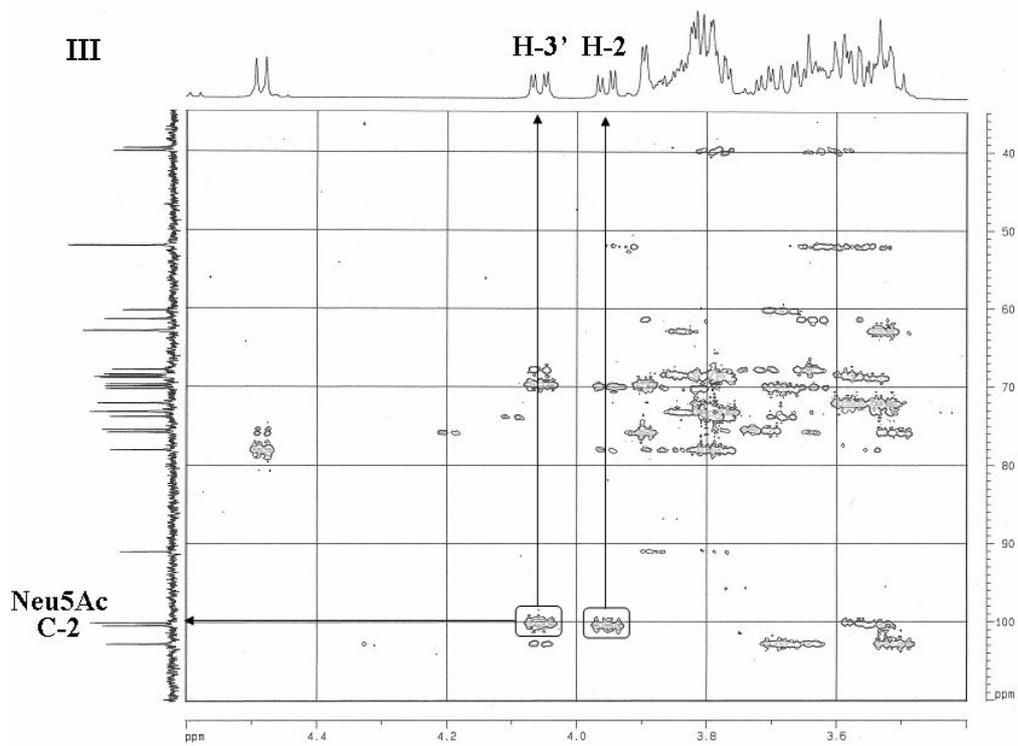


図 3-4 副産物の NMR スペクトル (続き)

III、HMBC スペクトル、IV、HOHAHA スペクトル

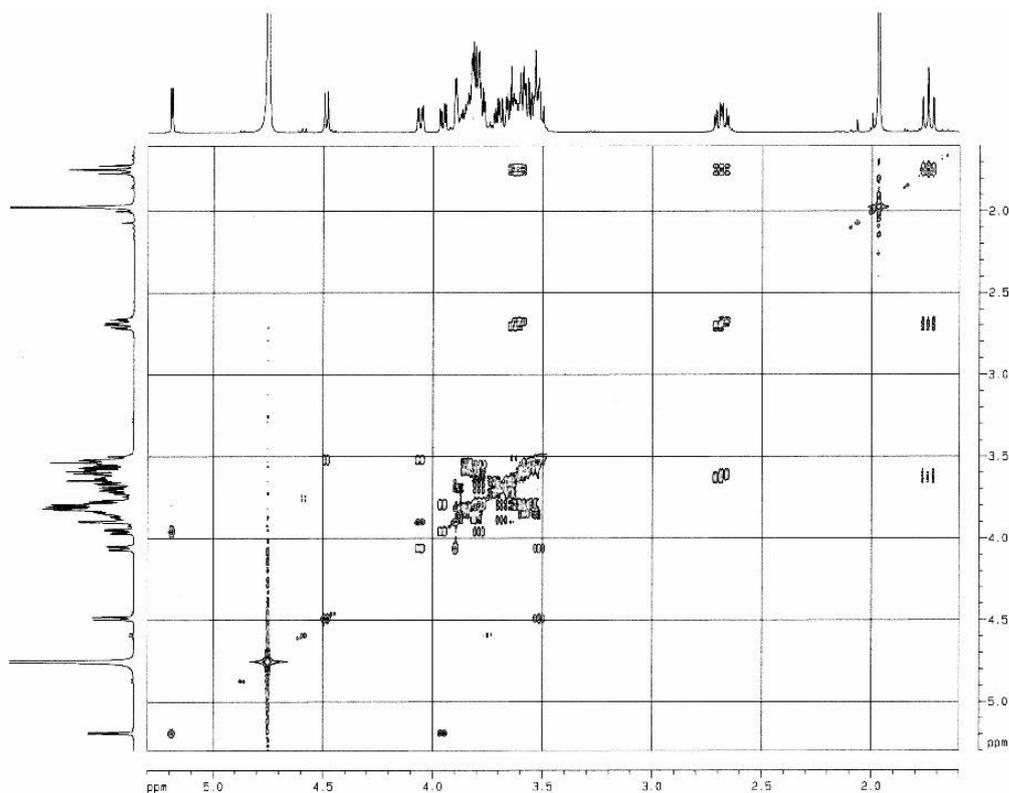


図 3-4 副産物の NMR スペクトル (続き)

精製した副産物を重水に溶解し、Bruker DMX-500 を用いた NMR 分析に供試した。化学シフト値は内性の重水 (4.75 ppm、298 K) に対する相対値で示した。 ^1H - ^{13}C 間の相関スペクトルおよび ^1H - ^1H 間の相関スペクトルは Bruker の標準プログラムを用いて測定した。V、COSY スペクトル

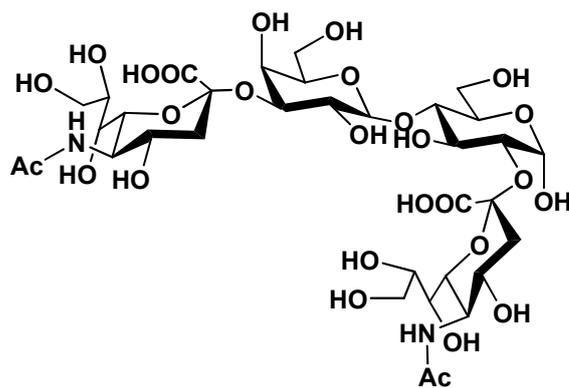
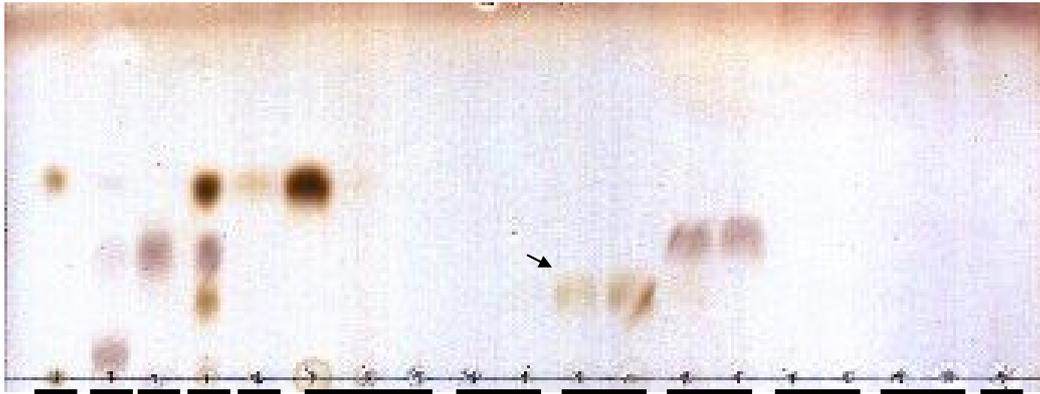


図 3-5 2,3'-ジシアリルラクトースの構造

Neu5Ac はラクトースの非還元末端ガラクトースの 3 位の水酸基および還元末端グルコースの 2 位の水酸基に α -結合しており、水溶液中では α -アノマーのみの構造をとる。



A D N R FT W 5mM 10mM 50mM 100mM 500mM 1M

図 3-6 6-マンノビオースを用いた合成反応液の陰イオン交換クロマトグラフィーでの溶出画分の TLC 分析

コントロール化合物および溶出画分 (5 μ l) を HPTLC プレート (60 F254、メルク) にスポットし、2-プロパノール/酢酸/水 (3:2:1、v/v) を用いて展開させた。プレートを硫酸-エタノールに浸漬後、ホットプレート上で加熱して有機物を呈色させた。反応産物を矢印で示す。A: 6-マンノビオース、D: CMP-Neu5Ac、N: Neu5Ac、R: 反応液、FT: 素通り画分、W: 洗浄画分、5 mM~1 M: 記載濃度のリン酸緩衝液 (pH6.8) による溶出画分。

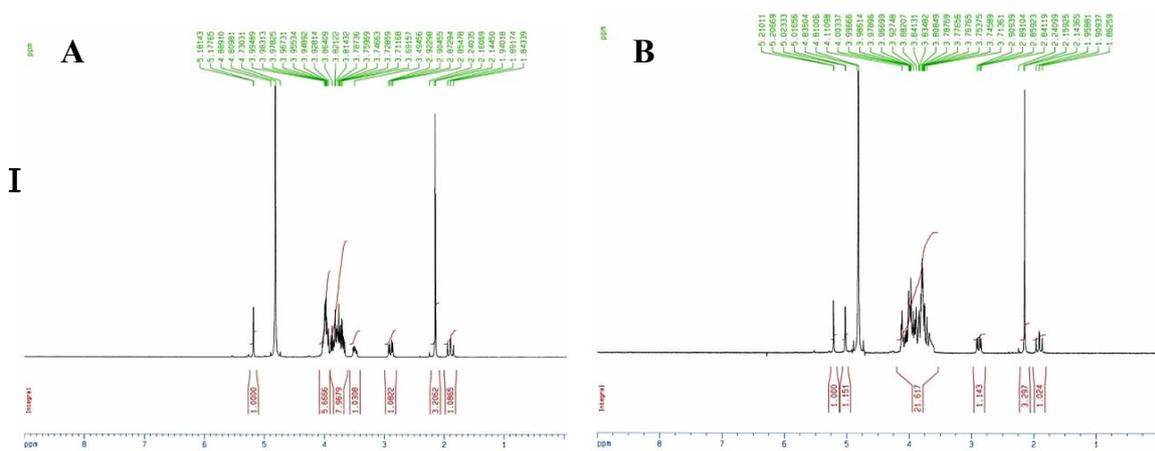


図 3-7 化合物 1 および化合物 2 の NMR スペクトル

I、 ^1H -NMR スペクトル。A は化合物 1 を B は化合物 2 を示す。

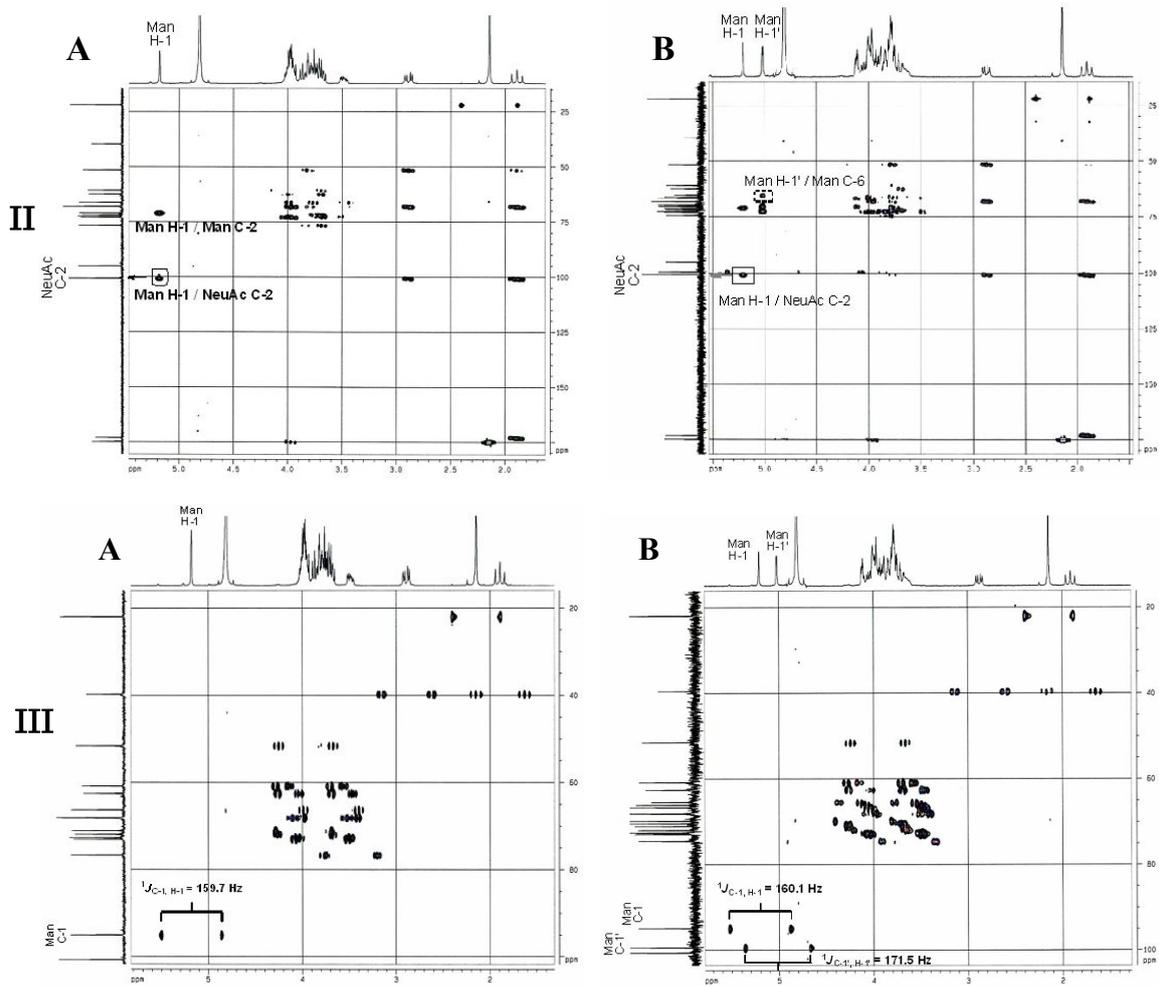


図 3-7 化合物 1 および化合物 2 の NMR スペクトル (続き)

II、HMBC スペクトル ; III、HMQC スペクトル。A は化合物 1 を B は化合物 2 を示す。

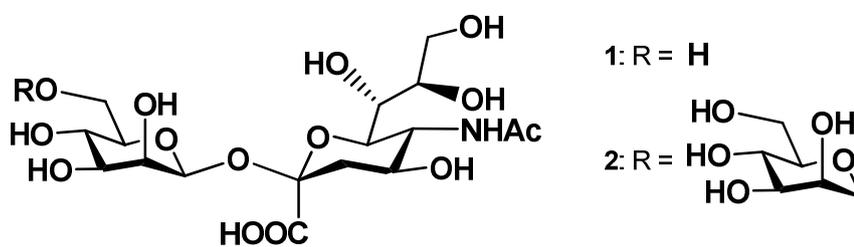


図 3-8 化合物 1 および化合物 2 の構造

1、マンノース由来合成産物 ; 2、6-マンノビオース由来合成産物

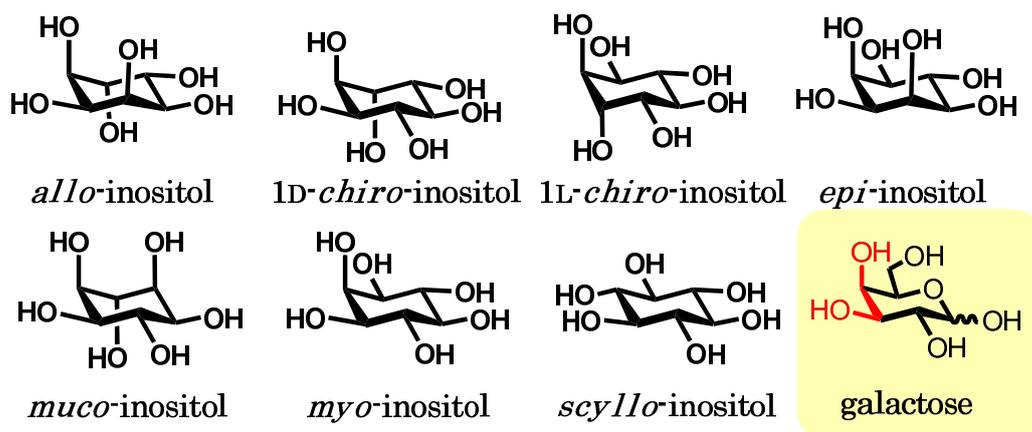


図 3-9 合成反応に用いた各種イノシトールの構造

allo-inositol、1*D*-*chiro*-inositol、*epi*-inositol、*muco*-inositol、および *myo*-inositol はガラクトースの 3,4-シスジオール構造を有する、1*D*-*chiro*-inositol および *scyllo*-inositol はシスジオール構造を持たない。

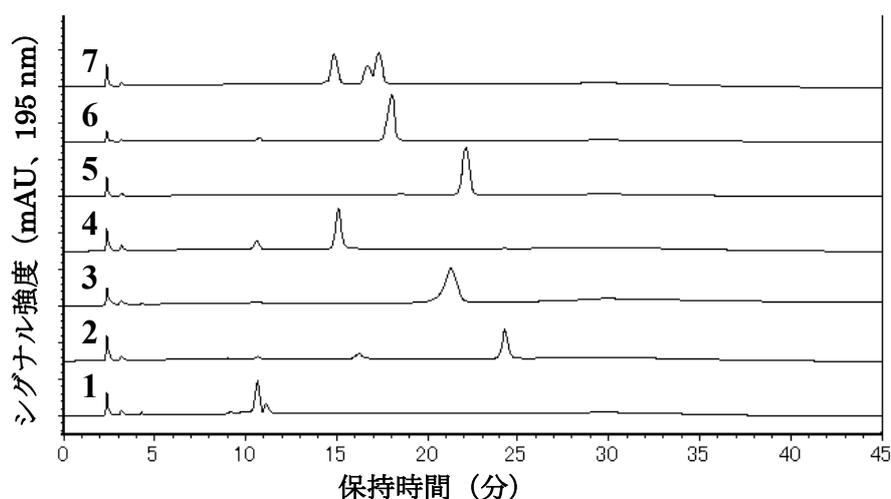


図 3-10 各種イノシトールから得られた合成産物の HPLC 分析

精製した各々の産物を 150ml のアセトニトリル/15 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH5.2) (75 : 25, v/v) に溶解し、TSKgel Amide-80 カラムを用いた HPLC で分析を行った。カラム温度 : 40°C、流速 : 1ml/分、溶出液 A : アセトニトリル/15 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH5.2) (50 : 50)、溶出液 B : アセトニトリル/15 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH5.2) (75 : 25)、溶出条件は、0~15 分 : 溶出液 B によるイソクラティック溶出、15~45 分 : 溶出液 B を 100% から 0% に下げる直線勾配溶出。1 : Neu5Ac (10.6 分)、2 : CMP-Neu5Ac (24.3 分)、3 : *myo*-inositol 由来産物 (21.2 分)、4 : *muco*-inositol 由来産物 (15.0 分)、5 : *epi*-inositol 由来産物 (22.1 分)、6 : 1*D*-*chiro*-inositol 由来産物 (18.0 分)、7 : *allo*-inositol 由来産物 (14.8 分、16.7 分、17.3 分)。

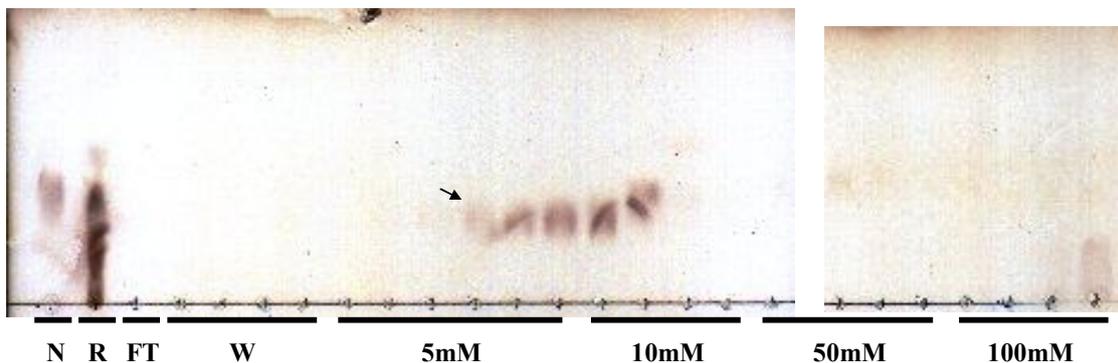
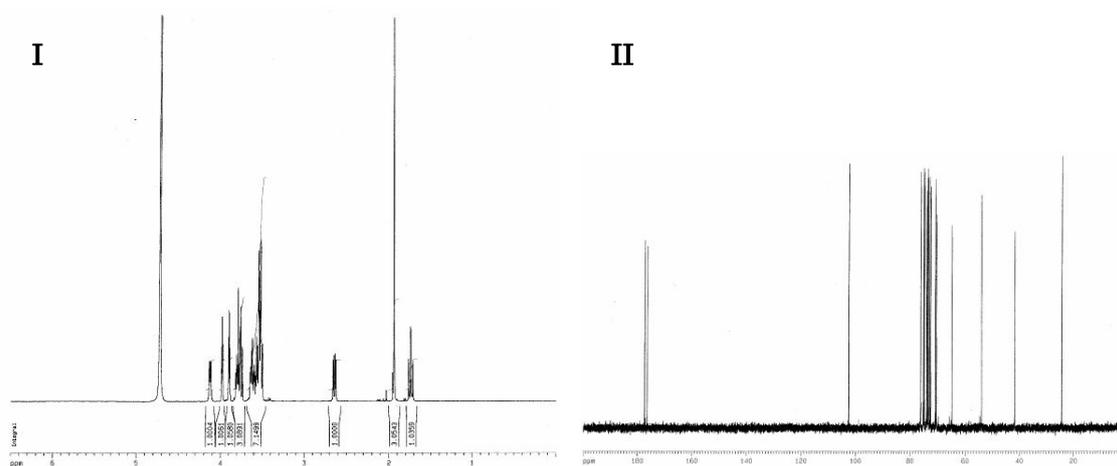


図 3-11 1D-*chiro*-inositol を用いた合成反応液の陰イオン交換クロマトグラフィーでの溶出画分の TLC 分析

コントロール化合物および溶出画分 (5 μ l) を HPTLC プレート (60 F254、メルク) にスポットし、2-プロパノール/酢酸/水 (3 : 2 : 1, v/v) を用いて展開させた。プレートを硫酸-エタノールに浸漬後、ホットプレート上で加熱して有機化合物を呈色させた。反応産物を矢印で示した。N : Neu5Ac、R : 反応液、FT : 素通り画分、W : 洗浄画分、5 mM ~ 100 mM : 記載濃度のリン酸緩衝液 (pH6.8) による溶出画分。



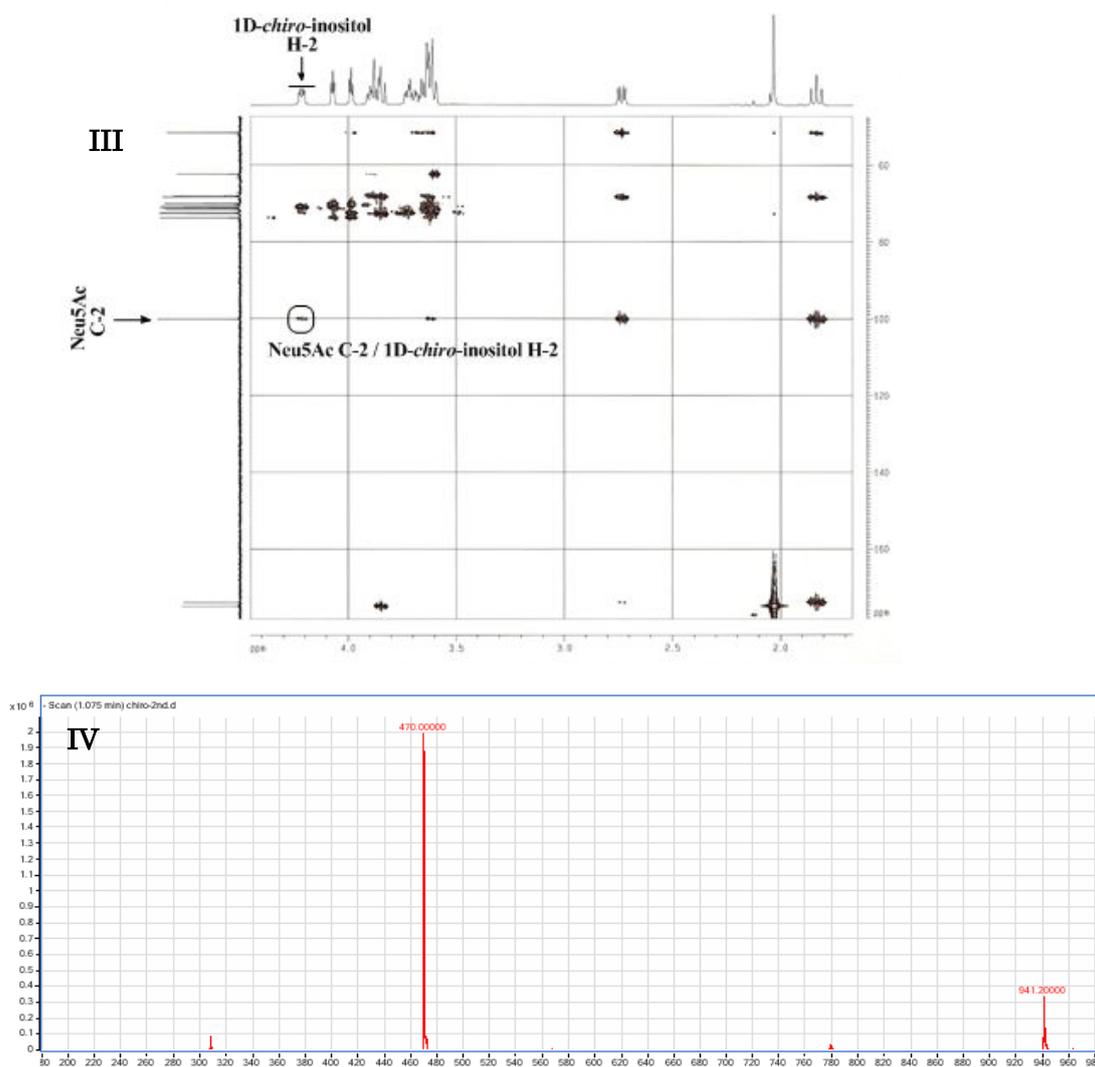


図 3-12 化合物 3 の NMR 分析および MS 分析 (続き)
III、HMBC スペクトル ; IV、MS スペクトル

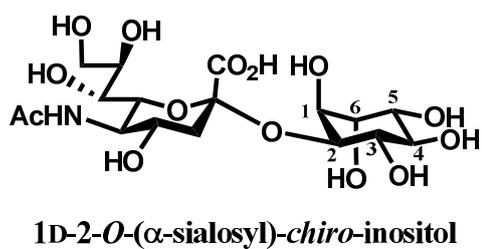


図 3-13 化合物 3 の構造

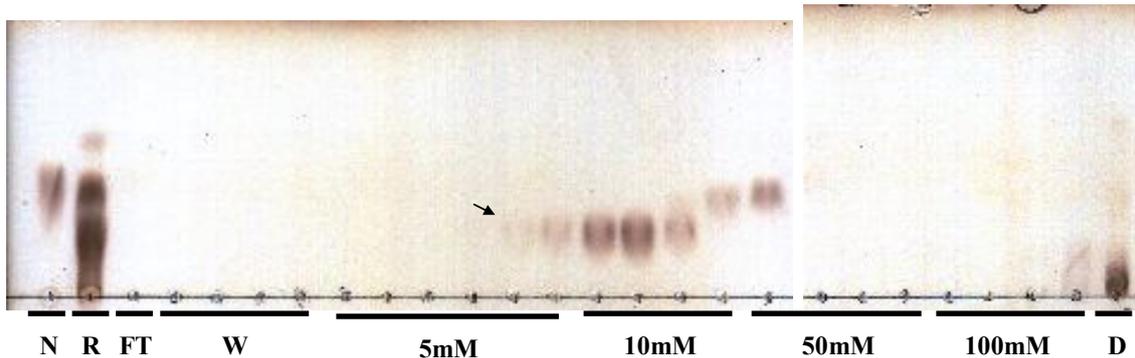


図 3-14 *epi*inositol を用いた合成反応液の陰イオン交換クロマトグラフィーでの溶出画分の TLC 分析

コントロール化合物および溶出画分 (5 μ l) を HPTLC プレート (60 F254、メルク) にスポットし、2-プロパノール/酢酸/水 (3 : 2 : 1, v/v) を用いて展開させた。プレートを硫酸-エタノールに浸漬後、ホットプレート上で加熱して有機化合物を呈色させた。反応産物を矢印で示した。N : Neu5Ac、R : 反応液、D : CMP-Neu5Ac、FT : 素通り画分、W : 洗浄画分、5 mM~100 mM : 記載濃度のリン酸緩衝液 (pH6.8) による溶出画分。

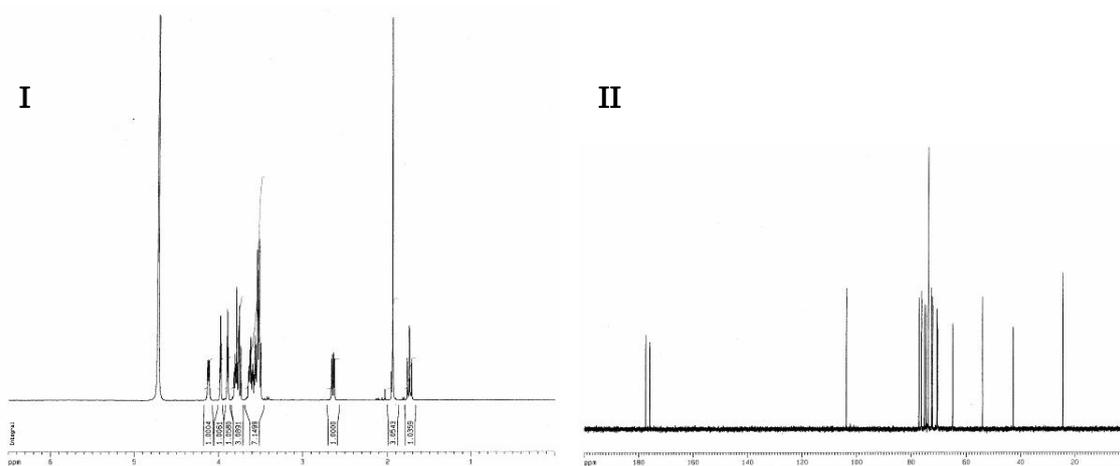


図 3-15 化合物 4 の NMR 分析および MS 分析

I、 ^1H -NMR スペクトル ; II、 ^{13}C -NMR スペクトル

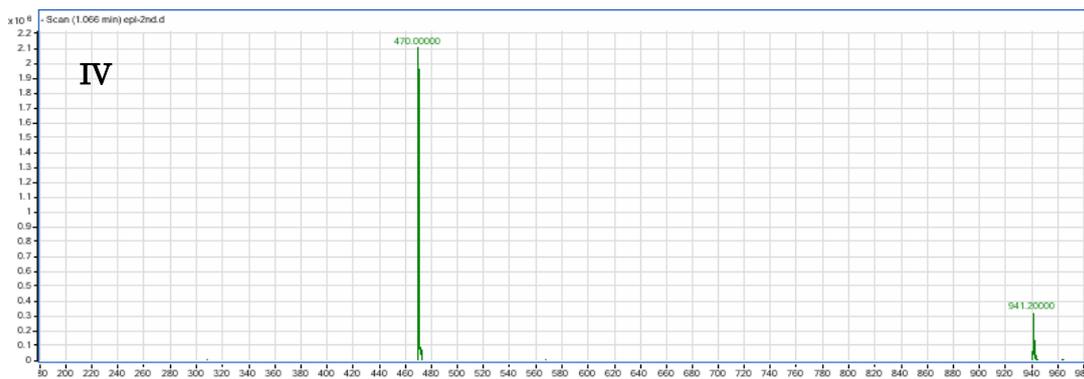
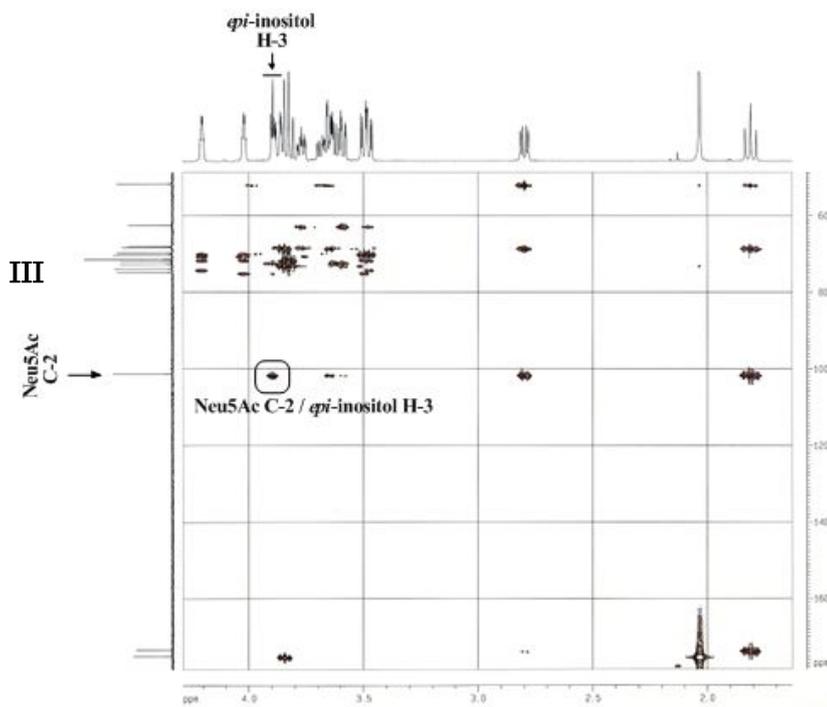
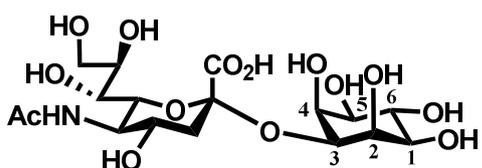


図 3-15 化合物 4 の NMR 分析および MS 分析 (続き)

III、HMBC スペクトル ; IV、MS スペクトル



1L-3-O-(α -sialosyl)-*epi*-inositol

図 3-16 化合物 4 の構造

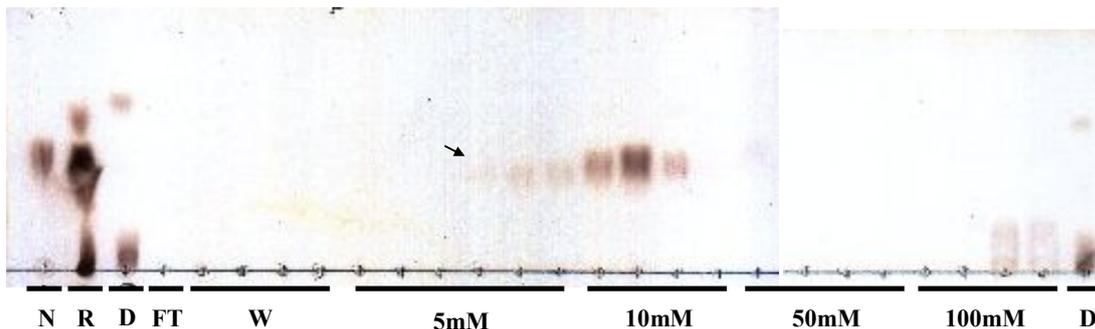


図 3-17 *mucorinositol* を用いた合成反応液の陰イオン交換クロマトグラフィーでの溶出画分の TLC 分析

コントロール化合物および溶出画分 (5 μ l) を HPTLC プレート (60 F254、メルク) にスポットし、2-プロパノール/酢酸/水 (3 : 2 : 1, v/v) を用いて展開させた。プレートを硫酸-エタノールに浸漬後、ホットプレート上で加熱して有機化合物を呈色させた。反応産物を矢印で示した。N : Neu5Ac、R : 反応液、D : CMP-Neu5Ac、FT : 素通り画分、W : 洗浄画分、5 mM~100 mM : 記載濃度のリン酸緩衝液 (pH6.8) による溶出画分。

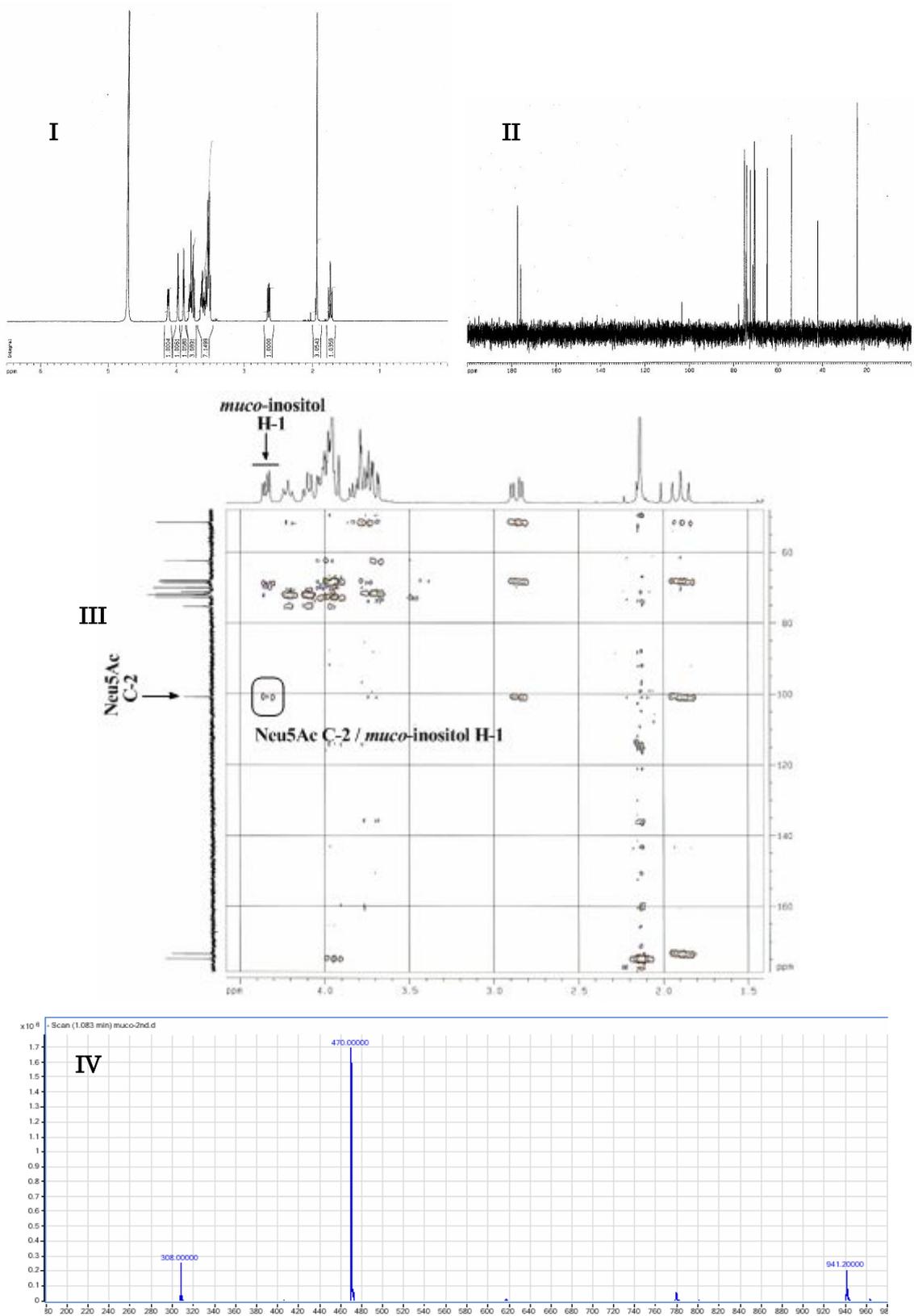


図 3-18 化合物 5 の NMR 分析および MS 分析

I、 ^1H -NMR スペクトル ; II、 ^{13}C -NMR スペクトル ; III、HMBC スペクトル ; IV、MS スペクトル

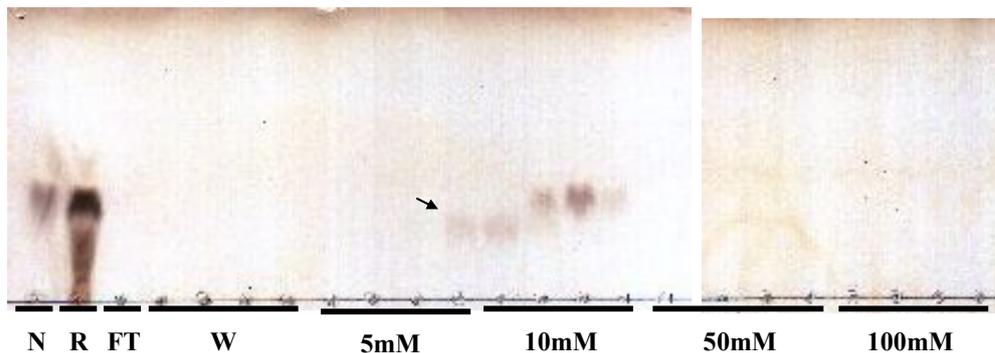


図 3-19 *myo*-inositol を用いた合成反応液の陰イオン交換クロマトグラフィーでの溶出画分の TLC 分析

コントロール化合物および溶出画分 (5 μ l) を HPTLC プレート (60 F254、メルク) にスポットし、2-プロパノール/酢酸/水 (3:2:1、v/v) を用いて展開させた。プレートを硫酸-エタノールに浸漬後、ホットプレート上で加熱して有機化合物を呈色させた。反応産物を矢印で示した。N : Neu5Ac、R : 反応液、D : CMP-Neu5Ac、FT : 素通り画分、W : 洗浄画分、5 mM~100 mM : 記載濃度のリン酸緩衝液 (pH6.8) による溶出画分。

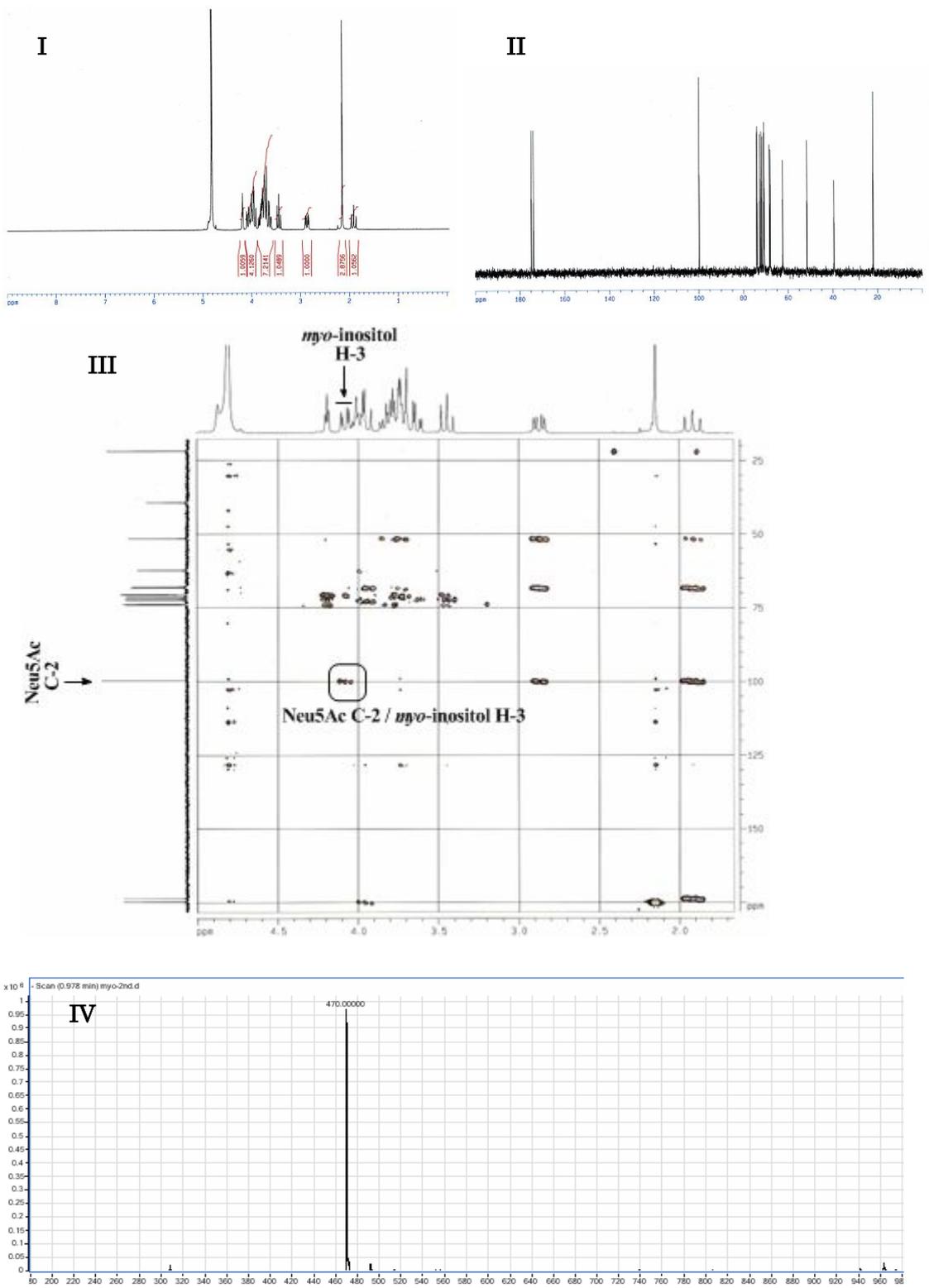


図 3-20 化合物 6 の NMR 分析および MS 分析

I、 ^1H -NMR スペクトル ; II、 ^{13}C -NMR スペクトル ; III、HMBC スペクトル ; IV、MS スペクトル

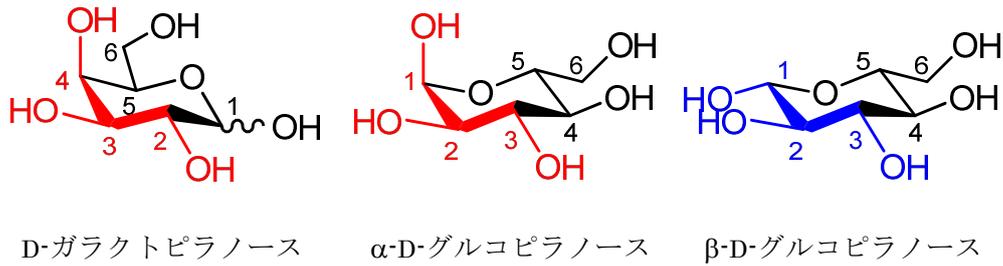


図 3-21 D-ガラクトピラノースおよびD-グルコピラノースの構造比較

グルコピラノースのα-アノマーのC-3からC-1までの立体配置はガラクトピラノースのC-2からC-4までの立体配置と重なり合うが、グルコピラノースのβ-アノマーでは重なり合わない。

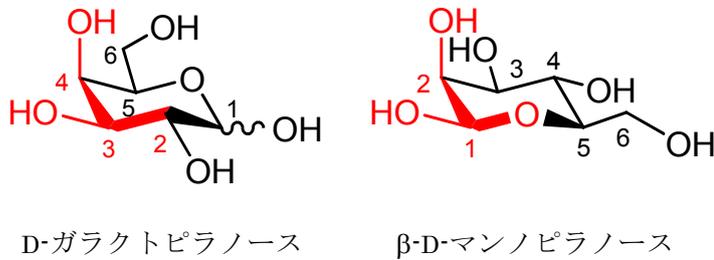


図 3-22 D-ガラクトピラノースおよびβ-D-マンノピラノースの構造比較

β-マンノピラノースの環酸素からC-2までの立体配置はガラクトピラノースのC-2からC-4までの立体配置と重なり合う。

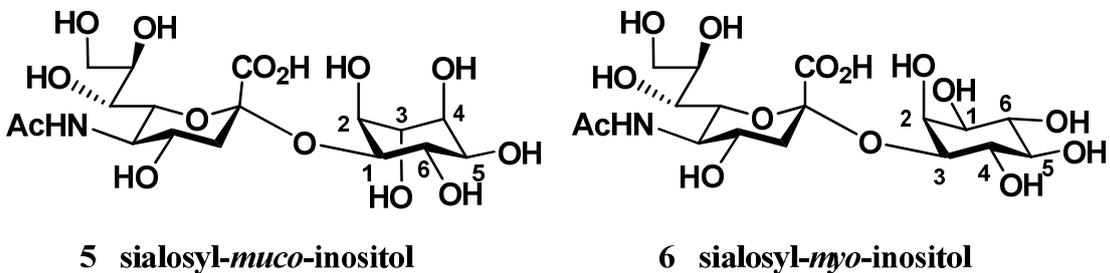


図 3-23 化合物 5 および化合物 6 の推定構造

rΔ23pspST3 の受容体基質特異性を考慮すると、Neu5Ac は *muco*-inositol の 1 位の水酸基に、*myo*-inositol の 3 位の水酸基に結合していると考えられる。

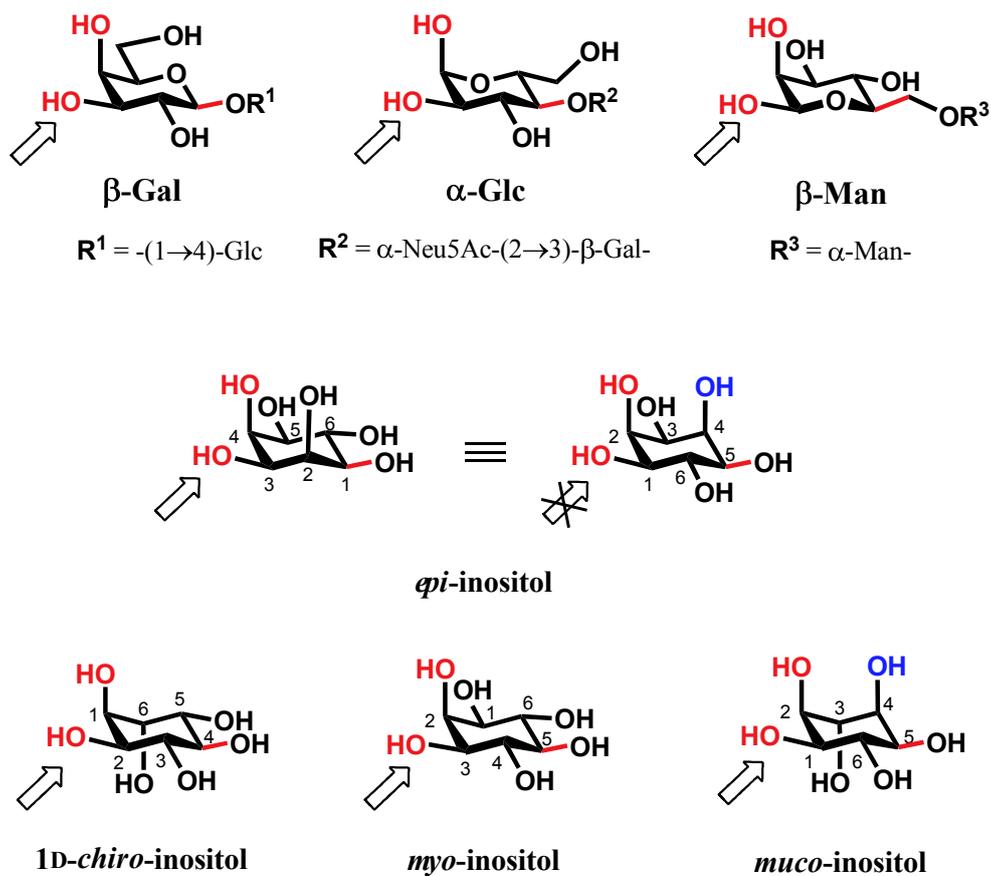


図 3-24 r Δ 23pspST3 の受容体基質間における構造類似性

矢印は Neu5Ac が転移する部位を示す。各基質間で共通する構造を赤色で示した。青色で示した構造は酵素反応に対して阻害的に作用すると考えられる。

4章 細菌由来シアル酸転移酵素の発現を目指した、バレイショ塊茎からの誘導性プロモーターの単離

植物におけるシアル酸 (Neu5Ac) の存在に関しては、ソバ (buckwheat) 中における Neu5Ac の存在が質量分析法により (Bourbouze et al. 1982)、アラビドプシス、タバコ、およびアルファルファの培養細胞においてシアリル化された糖質複合体の存在がレクチン染色により報告されている (Shah et al. 2003)。様々な植物において、シアル酸転移酵素をはじめとする、シアル酸の生合成等に関与する酵素タンパク質をコードしていると考えられる遺伝子の存在が示されており (Takashima et al. 2006、Daskalova et al. 2009)、イネゲノムにコードされているシアル酸転移酵素様ポリペプチド鎖は、*N*-アセチルラクトサミンのガラクトース残基にシアル酸を転移する活性を有していた (Takashima et al. 2006)。一方、アラビドプシスのゲノムにコードされる 3 種類ポリペプチド鎖では転移活性を有さないことが報告されている (Daskalova et al. 2009)。また Shah らの結果に関しても、否定的な意見が報告されている (Seveno et al. 2004) こと、Shah ら以外に植物において Neu5Ac の存在が示されていないこと、これまで植物で発現させたヒト由来糖タンパク質がシアル酸で修飾されていたという報告がないことから、現段階においても、植物におけるシアル酸の有無に関しては結論を得るに至っていない。

2 章での研究結果およびこれまでの報告から、海洋性細菌由来のシアル酸転移酵素は、①活性を有する組換え酵素タンパク質として発現させるのが容易である、②多様な糖受容体基質に対してシアル酸を転移させることができる等、動物由来のシアル酸転移酵素と比較して特異な性質を有していることが示されている。この細菌由来のシアル酸転移酵素の利用場面として、植物内在性オリゴ糖のシアル酸による修飾への適用、あるいは植物で生産させた有用タンパク質、特に治療用タンパク質の糖鎖修飾への適用は、学術的ばかりでなく産業的にも意義深いと考えられる。

幾つかの植物には非還元末端にガラクトースを有するオリゴ糖を含むものが存在する。

例えばセリ科ではウンベリフェロース ($\text{Gal}\alpha 1\text{-}2\text{Glc}\alpha 1\text{-}2\beta\text{Fru}$) が、マメ科の種子にはラフィノース ($\text{Gal}\alpha 1\text{-}6\text{Glc}\alpha 1\text{-}2\beta\text{Fru}$) が含まれる (Dey 1990)。これら 3 糖はいずれも、ショ糖を糖受容体基質としたガラクトシドである。また、ラフィノースの生合成経路におけるガラクトース供与体としてのガラクチノール ($\text{Gal}\alpha 1\text{-}1\text{-myo-inositol}$) も、ラフィノースを含む植物において一般的に見られる (Dey 1990)。これらガラクトース含有オリゴ糖は、前章において使用した *Photobacterium* sp. JT-ISH-224 株由来の組換え $\alpha 2,3$ -シアル酸転移酵素の糖受容体基質となりうる可能性が高いと考えている。

植物でヒト由来タンパク質を発現させ、植物体内でシアル酸を含むヒト型糖鎖を付加するためには解決すべき課題が幾つかある。植物ではシアル酸転移酵素および Neu5Ac は見つからない。仮に存在していたとしてもその酵素活性は極めて低レベルであると考えられ、このことからシアル酸転移酵素タンパク質をコードする遺伝子および Neu5Ac の生合成に関与する遺伝子 (群) も同時に (もしくは予め) 植物に導入する必要がある。Neu5Ac は動物細胞においては、まず UDP-*N*-アセチルグルコサミン (UDP-GlcNAc) 2-エピメラーゼ/*N*-アセチルマンノサミンキナーゼの作用により UDP-GlcNAc が *N*-アセチルマンノサミン (ManNAc) に変換される。合成された ManNAc は、キナーゼの作用により直ちに *N*-アセチルマンノサミン-6-リン酸 (ManNAc-6P) へとリン酸化される。次に *N*-アセチルノイラミン酸-9-リン酸 (Neu5Ac-9P) 合成酵素の作用により、ManNAc-6P とホスホエノールピルビン酸が縮合して Neu5Ac-9P が合成され、最後に Neu5Ac-9P に Neu5Ac-9P 脱リン酸化酵素が作用して Neu5Ac が合成される (Overviewed by Du et al. 2009)。これら Neu5Ac の生合成に関与する酵素をコードする遺伝子が植物ゲノム中に存在するという報告はない。

植物が本来有さない糖質関連酵素を植物体で発現させると、その生命活動において重要である代謝中間体の代謝において別の代謝経路を導入することになり、植物体の生育や生殖等に大きな影響を与え、場合によっては植物体を死に至らしめることがある。そこで、これら糖質関連酵素を発現させようとする場合、使用するプロモーターの選定は極めて重

要であると考えられる。従って、植物体の特定の生育時期および組織において特異的に機能するプロモーターを探索・単離することは、糖質関連酵素を植物体で発現させる上で重要となる。

こうした視点から本章では、外性の糖質関連酵素を植物体で発現させる際に有用なツールになると考えられるプロモーターの単離を目的とし、低温による誘導遺伝子の発現に着目した。材料には工業的な応用を考慮し、貯蔵物質を大量に蓄積するバレイショ塊茎に着目した。以下にその詳細を述べる。

4.1 材料と方法

4.1.1 植物材料

成熟したバレイショ塊茎は、圃場にて栽培した植物体 (*Solanum tuberosum* L. 品種トヨシロ) から収穫した。葉、茎、根、および未熟塊茎は、温室にて栽培した植物体のものを用いた。収穫した成熟塊茎は、暗所にて 3℃、6℃、9℃、12℃、15℃、および 20℃にて保存した。バレイショの試験管培養は、LS 寒天培地 (Linsmaier and Skoog, 1965) を用いて実施した。核酸調製用の植物体試料は、収穫後直ちに液体窒素下で微粉末になるまですりつぶし、抽出を行うまで -80℃にて保存した。

4.1.2 核酸抽出

ゲノム DNA は小鞠が記載した方法 (Komari 1989) により葉から抽出した。各器官からの全 RNA の抽出は、以下の方法に従って行った。凍結させた微粉末試料を、100 mM トリス塩酸 (pH9.0)、100 mM 塩化ナトリウム、1% SDS、および 1.44 M 2-メルカプトエタノールから成る 1.5 倍量 (V/W) の抽出バッファー中でホモジナイズを行い、得られたホモジネートを等量のフェノール:クロロホルム (1:1, v/v) 混合液で 3 回抽出を行った。抽出液に 1/20 容量の 5 M 塩化ナトリウムおよび 2.5 容量のエタノールを添加して核酸を沈殿さ

せた後、得られた沈殿物を少量の蒸留水にて溶解した。そして 1/3 容量の 10 M 塩化リチウムを添加して全 RNA を沈殿させた。ポリ (A)⁺RNA は Dynabeads mRNA Purification Kit (日本ダイナル) を用いて添付のプロトコールに従って調製を行った。

4.1.3 cDNA ライブラリーの構築とスクリーニング

cDNA ライブラリーは、4 °C で 7 ヶ月間貯蔵したバレイショ塊茎より単離したポリ (A)⁺RNA から cDNA Cloning System Lambda gt10 (アマシャム・ジャパン、現 GE ヘルスケア・ジャパン株式会社) を用いて作製した。約 10,000 の組換えファージのプラークをナイロン膜 (Hybond N+, アマシャム・ジャパン (現 GE ヘルスケア・ジャパン株式会社)) に転写させた後、³²P-dCTP および逆転写酵素を用いて標識した、2 種類の 1 本鎖 cDNA をプローブとしてディファレンシャルスクリーニングを行った。各々の cDNA プローブは、低温貯蔵 (4°C、7 ヶ月間) した、あるいは発達中のバレイショ塊茎より単離したポリ (A)⁺RNA より調製した。ハイブリダイゼーションおよび洗浄は、Church and Gilbert (1984) に記載の方法に従って実施した。

4.1.4 ノーザンおよびサザンプロット分析

全 RNA (1 レーン当り 3µg) は、グリオキサールジメチルスルホキシドを用いた変性条件下、1%アガロースゲルにて分画させた後、GeneScreen Plus 膜 (NEN Product) に転写させた。DNA (1 レーン当り 5µg) は、制限酵素で消化した後、0.8%アガロースゲルにて分画を行い、ナイロン膜 (Hybond N+, アマシャム・ジャパン、現 GE ヘルスケア・ジャパン株式会社) に転写させた。

核酸を転写させた膜は、前述の ³²P で標識した cDNA プローブを用いてハイブリダイズさせた。ノーザン分析のプレハイブリダイゼーション、ハイブリダイゼーション、および洗浄は、GeneScreen Plus 膜に添付のプロトコールに従って実施した。サザン分析は Church and

Gilbert (1984) の方法に従って実施した。オートラジオグラフィーは富士フィルム社のイメージング・プレートを用いて行った。得られたオートラジオグラムの解析は BAS1000 システム (富士フィルム) を用いて行った。

4.1.5 DNA 配列解析

cDNA クローンの塩基配列は、Taq DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit (パーキン・エルマー・バイオシステムズ) および DNA シーケンサー (モデル 373A、パーキン・エルマー・バイオシステムズ) を用いたジデオキシ法により決定した。塩基配列データは GENETYX プログラム (ゼネティックス) を用いて解析を行った。

4.2 結果

4.2.1 低温誘導性遺伝子の単離

4°C で 7 ヶ月間貯蔵したバレイショ塊茎より抽出・精製したポリ (A)⁺RNA を用いて作製した λ gt10 cDNA ライブラリーより、約 10,000 の組換えファージをディファレンシャルスクリーニングに供試したところ、低温貯蔵したバレイショ塊茎より調製したプローブに強くハイブリダイズしたが、発達中の塊茎より調製したプローブとはハイブリダイズしない cDNA クローンを 3 つ (CIP353、CIP56、および CIP622) 得た。これら 3 つの cDNA クローンの末端塩基配列を解析したところ、CIP56 および CIP622 の塩基配列は、各々バレイショのプロテアーゼインヒビター 1 および 2 をコードする遺伝子の塩基配列とほとんど同じであった。しかし、CIP353 の塩基配列は未知のポリペプチド鎖をコードしていた。

4.2.2 単離した cDNA に対応する転写産物の発現解析

CIP56、CIP622、および CIP353 に対応する転写産物の定常状態での発現をノーザン分析により解析したところ、CIP56 および CIP622 の発現は、発達中および低温 (3°C) 貯蔵し

た塊茎の両方で高く、発達中のバレイショの根、茎、および葉では低かった。一方、CIP353の転写産物の発現は、貯蔵した塊茎で特異的に高かった（図 4-1）。

4.2.3 CIP353 cDNA の塩基配列解析

ジデオキシ法による塩基配列の結果、単離した CIP353 cDNA クローンは 1132bp 長で、推定分子量 29.4kDa を有する 264 のアミノ酸残基をコードするオープンリーディングフレームを含んでいた。推定した CIP353 タンパク質のアミノ酸残基 97 番目と 153 番目の間の領域は、単一の AP2 ドメイン (Jofuku et al. 1994) を持つ (図 4-2 および 4-3)、共通の DNA 結合モチーフ (AP2/ERF ドメイン、Riechmann and Meyerowitz 1998、Fujimoto et al. 2000) と高い類似性を有していた。また、推定タンパク質は、アミノ酸残基 207 番目から 261 番目に酸性ドメインを、アミノ酸残基 91 番目から 98 番目に塩基性ドメインを含んでいた。更に、7つの連続するセリン残基から成るクラスター (アミノ酸残基 37 番目から 43 番目) が存在していた (図 4-2)。

4.2.4 貯蔵したバレイショ塊茎中における CIP353 の発現

様々な温度で貯蔵した塊茎中での CIP353 の転写をノーザン分析により解析したところ、その発現は 3℃で貯蔵した塊茎の 2 週間後から増加し始め、3 ヶ月の長期に渡って維持されていた (図 4-4)。この塊茎中での発現は 3℃貯蔵の 5 ヶ月後で最大となり、6 ヶ月間貯蔵した塊茎中においても高いレベルで転写産物が観察されていた。この CIP353 の高いレベルでの転写は 6℃で貯蔵した塊茎中でも認められたが、3℃で貯蔵した塊茎の転写と比較すると、そのレベルは低かった (図 4-4)。6℃で貯蔵した塊茎中における CIP353 転写物のレベルは貯蔵 2 - 4 週間後で最大となり、その後は減少した (図 4-4)。また、9℃以上で貯蔵した塊茎中での CIP353 の転写は、貯蔵期間中のどの時点においても増加しなかった (図 4-4)。3℃あるいは 6℃で 5 ヶ月間貯蔵した塊茎を 20℃に移すと、1 ヶ月以内

に CIP353 転写物は減少し始めた。逆に、20℃で5ヶ月間貯蔵した塊茎を3℃あるいは6℃に移すと、CIP353 転写物は増加を始めた (図 4-5)。

次に、低温が塊茎以外の器官における CIP353 遺伝子の転写に影響を及ぼすか否かを評価するために、試験管培養したバレイショ植物体を用いて低温処理実験を行った。葉、茎、および根における CIP353 転写物のレベルは、3℃で4週のインキュベーションの間増加し、茎において最も高いレベルで誘導された (図 4-6)。しかしながら、茎における増加の程度は、3℃で2週間あるいは4週間貯蔵した塊茎の増加の程度と比較すると、著しく低かった (図 4-6)。

4.2.5 バレイショにおける CIP353 遺伝子のコピー数

CIP353 の完全長 cDNA をプローブに用いて、遺伝子のコピー数をサザンブロット分析により解析したところ、1から3つのバンドが検出された (図 4-7)。このことから CIP353 をコードする遺伝子はハプロイドあたり 1~2 コピーであると推察した。

4.2.6 ゲノムクローンの単離と配列解析

CIP353 の完全長 cDNA をプローブに用いて、約 80 万のゲノムライブラリーのスクリーニングを行い、2種類の遺伝子 *cip353a* および *cip353b* を単離した。これら遺伝子の制限酵素地図を図 4-8 に示す。各遺伝子に含まれているコード領域の塩基配列を解析したところ、*cip353a* では CIP353 の cDNA 配列と完全に一致したが、*cip353b* では CIP353 の cDNA とは異なる配列を一部有していた (図 4-9)。コード領域の上流域の配列においても同様の傾向を示した。これらの結果から *cip353a* は CIP353 をコードする遺伝子と同定した。*cip353a* クローンの5'上流域の配列の特徴として、TATA ボックスの上流に TAACRRA 配列が3ヶ所存在していた (図 4-10)。この配列はイネや小麦、大麦の α -アミラーゼ遺伝子の5'上流域中に見られるジベレリン応答性に関与するシスエレメントのコア配列であることが報

告されている (Huang et al. 1990、Skriver et al. 1991、Rogers and Rogers 1992)。

4.3 考察

4.3.1 バレイショ塊茎の低温誘導性遺伝子

低温貯蔵したバレイショ塊茎からディファレンシャルスクリーニングにより、3つの cDNA クローンを単離した。このうち2つのクローン、CIP56 および CIP622 は、各々プロテアーゼインヒビター (PI) 1 および 2 をコードしていると考えられた。残りの1つ、CIP353 は新規なポリペプチド鎖をコードしていた。ノーザン分析により、CIP56 (PI1) および CIP622 (PI2) 遺伝子は、発達中のバレイショ植物体において、塊茎特異的に発現していることを明らかにするとともに、これらの転写物は低温貯蔵した塊茎で最も高いレベルを示した (図 4-1)。しかし、これらの遺伝子は低温条件にない発達中の塊茎でも発現量は高く、低温貯蔵に使用した塊茎は完全に成熟したものであったため、この結果は、両遺伝子転写産物は低温により蓄積したのではなく、単に塊茎の発達中に蓄積したことを反映しているだけかもしれない (Hendriks et al. 1991)。一方、CIP353 の転写物レベルは、4°C で貯蔵した成熟塊茎中でのみ高く、発達中の塊茎および発達中のバレイショ植物体の他の器官においては低かった。そこで、このような特異な性質を示した CIP353 遺伝子に関して、更に詳細な解析を行った。

多くの低温誘導性遺伝子は、2°C から 10°C の間の低温により発現が誘導されることが示されている (Guy 1990)。従って、CIP353 転写物のレベルが低温条件により上昇するか否か、また、もし CIP353 遺伝子の転写物が低温誘導性であるならば、どのような温度条件がその転写物のレベルに影響を及ぼすかを評価する必要がある。

ノーザンブロット分析により、CIP353 遺伝子は 3°C あるいは 6°C で貯蔵した塊茎において発現が誘導されるが、9°C 以上の温度では発現が誘導されないことを明らかにした (図

4-4)。また、6℃で貯蔵した塊茎における転写の誘導は、貯蔵期間を通して3℃で貯蔵した塊茎における転写の誘導よりも弱いことを示した。これらの結果は CIP353 遺伝子が低温誘導性であり、6℃という温度が塊茎中での CIP353 遺伝子の転写誘導の閾値であることを示している。更に、3℃あるいは6℃で貯蔵した成熟塊茎中での転写物の蓄積が、高温（20℃）に曝すことにより妨げられ、20℃で貯蔵した塊茎中での転写レベルが3℃あるいは6℃で低温処理を行うことにより上昇した（図 4-5）。従って、CIP353 遺伝子は温度依存性の低温誘導性遺伝子であると考えられた。

CIP353 遺伝子の転写レベルが、発達中の植物体の様々な器官と比較して、低温貯蔵した塊茎中でより高いことについては既に述べたが、その低温誘導性に関しても同じ傾向を示した（図 4-6）。従って、CIP353 遺伝子の転写は、低温貯蔵した塊茎で特異的であると言える。

低温誘導性のタンパク質をコードする cDNA クローンは、これまでにバレイショ（van Berkel et al. 1994、Kirch et al. 1997）を含む様々な植物体より数多く単離されている（Thomashow 1998）。van Berkel ら（1994）は、バレイショ塊茎中の低温誘導性タンパク質を、二次元電気泳動のプロファイルに基づいて4つの異なるグループに分類した。一つ目は塊茎を4℃で貯蔵した後に直ちに増加し、3日以内で発現が最大に達するグループ1のタンパク質。二つ目は貯蔵して1週間以内では発現が増加しないグループ2のタンパク質。三つ目は貯蔵して1～2週の間、蓄積を続けているグループ3のタンパク質。そして四つ目は低温処理2週間以内に一過的に誘導されるグループ4のタンパク質である。この著者らは前述のグループ1、3、および4のタンパク質に相当する遺伝子の単離に関して報告していたが、CIP353 転写物の増加は低温貯蔵して2週間後より始まり、低温貯蔵下で3ヶ月以上に渡り増加し続けていた（図 4-4）。van Berkel ら（1994）の分類に従うと、本研究で単離した CIP353 の遺伝子発現パターンは、それまでにまだ cDNA クローニングされたものがなかったグループ2に含まれる。CIP353 のタンパク質発現パターンを調べるまでは

確定的ではないが、グループ 2 に含まれる可能性があるタンパク質としては、筆者の知る限りでは、最初の例である。

4.3.2 単離した CIP353 cDNA 遺伝子の配列上の特徴

図 4-3 に示したように、CIP353 の cDNA より推定されるアミノ酸配列の中央部分（アミノ酸残基 97 から 153）は、DNA 結合モチーフである AP2/ERF ドメイン (Riechmann and Meyerowitz 1998、Fujimoto et al. 2000、van der Fits and Memelink 2001) と高い類似性を示した。AP2/ERF ドメインは植物の調節因子であり、アラビドプシスの AtERFs (Fujimoto et al. 2000) やニチニチソウ (*Catharanthus roseus*) の ORCAs (van der Fits and Memelink 2001)、およびタバコ (*Nicotiana tabacum*) の NtEREBPs (ethylene responsible element binding proteins、Ohme-Takaki and Shinshi 1995) 等が含まれる。塩基配列から推定される CIP353 タンパク質は、AP2/ERF ドメインを有する様々なタンパク質がそうであるように、単一の AP2 ドメイン (Jofuku et al. 1994) を有していた (図 4-2)。この配列上の特徴は、CIP353 タンパク質が AP2/ERF サブファミリー (Riechmann and Meyerowitz 1998) のメンバーであることを示している。一方、AP2 サブファミリーに属するタンパク質は 2 つの AP2 ドメインを有している (van der Fits and Memelink 2001)。

塩基配列から推定される CIP353 タンパク質は、以下の配列上の特徴を有していた (図 4-3)。

- ① GCC ボックス (Fujimoto et al. 2000) 内に核酸と相互作用するための必須アミノ酸残基を含む。
- ② 活性ドメインとして機能すると考えられる 2 つの酸性ドメイン (アミノ酸残基 24 から 46、および 207 から 261) を含む。
- ③ 核移行シグナル (Riechmann and Meyerowitz 1998) として機能すると考えられる塩基性ドメイン (アミノ酸残基 91 から 98) を含む。

④ セリン残基に富んだクラスター（アミノ酸残基 37 から 43）が存在する。

上記特徴の中で、セリン残基に富んだクラスターは、幾つかの AP2/ERF ファミリータンパク質中に見出されており（Riechmann and Meyerowitz 1998）、転写の活性化に関与している可能性を示唆している。従って、CIP353 タンパク質は AP2/ERF ドメインを有する調節因子の一つであり、低温で長期間貯蔵したバレイショ塊茎中での遺伝子発現を制御していることが考えられる。

4.3.3 CIP353 遺伝子の特徴

今回 cDNA クローニングした CIP353 は、サザンブロット分析により少なくとも 1~2 コピー存在するが、実際に当該遺伝子を含むゲノム DNA 断片も 2 種取得できた。今後は CIP353 と一致する上流 DNA について、発現用プロモーターとして利用する予定であるが、取得した領域だけで塊茎特異的な低温誘導性といった特徴を有するか否かは今後の検討課題である。

今回、貯蔵器官として有名なバレイショ塊茎より、低温条件下で塊茎特異的に発現する遺伝子およびそのプロモーター領域を含むと予想されるゲノムクローンを単離した。転写産物の発現解析より、この遺伝子の発現が、塊茎において温度条件により ON/OFF されること、および低温下で長期に渡って誘導されることを明らかにした。将来的には 2 章および 3 章で報告した海洋性細菌由来のシアル酸転移酵素遺伝子をバレイショ塊茎中で発現させるため、本章で得られたゲノム DNA 断片を利用して発現系を構築していく予定である。

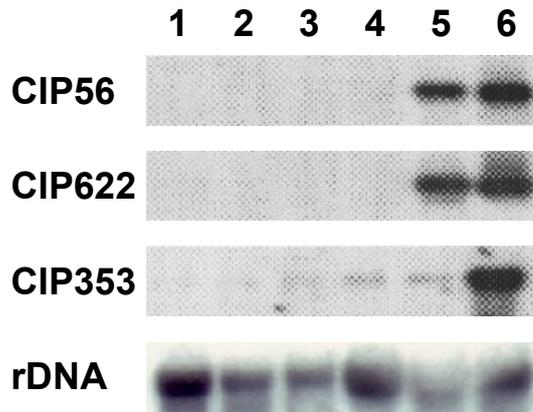


図 4-1 バレイショにおける CIP56、CIP622、および CIP353 転写物の蓄積

全 RNA (1 レーン当り 3 μ g) を変性条件下で電気泳動を行い、膜に転写後、³²P で標識した各々の cDNA 断片をプローブに用いてハイブリダイズさせた。25S rDNA はコントロール。RNA は葉 (レーン 1)、茎 (レーン 2)、根 (レーン 3)、培養細胞 (レーン 4)、発達中の塊茎 (レーン 5)、および 4°C で 7 ヶ月間貯蔵した塊茎 (レーン 6) より調製した。

```

CTTTCAC TCAAAAAAAAAAGGAAAAAAAAATTAAGAGTAACAAAAGATGTGTGGAGGTGCCA    60
                                     M C G G A I    6

TAATCTCCGATTATGAGCCCGCCGAAACTTCTACCGAAACTCTCTGCTCGTGACCTGT    120
  I S D Y E P A G N F Y R K L S A R D L W    26

GGGCTGAGCTGGACCCTATCTCCGACTACTGGTCCTCTCCTCCTCATCCTCAACTGTGCG    180
  A E L D P I S D Y W S S S S S S S T V E    46

AAAACCTTATTCCGCTCAGTCGCCGGTGACTCACTCCGTCGATAAGCCTAAGAAATCAG    240
  N P Y S A Q S P V T H S V D K P K K S D    66

ATTCCGGCAAATCTAATCAACTCAAAAAAGGTAATAAGACTGTGAAGGTTGAGAAGGAGA    300
  S G K S N Q L K K G N K T V K V E K E K    86

AGAGTACTGGACCAAGGCAGAGAAAAGAACAAGTACAGAGGAATAAGGCAGAGACCATGGG    360
  S T G P R Q R K N K Y R G I R Q R P W G    106
  ── ── ── ── ── ──

```

GAAAATGGGCTGCTGAGATTCGCGATCCTCAGAAGGGTGTCCGTGTTGGCTTGGTACAT	420
K W A A E I R D P Q K G V R V W L G T F	126
TCAACACAGCAGAGGATGCTGCCAGAGCCTATGATGAGGCTGCTAAGCGCATTTCGTGGTA	480
N T A E D A A R A Y D E A A K R I R G N	146
ACAAGGCCAAACTCAACTTCCCTGCCCATCACCTGCTAAGCGACAGTGCCTAGCA	540
K A K L N F P A P S P P A K R Q C T S T	166
CTGTCGCTGCTGATCCTCCACCAGCACTACTCCTTGAGAGTTCTAACATAATATCTTATA	600
V A A D P P P A L L L E S S N I I S Y N	186
ACAATTCTCCTTTAATGAACTTCGGATATGATGTTTCAGAGCCAAACTCCCTACTACCCAA	660
N S P L M N F G Y D V Q S Q T P Y Y P M	206
TGGAAATGCCGTTGCTAGTGATGATTATGAACTCAAGGAACAGATTTCCAACTTGGAAAT	720
<u>E M P V A S D D Y E L K E Q I S N L E S</u>	226
CGTTCCTGGAATTGGAGCCAGCAGATTCATCTGATCAGTTTTTCAGGGATCGTCGATCCTG	780
<u>F L E L E P A D S S D Q F S G I V D P D</u>	246
ATCCTCTTAATGTTTTTCTGATGGAGGATTTTGCTTCAACTCAGCATCAGTTCTATTGAT	840
<u>P L N V F L M E D F A S T Q H Q F Y *</u>	264
CCTGAGTTGTTGGTGAGTGATGAGTGACTAGTTTATTAGCTTTTGGCTGTAGTAGTAGT	900
AATAGAGAAAAAAGTACATATGATATGATAATAATAAGTTGCGTGCCTTAGCCTGCAATT	960
GTAATAGTATCAATGTTTGTGTCTTGTGTTGTTTATGCTTTCTAAATCTGGATTACC	1020
TTATAATGTTTGGTCATTTGGTGTATGTATTGTAACCTATATATGGAGTACTTTATTACTA	1080
AA	1132

図 4-2 CIP353 cDNA の塩基配列と推定アミノ酸配列

右側に記した数字は核酸（上）およびアミノ酸（下）の位置を示す。アスタリスク（*）は終止コドンを示す。AP2/ERF ドメイン（図 4-3 を参照）を白抜き文字のボックスで示す。二重下線（ ）はセリンクラスターである。下線（ ）は推定タンパク質の C 末端酸性領域である。破線（ ）は核移行シグナルとして機能すると考えられる塩基性ドメインを示す。

Consensus . YRGVR. . RPWGK. AAEIRDP. K. G. RVWLGTF. TAEEAA. AYD. AA. . . RG. KA. LNF

CIP353	96	KYRGIRQ-RPWGKWAAEIRDPQK-GVRVWLGTFNTAEDAARAYDEAAKRIIRGNKAKLNFP	153
RAP2.3	101	VYRGIRK-RPWGKWAAEIRDPRK-GVRVWLGTFNTAEEAAMAYDVAAKQIRGDKAKLNFP	135
DREB1A	50	YYRQVRR-RNSGKWVCEVREPNK-KTRIVWLGTFQTAEMAARAHVVAALALRGRSACLNFA	107
DREB2A	78	SFRGVRQ-RIWGWVAEIREPNR-GSRVWLGTFPTAQEAASAYDEAAKAMYGPLARLNFP	125
EREBP1	104	HYRQVRR-RPWGKFAAEIRDPKNGARVWLGTYETDEEAALAYDKAAYRMRSKAHLNFP	162
Pti4	105	HYRQVRR-RPWGKFAAEIRDPKNGARVWLGTYETAEAAALAYDKAAYRMRSKAHLNFP	163

図 4-3 CIP353 および他の AP2/ERF ドメインタンパク質のアミノ酸配列比較

アラビドプシス RAP2.3 (Okamuro et al. 1997) ; アラビドプシス DREB1A および DREB2A (Liu et al. 1998) ; タバコ EREBP1 (Ohme-Takagi and Shinshi 1995) ; およびトマト Pti4 (Zhou et al. 1997)。保存されているアミノ酸を影抜きで示している。AP2/ERF ドメインの保存配列 (Riechmann and Meyerowitz 1998、Fujimoto et al. 2000) をアライメントの上部に示す。コンセンサス配列中の下線で示したアミノ酸は、GCC ボックス内の核酸と相互作用するアミノ酸残基を表す。整列を最大化させるためにギャップ (-) を挿入している。

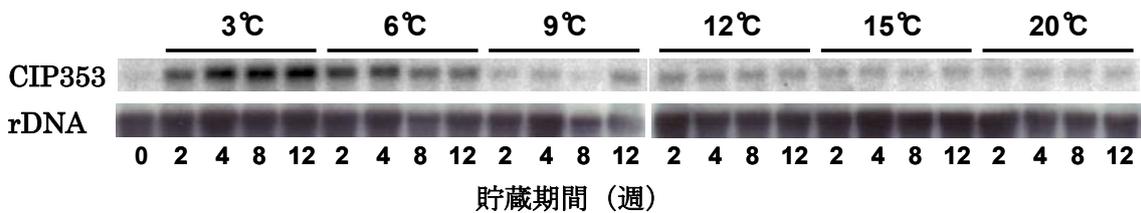


図 4-4 貯蔵したバレイショ塊茎中における CIP353 遺伝子の温度依存的な転写

図に示した期間および温度で貯蔵したバレイショ塊茎より調整した全 RNA を各々 3μg 供試し、³²P で標識した CIP353 の cDNA をプローブに用いてノーザンブロット分析を行った (上段)。分析に使用した膜を用いて、コントロールとして 25S rDNA の転写物のリプロービングを行った (下段)。

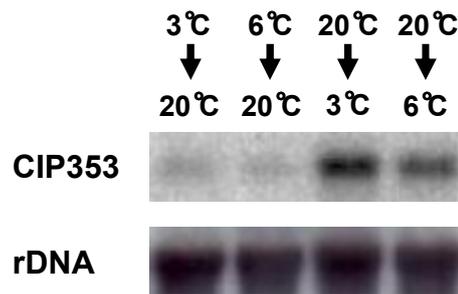


図 4-5 *CIP353* 遺伝子の転写の「シフトバック」実験

バレイショ塊茎を上段に示す温度で 5 ヶ月間貯蔵した後、下段に示す温度に移して 1 ヶ月間貯蔵した。このように貯蔵した塊茎から RNA を調整し、各レーン当り 3 μ g を供試して 32 P で標識した *CIP353* cDNA をプローブに用いてノーザンブロット分析を行った。分析に使用した膜を用いて、コントロールとして 25S rDNA の転写物のリプロービングを行った。

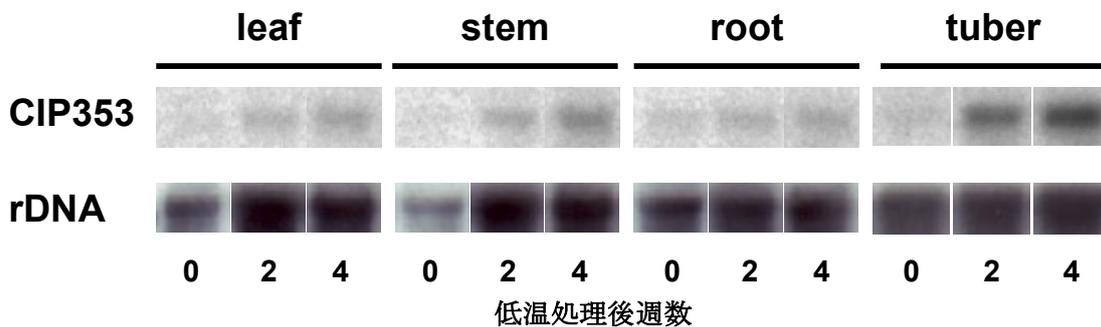


図 4-6 3 $^{\circ}$ C で培養したバレイショ植物体における *CIP353* 転写物の蓄積

バレイショの単一節切片を、3,000 ルクス照明 16 時間の日長条件下、20 $^{\circ}$ C で 4 週間無菌培養した。植物体を同じ光条件下、3 $^{\circ}$ C で更に 2 週間あるいは 4 週間培養した後、葉、茎、および根から全 RNA を調整した。塊茎の RNA サンプルは、温室で生育させた植物体から調整した。各レーン当り 3 μ g の全 RNA を供試し、 32 P で標識した *CIP353* cDNA をプローブに用いてノーザンブロット分析を行った。分析に使用した膜を用いて、コントロールとして 25S rDNA の転写物のリプロービングを行った。

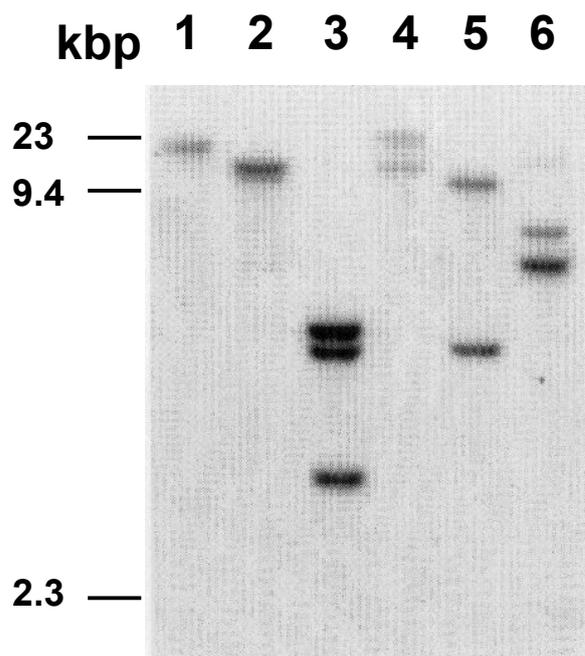


図 4-7 *CIP353* 遺伝子のサザンプロット分析

バレイショ (品種トヨシロ) の葉よりゲノム DNA を調整し、5 μ g を *Bam*HI (レーン 1)、*Bg*II (レーン 2)、*Eco*RI (レーン 3)、*Eco*RV (レーン 4)、*Hind*III (レーン 5)、あるいは *Xba*I (レーン 6) で消化させた。電気泳動後、ナイロン膜に転写させ、 32 P で標識した *CIP353* cDNA をプローブに用いて検出を行った。

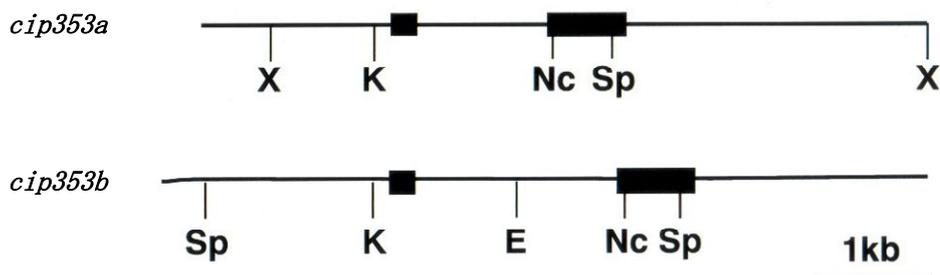


図 4-8 単離した 2 種類の遺伝子 *cip353a* および *cip353b* の制限酵素地図

CIP353 cDNA に対応すると考えられる領域 (エクソン領域) をボックスで示した。
E ; *Eco* RI、K ; *Kpn* I、Nc ; *Nco* I、Sp ; *Spe* I、X ; *Xba* I

CIP353	1	CTTCTACTCAAAAAAA--AAAAGGAAA--AAATTAAGAGTAACAAAAATGTGTGGAGGTGCCATAATCTCCGATTATGA	76
cip353a	1	CTTCTACTCAAAAAAA--AAAAGGAAA--AAATTAAGAGTAACAAAAATGTGTGGAGGTGCCATAATCTCCGATTATGA	76
cip353b	1	CTTCTACTCAAAAAAA--AAAAGGAAA--AAATTAAGAGTAACAAAAATGTGTGGAGGTGCCATAATCTCCGATTATGA	80
CIP353	77	GCCCCCGGAAACTTCTACCGGAAACTCTCTGCTCGTGACCTGTGGGCTGAGCTGGACCCATCTCCGACTACTGGTCCT	156
cip353a	77	GCCCCCGGAAACTTCTACCGGAAACTCTCTGCTCGTGACCTGTGGGCTGAGCTGGACCCATCTCCGACTACTGGTCCT	156
cip353b	81	GCCCCCGGAAACTTCTACCGGAAACTCTCTGCTCGTGACCTGTGGGCTGAGCTGGACCCATCTCCGACTACTGGTCCT	160
CIP353	157	CTTCCTCCTCATCCTCAACTGTCGAAAAACCTTATTCCGCTCAGTCGCCGGTGACTCACTCCGTCGATAAGCCTAAGAAA	236
cip353a	157	CTTCCTCCTCATCCTCAACTGTCGAAAAACCTTATTCCGCTCAGTCGCCGGTGACTCACTCCGTCGATAAGCCTAAGAAA	236
cip353b	161	CTTCCTCCTCATCCTCAACTGTCGAAAAACCTTATTCCGCTCAGTCGCCGGTGACTCACTCCGTCGATAAGCCTAAGAAA	240
CIP353	237	TCAGATTCCGGCAAATCTAATCAACTCAAAAAAGGTAATAAGACTGTGAAGGTTGAGAAGGAGAAGAGTACTGGACCAAG	316
cip353a	237	TCAGATTCCGGCAAATCTAATCAACTCAAAAAAGGTAATAAGACTGTGAAGGTTGAGAAGGAGAAGAGTACTGGACCAAG	316
cip353b	241	TCAGATTCCGGCAAATCTAATCAACTCAAAAAAGGTAATAAGACTGTGAAGGTTGAGAAGGAGAAGAGTACTGGACCAAG	320
CIP353	317	GCAGAGAAAGAACCAAGTACAGAGGAATAAGGCAGAGACCATGGGAAAAATGGGCTGCTGAGATTCCGATCCTCAGAAAG	396
cip353a	317	GCAGAGAAAGAACCAAGTACAGAGGAATAAGGCAGAGACCATGGGAAAAATGGGCTGCTGAGATTCCGATCCTCAGAAAG	396
cip353b	321	GCAGAGAAAGAACCAAGTACAGAGGAATAAGGCAGAGACCATGGGAAAAATGGGCTGCTGAGATTCCGATCCTCAGAAAG	400
CIP353	397	GTGTCGCTGTTTGGCTTGGTACATTCAACACAGCAGAGGATGCTGCCAGAGCCTATGATGAGGCTGCTAAGCGCATTCCT	476
cip353a	397	GTGTCGCTGTTTGGCTTGGTACATTCAACACAGCAGAGGATGCTGCCAGAGCCTATGATGAGGCTGCTAAGCGCATTCCT	476
cip353b	401	GTGTCGCTGTTTGGCTTGGTACATTCAACACAGCAGAGGATGCTGCCAGAGCCTATGATGAGGCTGCTAAGCGCATTCCT	480
CIP353	477	GGTAACAAGGCCAAACTCAACTCCCTGCCCATCACCCTGCTAAGCGACAGTGCATAGCACTGTCGCTGCTGATCC	556
cip353a	477	GGTAACAAGGCCAAACTCAACTCCCTGCCCATCACCCTGCTAAGCGACAGTGCATAGCACTGTCGCTGCTGATCC	556
cip353b	481	GGTAACAAGGCCAAACTCAACTCCCTGCCCATCACCCTGCTAAGCGACAGTGCATAGCACTGTCGCTGCTGATCC	560
CIP353	557	TCCACCAGCACTACTCCTTGAGAGTTCTAACATAATATCTTATAACAATTCCTCTTAATGAACTTCGGATATGATGTTT	636
cip353a	557	TCCACCAGCACTACTCCTTGAGAGTTCTAACATAATATCTTATAACAATTCCTCTTAATGAACTTCGGATATGATGTTT	636
cip353b	561	TCCACCAGCACTACTCCTTGAGAGTTCTAACATAATATCTTATAACAATTCCTCTTAATGAACTTCGGATATGATGTTT	640
CIP353	637	AGAGCCAACTCCCTACTACCCAATGGAAATGCCCGTTGCTAGTGATGATTATGAACTCAAGGAACAGATTTCCAACTTG	716
cip353a	637	AGAGCCAACTCCCTACTACCCAATGGAAATGCCCGTTGCTAGTGATGATTATGAACTCAAGGAACAGATTTCCAACTTG	716
cip353b	641	AGAGCCAACTCCCTACTACCCAATGGAAATGCCCGTTGCTAGTGATGATTATGAACTCAAGGAACAGATTTCCAACTTG	720
CIP353	717	GAATCGTTCCTGGAATTGGAGCCAGCAGATTCATCTGATCAGTTTTTCAGGGATCGTCGATCCTGATCCTCTTAATGTTTT	796
cip353a	717	GAATCGTTCCTGGAATTGGAGCCAGCAGATTCATCTGATCAGTTTTTCAGGGATCGTCGATCCTGATCCTCTTAATGTTTT	796
cip353b	721	GAATCGTTCCTGGAATTGGAGCCAGCAGATTCATCTGATCAGTTTTTCAGGGATCGTCGATCCTGATCCTCTTAATGTTTT	800
CIP353	797	TCTGATGGAGGATTTTGTCAACTCAGCATCAGTTCTATTGATCCTGAGTTGTTGGTGAGTGATGAGTGACTAGTTTA	876
cip353a	797	TCTGATGGAGGATTTTGTCAACTCAGCATCAGTTCTATTGATCCTGAGTTGTTGGTGAGTGATGAGTGACTAGTTTA	876
cip353b	801	TCTGATGGAGGATTTTGTCAACTCAGCATCAGTTCTATTGATCCTGAGTTGTTGGTGAGTGATGAGTGACTAGTTTA	880
CIP353	877	TTAGCTTTTGGCTGTAGTAGTAGTA--ATAGAGAAAAAA--GTACATATGATATGATAATAAAGTTGCGTGCCTTAGC	952
cip353a	877	TTAGCTTTTGGCTGTAGTAGTAGTA--ATAGAGAAAAAA--GTACATATGATATGATAATAAAGTTGCGTGCCTTAGC	952
cip353b	881	TTAGCTTTTGGCTGTAGTAGTAGTA--ATAGAGAAAAAA--GTACATATGATATGATAATAAAGTTGCGTGCCTTAGC	960
CIP353	953	CTGCAATTGTAATAGTATCAATGTTTGTGCTTGTGTTTATGCTTCTAAATCTTGGATTACCTTATAATGTTTG	1032
cip353a	953	CTGCAATTGTAATAGTATCAATGTTTGTGCTTGTGTTTATGCTTCTAAATCTTGGATTACCTTATAATGTTTG	1032
cip353b	961	CTGCAATTGTAATAGTATCAATGTTTGTGCTTGTGTTTATGCTTCTAAATCTTGGATTACCTTATAATGTTTG	1040
CIP353	1033	GTCAATTGGTGTATGTATTGTAACATATATGGAGTACTTTATTACTA-----	1112
cip353a	1033	GTCAATTGGTGTATGTATTGTAACATATATGGAGTACTTTATTACTA-----	1079
cip353b	1041	GTCAATTGGTGTATGTATTGTAACATATATGGAGTACTTTATTACTA-----	1088
CIP353	1113	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	1132
cip353a	1079	-----	1079
cip353b	1088	-----	1088

図 4-9. CIP353 の cDNA と 2 種類のゲノムクローン間の塩基配列の比較

2 つ以上の配列間で保存されている塩基を枠で囲った。下線 () は翻訳開始コドンおよび終始コドンを示す。 *cip353a* の配列は cDNA と完全に一致したが、 *cip353b* の配列中には塩基置換が存在した。

-360 TAGAAATAAAATAATAAATTTACTATATCAATTATTTTTTTAACAAATATATTAAGTCAA
 -300 AGATGAATAAGTAAATACTAAATAGTGACAGAGCGTATATGAATAAGTAAATAGTAAGAG
 -240 AGGGAGTATATACTACATATTCGTAACGGAAGCACTAATCCAATGTGCTTTTAACAGA
 -180 CAACAATTGTCGAAATTGCGTGAATTTTATGTAAAGGTACCATAAGTGAACAATTCAAGA
 -120 AGTTTTAGGTTGTATATGCTAGATGAATTATCTAAGAGGTACAAGATTAAGTAATGAA
 -60 TTACTAAGGGACTACACTGCAAATATCCTTTCCTATAAATTAACACTCACCCCAAGCACA
 1 ATTTTATCGTCTCTTTCAATTACTTTCACTCAAAAAAAAAAAGGAAAAAATTAAGAGTAA
 61 CAAAAGATGTGGAGGTGCCATAATCTCCGATTATGAGCCCGCCGAAACTTCTACCGG

図 4-10 *cip353a* の翻訳開始点近傍の塩基配列

翻訳開始点を白抜き文字で、プライマー伸張法により決定した転写開始点をふと文字で示した。二重下線 () は α -アミラーゼ遺伝子の 5'上流域中で見られるジベレリン応答性に関与するシスエレメントのコア配列である TAACRRA (R = A あるいは G)。

5章 結論

Photobacterium leiognathi JT-SHIZ119 株が有する α 2,6-シアル酸転移酵素をコードする遺伝子を単離した。単離した遺伝子から推定されるタンパク質の一次構造は、既に報告されている *P. leiognathi* JT-SHIZ-145 株の α 2,6-シアル酸転移酵素の一次構造と 95%一致した。単離した遺伝子が大腸菌で活性を有する組換え酵素タンパク質として発現させ、精製した酵素タンパク質について解析を行ったところ、本酵素はシアル酸転移酵素活性のみならず、 α 2,6-結合したシアル酸に特異的に作用するシアリダーゼ活性をも有する、2 機能性酵素であることを明らかにした。この知見は、 α 2,6-シアル酸転移酵素が 2 種類の活性を示す最初の報告である。本酵素を用いることにより、複合糖質糖鎖へのシアル酸修飾が容易化され、その機能研究が加速されることが期待される。

Photobacterium sp. JT-ISH-224 株由来の組換え α 2,3-シアル酸転移酵素 Δ 23psp23ST を用いた研究からは、ラクトースに Neu5Ac を 2 分子転移させて 2,3'-ジシアリルラクトースを合成することが可能であることを見出した。そしてこの化合物が α -アノマー型でのみ水溶液中で存在することから、酵素が α -グルコピラノースの 3 位から 1 位の水酸基の立体配置を、ガラクトピラノースの 2 位から 4 位の水酸基の立体配置として認識することにより、 α -グルコピラノースの 2 位の水酸基に Neu5Ac を転移しているという仮説をたてた。この仮説を検証するために、マンノースや 6-マンノビオース、更には各種イノシトールを受容体基質に用いて合成反応を行い、得られた産物の構造解析を行った結果、ガラクトピラノースの 2 位から 4 位の水酸基の立体配置と重ね合わせることができる化合物から産物が得られることを明らかにし、前述の仮説が正しいことを示した。産物を得ることができた受容体基質の構造を比較すると、 β -ガラクトピラノースの 3 位および 4 位の水酸基の立体配置およびアノマー位のエクアトリアル配置が共通していた。本研究により明らかとなった *Photobacterium* sp. JT-ISH-224 株由来の組換え α 2,3-シアル酸転移酵素 Δ 23psp23ST が受

容体基質として認識する構造を図 5-1 に示す。

イノシトールは、様々な植物や我々ヒトをはじめとする動物中で、普遍的に存在する化合物である。そのリン酸化物は、真核細胞においてセカンドメッセンジャーとして重要な機能を有していることが示されている (Berridge et al. 1984, Shen et al. 2003)。本研究で合成することができたシアリルイノシトールならびに各種シアリル化糖鎖が、新しい生物学的機能を示すことを期待する。

低温貯蔵したバレイショ塊茎より、低温誘導性遺伝子 CIP353 の cDNA を単離した。そして CIP353 転写物の発現解析から、本転写物は 6℃以下の低温下で貯蔵したバレイショ塊茎ではほぼ特異的に発現していることを示した。この結果は、CIP353 遺伝子のプロモーターが、低温貯蔵した塊茎で特異的に機能していることを示している。以上より、CIP353 遺伝子のプロモーターの下流に糖転移酵素等をコードしている遺伝子を連結してバレイショに導入することにより、糖転移酵素等のタンパク質を、生育中のバレイショ植物体では発現させずに、収穫後に 6℃以下の低温で貯蔵した塊茎中でのみ発現させることができる可能性が期待された。また形質転換植物を増殖する場合には、塊茎を常温に戻して 1 ヶ月間放置することにより導入タンパク質（酵素）の発現を抑制させることができるため、その後種イモとして使用すれば、発芽等の植物の初期成育にも大きな影響を与えることなく栽培することが可能であろう。

幾つかの植物には非還元末端にガラクトースを有するオリゴ糖を含むものが存在することが報告されている (Dey 1990)。これらガラクトース含有オリゴ糖は *Photobacterium* sp. JT-ISH-224 株由来の組換え α 2,3-シアル酸転移酵素の糖受容体基質となる可能性が高い。バレイショにおいてこれらガラクトース含有オリゴ糖の存在を示す報告例はないが、代謝中間体として単糖のガラクトースは細胞内に存在する。*Photobacterium* sp. JT-ISH-224 株由来

の組換え α 2,3-シアル酸転移酵素は、単糖のガラクトースにもシアル酸を転移することが示されている (Tsukamoto et al. 2008) ことから、上述の形質転換バレイショを作成することにより、バレイショ塊茎中においてシアリルガラクトースを合成できる道をつけたものと考えている。

以上、本博士論文研究により、シアル酸含有糖鎖の機能解明にとって有用なツールになることが期待できる、*Photobacterium leiognathi* JT-SHIZ119 株由来の 2 機能性 α 2,6-シアル酸転移酵素を発見した。また、*Photobacterium* sp. JT-ISH-224 株由来の α 2,3-シアル酸転移酵素が多様なシアル酸含有糖鎖を合成できるとともに、同酵素の受容体基質として作用する場合に必須と考えられる立体配置を明らかにした。また、これらシアル酸転移酵素を植物細胞で発現させる場合に利用できるであろう誘導性プロモーターをバレイショより単離し、その応用展開に道筋をつけた。

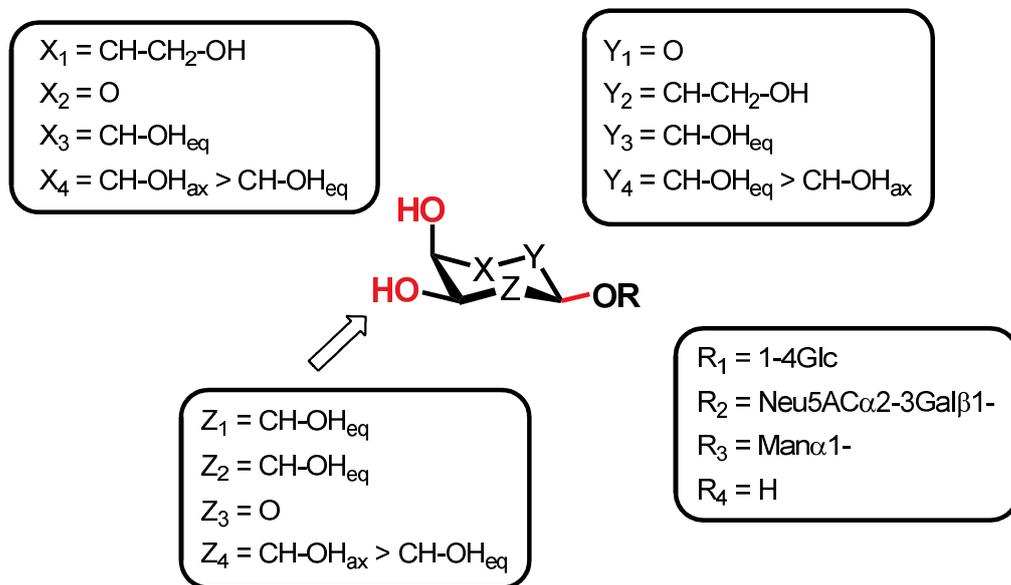


図 5-1 本研究で明らかとなった $r\Delta 23\text{pspST3}$ の受容体基質の構造

1、ラクトース；2、3'-シアリルラクトース；3、6-マンノビオース；4、各種イノシトール

6章 引用文献

- Ajisaka, K., Matsuo, I., Isomura, M., Fujimoto, H., Shirakabe, M. and Okawa, M. (1995) Enzymatic synthesis of mannobioses and mannotrioses by reverse hydrolysis using alpha-mannosidase from *Aspergillus niger*. *Carbohydr Res.*, 270, 123-130.
- Aminoff, D. (1961) Methods for the quantitative estimation of *N*-acetylneuraminic acid and their application to hydrolysates of sialomuroids. *Biochem. J.*, 81, 384-392.
- Angata, T. and Varki, A. (2002) Chemical Diversity in the Sialic Acids and Related α -Keto Acids: An Evolutionary Perspective. *Chemical Reviews*, 102, 439-470.
- Berridge, M.J. and Irvine, R.F. (1984) Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction, 312, 315-321.
- Bourbouze, R., Akiki, C., Chardon-Loriaux, I. and Percheron, F. (1982) Mise en évidence de dérivés de l'acide neuraminique dans des glycoprotéines végétales. *Carbohydrate Research*, 106, 21-30.
- Brito-Arias, M. (2007) *Synthesis and Characterization of Glycosides*. Springer, New York.
- Campbell, J.A., Davies, G.J., Bulone, V. and Henrissat, B. (1997) A classification of nucleotide-diphospho-sugar glycosyltransferases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.*, 326, 929-939.
- Cheng, J., Huang, S., Yu, H., Li, Y., Lau, K. and Chen, X. (2009) Trans-sialidase activity of *Photobacterium damsela* α 2,6-sialyltransferase and its application in the synthesis of sialosides. *Glycobiology*, cwp172.
- Church, G.M. and Gilbert, W. (1984) Genomic sequencing *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81 1991-1995
- Connor, R.J., Kawaoka, Y., Webster, R.G. and Paulson, J.C. (1994) Receptor Specificity in Human, Avian, and Equine H2 and H3 Influenza Virus Isolates. *Virology*, 205, 17-23.
- Coutinho, P.M., Deleury, E., Davies, G.J. and Henrissat, B. (2003) An Evolving Hierarchical Family Classification for Glycosyltransferases. *Journal of Molecular Biology*, 328, 307-317.
- Daskalova, S.M., Pah, A.R., Baluch, D.P. and Lopez, L.C. (2009) The *Arabidopsis thaliana* putative sialyltransferase resides in the Golgi apparatus but lacks the ability to transfer sialic acid. *Plant Biology*, 11, 284-299.

- Dey, P.M. (1990) *Methods in Plant Biochemistry, Carbohydrates*. Academic Press.
- Drouillard, S., Mine, T., Kajiwar, H., Yamamoto, T. and Samain, E. (2010) Efficient synthesis of 6'-sialyllactose, 6,6'-disialyllactose, and 6'-KDO-lactose by metabolically engineered *E. coli* expressing a multifunctional sialyltransferase from the *Photobacterium* sp. JT-ISH-224. *Carbohydr Res.*, 345, 1394-1399.
- Du, J., Meledeo, M.A., Wang, Z., Khanna, H.S., Paruchuri, V.D.P. and Yarema, K.J. (2009) Metabolic glycoengineering: Sialic acid and beyond. *Glycobiology*, 19, 1382-1401.
- Elliott, S., Lorenzini, T., Asher, S., Aoki, K., Brankow, D., Buck, L., Busse, L., Chang, D., Fuller, J., Grant, J., Hernday, N., Hokum, M., Hu, S., Knudten, A., Levin, N., Komorowski, R., Martin, F., Navarro, R., Osslund, T., Rogers, G., Rogers, N., Trail, G. and Egrie, J. (2003) Enhancement of therapeutic protein in vivo activities through glycoengineering. *Nature Biotechnology*, 21, 414-421.
- Endo, S.-i., Morita, M., Ueno, M., Maeda, T. and Terabayashi, T. (2009) Fluorescent labeling of a carboxyl group of sialic acid for MALDI-MS analysis of sialyloligosaccharides and ganglioside. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 378, 890-894.
- Frydman, R. and Neufeld, E.F. (1963) Synthesis of galactosylinositol by extracts from peas. *Biochem Biophys Res Commun.*, 12, 121-125.
- Fujimoto, S.Y., Ohta, M., Usui, A., Shinshi, H. and Ohme-Takagi, M. (2000) Arabidopsis Ethylene-Responsive Element Binding Factors Act as Transcriptional Activators or Repressors of GCC Box-Mediated Gene Expression. *Plant Cell*, 12, 393-404.
- Gagneux, P. and Varki, A. (1999) Evolutionary considerations in relating oligosaccharide diversity to biological function. *Glycobiology*, 9, 747-755.
- Gamian, A., Chomik, M., Laferriere, C. and Roy, R. (1991) Inhibition of influenza A virus hemagglutinin and induction of interferon by synthetic sialylated glycoconjugates. *Can J Microbiol*, 37, 233-237.
- Hidari, K.I.P.J., Murata, T., Yoshida, K., Takahashi, Y., Minamijima, Y.-h., Miwa, Y., Adachi, S., Ogata, M., Usui, T., Suzuki, Y. and Suzuki, T. (2008) Chemoenzymatic synthesis, characterization, and application of glycopolymers carrying lactosamine repeats as entry inhibitors against influenza virus infection. *Glycobiology*, 18, 779-788.

- Huang, N., Sutliff, T.D., Litts, J.C. and Rodriguez, R.L. (1990) Classification and characterization of the rice α -amylase multigene family. *Plant Molecular Biology*, 14, 655-668.
- Izumi, M. and Wong, C.-H. (2001) Microbial sialyltransferases for carbohydrate synthesis. *Trends Glycosci. Glycotechnol.*, 13, 345-360.
- Joao, H.C., Scragg, I.G. and Dwek, R.A. (1992) Effects of glycosylation on protein conformation and amide proton exchange rates in RNase B. *FEBS Letters*, 307, 343-346.
- Jofuku, K.D., Boer, B., Montagu, M.V. and Okamoto, J.K. (1994) Control of Arabidopsis Flower and Seed Development by the Homeotic Gene APETALA2. *Plant Cell*, 6, 1211-1225.
- Kajihara, Y., Yamamoto, T., Nagae, H., Nakashizuka, M., Sakakibara, T. and Terada, I. (1996) A Novel α -2,6-Sialyltransferase: Transfer of Sialic Acid to Fucosyl and Sialyl Trisaccharides. *The Journal of Organic Chemistry*, 61, 8632-8635.
- Kirch, H.-H., van Berkel, J., Glaczinski, H., Salamini, F. and Gebhardt*, C. (1997) Structural organization, expression and promoter activity of a cold-stress-inducible gene of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Plant Molecular Biology*, 33, 897-909.
- Komari, T. (1989) Transformation of callus cultures of nine plant species mediated by agrobacterium. *Plant Science*, 60, 223-229.
- Linsmaier, E.M. and Skoog, F. (1965) Organic Growth Factor Requirements of Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 18, 100-127.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) PROTEIN MEASUREMENT WITH THE FOLIN PHENOL REAGENT *Journal of Biological Chemistry* 193 265-275
- Mine, T., Hiyoshi, T., Kasaoka, K. and Ohyama, A. (2003) CIP353 Encodes an AP2/ERF-Domain Protein in Potato (*Solanum tuberosum* L.) and Responds Slowly to Cold Stress. *Plant and Cell Physiology*, 44, 10-15.
- Mine, T., Kajiwara, H., Murase, T., Kajihara, Y. and Yamamoto, T. (2010) An α 2,3-Sialyltransferase from *Photobacterium* sp. JT-ISH-224 Transfers N-Acetylneuraminic Acid to Both the O-2 and O-3' Hydroxyl Groups of Lactose. *Journal of Carbohydrate Chemistry*, 29, 51 - 60.

- Mine, T., Katayama, S., Kajiwara, H., Tsunashima, M., Tsukamoto, H., Takakura, Y. and Yamamoto, T. (2010) An α 2,6-sialyltransferase cloned from *Photobacterium leiognathi* strain JT-SHIZ-119 shows both sialyltransferase and neuraminidase activity. *Glycobiology*, 20, 158-165.
- Mine, T., Miyazaki, T., Kajiwara, H., Naito, K., Ajisaka, K. and Yamamoto, T. (2010) Enzymatic synthesis of unique sialyloligosaccharides using marine bacterial α -(2 \rightarrow 3)- and α -(2 \rightarrow 6)-sialyltransferases. *Carbohydrate Research*, 345, 1417-1421.
- Nishida, Y., Wiemann, T., Sinnwell, V. and Thiem, J. (1993) A new type of galactosyltransferase reaction: transfer of galactose to the anomeric position of *N*-acetylkanosamine. *Journal of the American Chemical Society*, 115, 2536-2537.
- Ohme-Takagi, M. and Shinshi, H. (1995) Ethylene-Inducible DNA Binding Proteins That Interact with an Ethylene-Responsive Element. *Plant Cell*, 7, 173-182.
- Pharr, D.M., Sox, H.N., Locy, R.D. and Huber, S.C. (1981) Partial characterization of the galactinol forming enzyme from leaves of *Cucumis sativus* L. *Plant Science Letters*, 23, 25-33.
- Riechmann, J. and Meyerowitz, E. (1998) The AP2/EREBP family of plant transcription factors. *Biological Chemistry*, 379, 633-646.
- Rogers, G.N. and Paulson, J.C. (1983) Receptor determinants of human and animal influenza virus isolates: Differences in receptor specificity of the H3 hemagglutinin based on species of origin. *Virology*, 127, 361-373.
- Rogers, J.C. and Rogers, S.W. (1992) Definition and Functional Implications of Gibberellin and Abscisic Acid cis-Acting Hormone Response Complexes. *Plant Cell*, 4, 1443-1451.
- Sabesan, S. and Paulson, J.C. (1986) Combined chemical and enzymatic synthesis of sialyloligosaccharides and characterization by 500-MHz and proton and carbon-13 NMR spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society*, 108, 2068-2080.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schauer, R. (2004) Sialic acids: fascinating sugars in higher animals and man. *Zoology*, 107, 49.

- Seveno, M., Bardor, M., Paccalet, T., Gomord, V., Lerouge, P. and Faye, L. (2004) Glycoprotein sialylation in plants? *Nature Biotechnology*, 22, 1351-1352.
- Shah, M.M., Fujiyama, K., Flynn, C.R. and Joshi, L. (2003) Sialylated endogenous glycoconjugates in plant cells. *Nature Biotechnology*, 21, 1470-1471.
- Shen, X., Xiao, H., Ranallo, R., Wu, W.-H. and Wu, C. (2003) Modulation of ATP-Dependent Chromatin-Remodeling Complexes by Inositol Polyphosphates. *Science*, 299, 112-114.
- Sigal, G.B., Mammen, M., Dahmann, G. and Whitesides, G.M. (1996) Polyacrylamides Bearing Pendant α -Sialoside Groups Strongly Inhibit Agglutination of Erythrocytes by Influenza Virus: The Strong Inhibition Reflects Enhanced Binding through Cooperative Polyvalent Interactions. *Journal of the American Chemical Society*, 118, 3789-3800.
- Skriver, K., Olsen, F.L., Rogers, J.C. and Mundy, J. (1991) cis-acting DNA elements responsive to gibberellin and its antagonist abscisic acid *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88 7266-7270
- Spaltenstein, A. and Whitesides, G.M. (1991) Polyacrylamides bearing pendant .alpha.-sialoside groups strongly inhibit agglutination of erythrocytes by influenza virus. *Journal of the American Chemical Society*, 113, 686-687.
- Stasche, R., Hinderlich, S., Weise, C., Effertz, K., Lucka, L., Moormann, P. and Reutter, W. (1997) A Bifunctional Enzyme Catalyzes the First Two Steps in *N*-Acetylneuraminic Acid Biosynthesis of Rat Liver. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 24319-24324.
- Takakura, Y., Tsukamoto, H. and Yamamoto, T. (2007) Molecular Cloning, Expression and Properties of an α -/ β -Galactoside α 2,3-Sialyltransferase from *Vibrio* sp. JT-FAJ-16. *J Biochem*, 142, 403-412.
- Takashima, S., Abe, T., Yoshida, S., Kawahigashi, H., Saito, T., Tsuji, S. and Tsujimoto, M. (February 2006) Analysis of Sialyltransferase-Like Proteins from *Oryza sativa*. *Journal of Biochemistry*, 139, 279-287.
- Taniguchi, N., Honke, K. and Fukuda, M. (2002) *Handbook of Glycosyltransferases and Related Genes*.
- Thomashow, M.F. (1998) Role of Cold-Responsive Genes in Plant Freezing Tolerance. *Plant Physiol.*, 118, 1-8.

- Tsuchida, A., Kobayashi, K., Matsubara, N., Muramatsu, T., Suzuki, T. and Suzuki, Y. (1998) Simple synthesis of sialyllactose-carrying polystyrene and its binding with influenza virus. *Glycoconjugate Journal*, 15, 1047-1054.
- Tsukamoto, H., Takakura, Y., Mine, T. and Yamamoto, T. (2008) *Photobacterium* sp. JT-ISH-224 Produces Two Sialyltransferases, α -/ β -Galactoside α 2,3-Sialyltransferase and β -Galactoside α 2,6-Sialyltransferase 10.1093/jb/mvm208. *J Biochem*, 143, 187-197.
- Tsukamoto, H., Takakura, Y. and Yamamoto, T. (2007) Purification, Cloning, and Expression of an α / β -Galactoside α 2,3-Sialyltransferase from a Luminous Marine Bacterium, *Photobacterium phosphoreum*. *J. Biol. Chem.*, 282, 29794-29802.
- Umemura, M., Itoh, M., Makimura, Y., Yamazaki, K., Umekawa, M., Masui, A., Matahira, Y., Shibata, M., Ashida, H. and Yamamoto, K. (2008) Design of a Sialylglycopolymer with a Chitosan Backbone Having Efficient Inhibitory Activity against Influenza Virus Infection. *Journal of Medicinal Chemistry*, 51, 4496-4503.
- van Berkel, J., Salamini, F. and Gebhardt, C. (1994) Transcripts Accumulating during Cold Storage of Potato (*Solanum tuberosum* L.) Tubers Are Sequence Related to Stress-Responsive Genes. *Plant Physiol.*, 104, 445-452.
- Van Der Fits, L. and Memelink, J. (2001) The jasmonate-inducible AP2/ERF-domain transcription factor ORCA3 activates gene expression via interaction with a jasmonate-responsive promoter element. *The Plant Journal*, 25, 43-53.
- Varki, A. (1993) Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology*, 3, 97-130.
- Vimr, E.R., Kalivoda, K.A., Deszo, E.L. and Steenbergen, S.M. (2004) Diversity of Microbial Sialic Acid Metabolism. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 68, 132-153.
- Vliegthart, J.F.G., Dorland, L., Halbeek, H. and Heverkamp, J. (1982) *Sialic Acids Chemistry, Metabolism and Function*. Springer.
- Weinstein, J., de Souza-e-Silva, U. and Paulson, J.C. (1982) Purification of a Gal beta 1 to 4GlcNAc alpha 2 to 6 sialyltransferase and a Gal beta 1 to 3(4)GlcNAc alpha 2 to 3 sialyltransferase to homogeneity from rat liver. *Journal of Biological Chemistry* 257 13835-13844

- Weinstein, J., de Souza-e-Silva, U. and Paulson, J.C. (1982) Sialylation of glycoprotein oligosaccharides N-linked to asparagine. Enzymatic characterization of a Gal beta 1 to 3(4)GlcNAc alpha 2 to 3 sialyltransferase and a Gal beta 1 to 4GlcNAc alpha 2 to 6 sialyltransferase from rat liver. . Journal of Biological Chemistry 257 13845-13853
- Wu, W., Jin, B., Krippner, G.Y. and Watson, K. (2000) Synthesis of a polymeric 4-N-linked sialoside which inhibits influenza virus hemagglutinin. Bioorg Med Chem Lett., 10, 341-343.
- Yamamoto, T., Hamada, Y., Ichikawa, M., Kajiwara, H., Mine, T., Tsukamoto, H. and Takakura, Y. (2007) A β -galactoside α 2,6-sialyltransferase produced by a marine bacterium, *Photobacterium leiognathi* JT-SHIZ-145, is active at pH 8. Glycobiology, 17, 1167-1174.
- Yamamoto, T., Nagae, H., Kajihara, Y. and Terada, I. (1998) Mass Production of Bacterial α 2,6-Sialyltransferase and Enzymatic Syntheses of Sialyloligosaccharides. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 62, 210-214.
- Yamamoto, T., Nakashizuka, M. and Terada, I. (1998) Cloning and Expression of a Marine Bacterial β -Galactoside α -Sialyltransferase Gene from *Photobacterium damsela* JT0160. Journal of Biochemistry, 123, 94-100.
- Yamamoto, T., Takakura, Y. and Tsukamoto, H. (2006) Bacterial sialyltransferase. Trends. Glycosci. Glycotechnol., 108, 253-265.
- Yamamoto, T., Ichikawa, M. and Takakura, Y. (2008) Conserved amino acid sequences in the bacterial sialyltransferases belonging to Glycosyltransferase family 80. Biochemical and Biophysical Research Communications, 365, 340-343.

謝辞

本論文は日本たばこ産業株式会社糖鎖ビジネスユニットにおいて主に行われた研究成果をまとめたものである。本論文を作成するにあたり、山形大学農学部教授の三橋渉先生には終始、細部に渡り懇切な御指導をいただいた。ここに深謝の意を表す。また、岩手大学農学部教授・平秀晴先生、前帯広畜産大学（現：日本大学理工学部）教授・櫛泰典先生、山形大学農学部准教授・豊増知伸先生には本論文に対して御助言を頂いた。ここに深謝の意を表す。

日本たばこ産業株式会社植物イノベーションセンター所長の植木潤博士および日本たばこ産業株式会社糖鎖ビジネスユニット前マネージャーの山本岳博士（現、日本たばこ産業株式会社たばこ事業本部R & Dグループ製品科学部チームリーダー）には、本研究の実施の機会を頂くとともに、山本岳博士には本研究の2章・3章の遂行および本論文全般の作成に対して、終始有益な御検討・御助言をいただいた。ここに深謝の意を表す。大阪大学大学院理学研究科教授・梶原康宏先生には、3章の実験を進めるにあたり有益な御助言をいただいた。ここに深謝の意を表す。新潟薬科大学応用生命科学部教授・鯨坂勝美先生には3章の実験において貴重な試料を提供いただき、新潟薬科大学応用生命科学部助教・宮崎達雄博士および大塚化学株式会社・村瀬健文博士には3章での構造解析で多大な御協力をいただいた。ここに感謝の意を表す。4章の遂行には、元日本たばこ産業株式会社遺伝育種研究所研究員・大山暁男博士（現、独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構野菜茶業研究所）および主任研究員・日吉徹氏（現、日本たばこ産業株式会社葉たばこ研究所）に御助言をいただいた。ここに感謝の意を表す。

九州大学大学院農学研究院教授・割石博之先生および京都大学名誉教授・山本憲二先生には、本論文を作成するにあたり激励をいただいた。ここに感謝の意を表す。日本たばこ産業株式会社植物イノベーションセンターの研究員各位には、研究遂行にあたり有益な御討論・御助言をいただいた。ここに謝意を表す。

最後に、研究の遂行から本論文の作成にあたり著者を精神的に支えてくれた、最愛の家族に感謝する。