

海洋性微生物*Photobacterium damsela* JT0160の生産する
 β -ガラクトシド α 2,6-シアル酸転移酵素に関する研究

1998年

提出先
岩手大学大学院
連合農学研究科

山本 岳

①

海洋性微生物 *Photobacterium damsela* JT0160 の生産する
 β -ガラクトシド α 2,6-シアル酸転移酵素に関する研究

山本 岳

目次

緒論

0.1. 本研究の背景	1
0.2. 本研究の目的	9

第1章 シアル酸転移活性を有する海洋性細菌、好塩性細菌の探索及び *Photobacterium damsela* JT0160 株の菌学的性質

1.1. 緒論	16
1.2. 実験材料及び方法	18
1.2.1. 材料	18
1.2.2. 細菌の単離及び培養方法	18
1.2.3. 菌体破砕液の調製	20
1.2.4. シアル酸転移活性の測定	20
1.2.5. 菌株の生化学的性状と同定	21
1.3. 結果	22
1.3.1. シアル酸転移活性を示した菌株	22
1.3.2. JT0160 株の形態学的特徴	22
1.3.3. JT0160 株の生化学的性状と同定結果	22
1.3.4. アメリカンタイプカルチャーコレクションより購入した 5 菌株の <i>Photobacterium damsela</i> のシアル酸転移活性	27
1.4. 考察	28

第2章 *Photobacterium damsela* JT0160 株の生産する β -ガラクトシド α 2,6-シアル酸転移酵素の精製及び性質

2.1. 緒論	30
2.2. 実験材料及び方法	32
2.2.1. 材料	32
2.2.2. 酵素活性測定法	32
2.2.3. 糖蛋白質を糖受容体とした酵素活性測定法	33
2.2.4. 糖脂質を糖受容体とした酵素活性測定	33
2.2.5. <i>P. damsela</i> JT0160 株の培養	34
2.2.6 シアル酸転移酵素の精製	35
2.2.6. (1) 菌体からの粗酵素液の調製	35
2.2.6. (2) Q-セファロース HR26/10 カラムクロマトグラフィー	35
2.2.6. (3) ハイドロキシアパタイトカラムクロマトグラフィー	36
2.2.6. (4) セファクリル S-200 カラムクロマトグラフィー	36
2.2.6. (5) CDP-ヘキサノールアミンアガロースカラム クロマトグラフィー	37
2.2.7. 分子量測定	37
2.2.8. 蛋白質量の測定	37
2.2.9. シアル酸転移酵素の N 末端アミノ酸配列の決定	38
2.2.10. 等電点測定	38
2.2.11. 単糖に対する糖受容体基質特異性	38
2.2.12. オリゴ糖に対する糖受容体基質特異性	39
2.2.12. (1) 酵素反応	39
2.2.12. (2) 反応生成物の分析	39
2.2.13. メチル- β -D-N-アセチルラクトサミニドを糖受容体基質とした 時の反応生成物の同定	40
2.3. 結果	42
2.3.1. 培養及びシアル酸転移酵素の精製	42
2.3.2. <i>P. damsela</i> JT0160 由来シアル酸転移酵素 (STase 0160) の性質	48

2.3.2. (1) 反応至適温度と熱安定性	48
2.3.2. (2) 反応至適 pH と pH 安定性	48
2.3.2. (3) 単糖に対する糖受容体基質特異性	48
2.3.2. (4) オリゴ糖に対する糖受容体基質特異性	54
2.3.2. (5) 糖供与体基質及び糖受容体基質に対する反応速度定数	54
2.3.2. (6) 糖蛋白質・糖脂質に対する糖受容体基質特異性	57
2.3.2. (7) 酵素反応生成物の同定	57
2.4. 考察	63

第3章 *Photobacterium damsela* JT0160 株由来 β -ガラクトシド α 2,6-シアル酸転移酵素の大量生産

3.1. 緒論	69
3.2. 実験材料及び方法	71
3.2.1. 材料	71
3.2.2. 培養及び培地中の糖、酢酸の測定	71
3.2.3. 酵素活性測定法	72
3.2.4. 菌体破砕液、粗酵素液の調製及び酵素の精製	72
3.2.5. シアリダーゼ活性の測定	72
3.2.6. 粗酵素液を用いたシアリルオリゴ糖の合成	72
3.3. 結果	74
3.3.1. 菌体量と酵素生産量の関係	74
3.3.2. 至適培養条件の検討	76
3.3.2. (1) 増殖至適温度	76
3.3.2. (2) 増殖至適 pH	76
3.3.3. 培地成分の検討	76
3.3.3. (1) 窒素源の効果	76

3.3.3. (2) 肉エキスの効果	79
3.3.3. (3) 酵母エキスの効果	81
3.3.3. (4) 炭素源の効果	81
3.3.4. 最適培地組成の検討	83
3.3.5. ジャーファメンター培養及び STase 0160 の精製	83
3.3.6. 粗酵素液を用いたシアリルオリゴ糖の合成	85
3.4. 考察	91

第4章 *Photobacterium damsela* JT0160 株の生産する 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及びその組換え体
 蛋白質の発現

4.1. 緒論	95
4.2. 実験材料及び方法	100
4.2.1. 試薬	100
4.2.2. 制限酵素と修飾酵素	100
4.2.3. 菌株及び培養条件	100
4.2.4. シアル酸転移酵素の部分アミノ酸配列の決定	101
4.2.5. オリゴヌクレオチドプローブとハイブリダイゼーション	102
4.2.6. <i>P. damsela</i> JT0160 株のゲノム DNA の調製	103
4.2.7. ゲノム DNA ライブラリーの作成	104
4.2.8. アルカリ溶菌法によるプラスミド DNA の分離・調製	104
4.2.9. DNA 断片のアガロースゲルからの回収	105
4.2.10. ライゲーション及び形質転換	106
4.2.11. ハイブリダイゼーションレプリカの調製	106
4.2.12. ファージ DNA の精製	107
4.2.13. DNA 塩基配列の決定	107

4.2.14. 酵素活性測定法	107
4.2.15. 組換え体酵素の発現と精製	108
4.2.16. 酵素反応生成物の同定	108
4.3. 結果	109
4.3.1. シアル酸転移酵素の部分アミノ酸配列	109
4.3.2. ゲノム DNA のサザンハイブリダイゼーション	109
4.3.3. <i>bst</i> 遺伝子断片を含むと推定されるファージの単離	111
4.3.4. サブクローニング	111
4.3.5. 1.6kbp 遺伝子断片の DNA 塩基配列	112
4.3.6. シアル酸転移酵素の C 末端側アミノ酸配列をコードする 遺伝子断片の単離	112
4.3.7. シアル酸転移酵素の C 末端側アミノ酸配列をコードする 遺伝子断片の DNA 塩基配列の解析	115
4.3.8. <i>bst</i> 遺伝子の DNA 塩基配列及び推定アミノ酸配列の解析	115
4.3.9. 発現プラスミド (pEBST シリーズ) の構築	120
4.3.9. (1) pAQN の改良	126
4.3.9. (2) pBSTC の改変と pAQN-EHX への挿入	126
4.3.9. (3) pBSTN の改変と発現プラスミド (pEBST シリーズ) の構築	129
4.3.10. 組換え体酵素の発現	131
4.3.11. 組換え体酵素の精製	133
4.3.12. 酵素反応生成物の同定	135
4.4. 考察	137
第 5 章 総括	147
参考文献	155
謝辞	166

緒論

0.1. 本研究の背景

糖質は動物、植物、微生物界に広く分布し、かつ多量に存在する有機化合物である。広義には、ポリヒドロキシ化合物及びそのアルデヒド、ケトン、カルボン酸誘導体やそれらの縮合体を含めた幅広い化合物群に対する総称である。糖質は生物界に普遍的にかつ、大量に存在するにも関わらず、近年まで糖質の有する代表的な生体内における役割の認識は不十分なもので、主に多糖に関して、①澱粉やグリコーゲンなどのようにエネルギー源、もしくはエネルギー貯蔵物質としての機能、②植物繊維としてのセルロース、甲殻類や昆虫の殻を構成するキチンのように生体を支える構造物としての機能などとしてとらえられてきた。

生物学の基本概念の一つに、「細胞は、それぞれの表面に存在する相補的な構造を通じて相手細胞を認識する。」というものがある。すなわち、一方の細胞に存在する構造が生物的な情報を担い、対する細胞上の構造がこれを判読するという考えである。この概念は、酵素と基質の特異的な相互作用を説明するために 1897 年に Ficher が唱えた「鍵と鍵穴説」を拡張したものである。この概念は、細胞生物学の理論的仮説となっていたにも拘わらず、この細胞間認識に関与する分子が何であるか、また、どのような性質をもつかということは、近年まで不明であった。以前から、「糖質が生物反応の特異性を決定している。」という報告は存在したが、それらの多くは注目されないままに終わっていた。

例えば、純粋な多糖が抗原またはハプテンとして特異的な免疫情報を担うことは、1950年代に十分理解されていた[1]。また、ABO式血液型が血球細胞上の糖質の構造によって決定されていることや[2, 3]、インフルエンザウイルスが赤血球上に存在するシアル酸を介して結合していること[4]も理解されていた。

1960年代以降、糖質化学と異なる二つの研究分野、細胞生物学とレクチンの研究分野での進歩が糖質に対する認識を大きく変化させた。まず、「細胞生物学」の進展によって、原核及び真核細胞は、糖質の外被をまとっているという事実が認識された[5, 6]。この糖質の外被を構成する成分は、主として糖蛋白質や糖脂質などの複合糖質である。複合糖質とは、単純な糖質の重合体であるグリコーゲンやセルロースとは異なり、例えば蛋白質や脂質等といった糖質以外の生体物質と糖質が結合している生体成分を示している。通常、複合糖質の糖質部分は数種類の糖質（単糖）からなる重合体として構成されており、この糖質の重合体は糖鎖と呼ばれている。糖鎖は、これら複合糖質において、例えば糖蛋白質では糖鎖が蛋白質に、糖脂質では糖鎖が脂質に、それぞれ共有結合している。こうした糖蛋白質や糖脂質は、生体成分の中で一般的に存在していることが明らかにされている[7]。例えば、ヒトの血清中には少なくとも100種類以上の蛋白質が存在すると言われているが、単離されている蛋白質の中で糖を含まない単純蛋白質は血清アルブミンとCリアクティブプロテインのみである。そして、糖蛋白質は様々な細胞の形質膜の構成成分として、あるいは細胞外に分泌され血液、消化液、乳汁、細胞間基質に含まれることで生体内に広く分布している[7]。

二つめとして、レクチンに関する研究の進展があげられる。レクチンとは糖質と速やかにかつ選択的・可逆的に結合する蛋白質の総称である。かつて、レクチンは植物のみに存在するものと考えられていたが、現在では自然界に普遍的に存在していることが明らかになっている[8]。また、多くの場合、細胞の表面にもレクチンが存在することが明らかになっている[8]。

これら複合糖質の糖鎖とレクチンとの相互作用が、生体内認識に関与することを強く示唆する研究が数多く行われてきた。例えば、血清中の銅を輸送する糖蛋白質であるセルロプラスミンをシアリダーゼで処理して、末端に存在するシアル酸を除去した場合、このセルロプラスミンを血流中に戻すと、通常のシアル酸を含むセルロプラスミンは循環系の中で一定時間存在し続けるのに対し、シアル酸を除去したセルロプラスミンはきわめて短時間のうちに検出されなくなることが観察された[9]。また、フェツイン、 α -1 酸性糖蛋白質、ハプトグロビンなどの血清糖蛋白質もセルロプラスミンの場合と同様に、それらの糖鎖からシアル酸を除去すると血液中からきわめて短時間のうちに検出されなくなることが明らかになった[10]。その後、シアル酸を除去したセルロプラスミンが肝臓通過後に検出されなくなること[9]、このセルロプラスミンが肝細胞上のレクチンと結合することが明らかになった[11, 12]。これらの結果から、セルロプラスミンの糖鎖中に存在するシアル酸が、血流から除去もしくは分解すべきセルロプラスミン分子を肝細胞上のレクチンに識別させる「タグ」として機能していると結論づけられた。この事例以外にも糖鎖が関与すると考えられる多くの物質認識、細胞間認識現象の存在が明らかになっている。

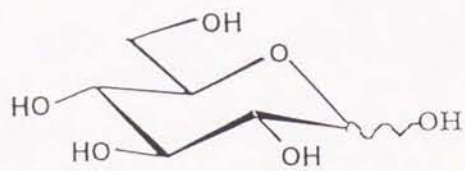
これ以外にも動植物細胞中の糖蛋白質や糖脂質などの複合糖質の持つ生物活性が次々と明らかになり[13-16]、分子レベルでの解析も次々に行われている。また、1990年以降、糖鎖に含まれる生物情報を解明していこうとする新たな糖鎖生物学の領域の研究が生まれ、大きな展開を見せている[17]。

現在、複合糖質糖鎖の機能は大きく二つに分けて考えられている。一つは、糖鎖の結合している蛋白質もしくは脂質に、安定性の付与、溶解性の調節、分解酵素からの保護等の機能である[7]。いま一つは、情報のキャリアーとしての機能である[18,19]。ここで A-B という結合物を考えてみる。核酸を考えた場合、例えば A をアデニル酸、B をグアニル酸とすると、そこから作り出される構造（情報）は一種類である。また、蛋白質を考えた場合、例えば A をアラニン、B をバリンとすると、そこから作り出される構造（情報）は核酸の場合と同様に一種類のみである。しかしながら、糖質の場合には核酸や蛋白質の場合と状況がかなり異なる。例えば A を *N*-アセチルグルコサミン、B をマンノースとした場合、マンノース上には C-2 位、C-3 位、C-4 位、C-6 位という、4 箇所の結合部位が存在するため、A-B という結合物には 4 種類の異性体が存在することになる。また、*N*-アセチルグルコサミンには、 α 体と β 体の 2 つのアノマー構造が存在することから、この二糖の取り得る構造（情報）は 8 種類となる。更に *N*-アセチルグルコサミンは、ピラノース構造とフラノース構造をとることが可能であるために、A-B という二糖が作り出す構造（情報）は 16 種類ということになる。さらに、A-B-C という結合物を考えた場合、核酸や蛋白質の場合には、これらの結合物から作り出される構造（情報）はいずれも一種類のみである。し

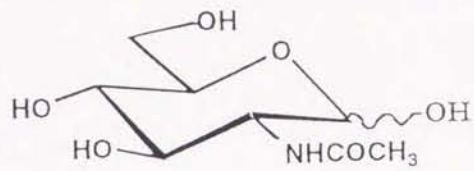
かし、糖質は直鎖構造ばかりではなく、枝別れ構造をもとりうるということが可能であるために、異性体の数は飛躍的に増加することとなる。このように糖質は比較的小さな数のユニットで非常に多彩な構造を作りえるという、核酸や蛋白質にはない構造的多様性を有する[20]。この糖質の持つ特徴は、糖質が生体内の情報担当分子としてきわめて効果的であることを示している。

現在までに、多くの複合糖質糖鎖の構造が明らかにされ[21]、動物由来の糖蛋白質糖鎖を例にとると、大きく二つの特徴が明らかになっている。一つは、糖鎖を構成している糖の種類はそれほど多くはないことである[22]。糖鎖中によくみられる単糖は、わずかに7種類に限られており (Fig. 0-1)、これら以外には極まれにキシロースが見られる程度である。二つめは、糖鎖と蛋白質の間の結合に関するもので、その結合は主としてペプチド鎖中のアスパラギン残基のアミド窒素への *N*-グリコシド結合 (*N*-リンク型糖蛋白質糖鎖) [23]か、セリン、もしくはスレオニン残基の水酸基への *O*-グリコシド結合 (*O*-リンク型糖蛋白質糖鎖) [24]の2種類 (Fig. 0-2)が存在し、それぞれに共通の基本構造パターンが認められていることである[24, 25]。

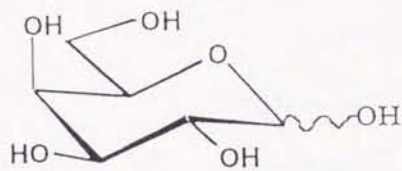
複合糖質糖鎖は、厳密な基質特異性を持つ多くの糖転移酵素により、糖が転移されて形成される[26-28]。糖蛋白質糖鎖の場合、上述の *N*-リンク型糖蛋白質糖鎖と *O*-リンク型糖蛋白質糖鎖ではその生合成経路はまったく異なるが[27, 28]、いずれの場合もその糖鎖構造は、核酸や蛋白質とは異なり、鋳型が存在せずに一連の特異的な糖転移酵素の働きによって規定されている。このことから、生体内における糖転移酵素の重要性が広く認識され、現在までに多くの糖転移酵



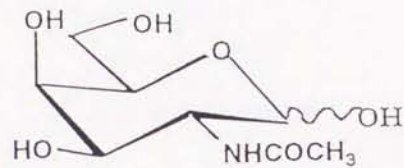
D-グルコース (Glc)



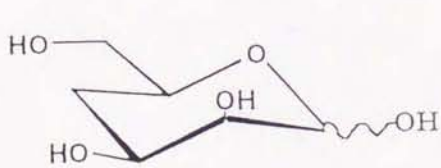
D-N-アセチルグルコサミン (GlcNAc)



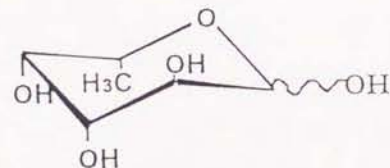
D-ガラクトース (Gal)



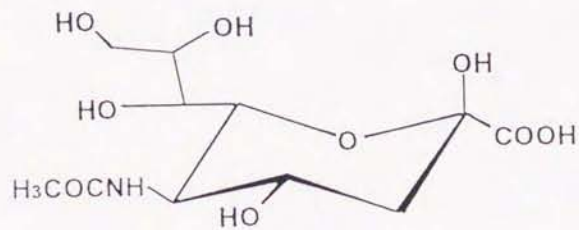
D-N-アセチルガラクトサミン (GalNAc)



D-マンノース (Man)



L-フコース (Fuc)

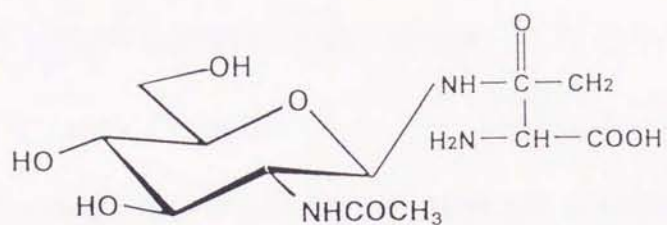


N-アセチルノイラミン酸 (NeuAc)

Fig. 0-1 複合糖質糖鎖を構成する主な単糖類の構造

糖蛋白質、糖脂質等の複合糖質糖鎖を構成する
主な単糖類の構造を示す。

(A)



(B)

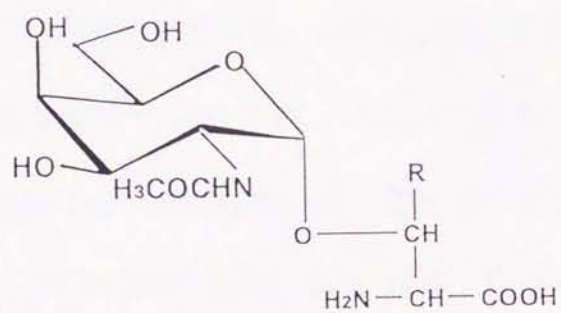


Fig. 0-2 糖と蛋白質との結合様式

(A) アスパラギンと *N*-アセチルグルコサミンとの *N*-グリコシド結合 (β 配置)、(B) セリン ($R=H$) 及びスレオニン ($R=CH_3$) と *N*-アセチルガラクトサミンとの *O*-グリコシド結合 (α 配置) を示す。

素に関する研究が行われてきた。生体内に存在する多種多様な糖鎖の構造から推定すると、少なくとも 100 種類以上の糖転移酵素が存在するものと考えられているが、いずれの糖転移酵素も生体内には微量しか存在しないために、その単離、精製は極めて困難であった。しかし、ここ数年の糖鎖生物学・糖鎖工学の進展に伴い、少しずつではあるが糖転移酵素の構造や、それぞれの持つ反応特異性などが明らかになり始めている[29]。

複合糖質の糖鎖が持つ機能を解析するためには、目的とする糖鎖構造を合成することが必須である。一般に、これら複合糖質の糖鎖の合成法として、(1) 有機化学的手法を用いる化学合成法と、(2) 糖転移酵素や糖加水分解酵素を用いる酵素法の 2 種類の方法が知られている。化学合成法を用いたグリコシル化反応に関する研究はかなり以前から行われているため、膨大な知見の蓄積がある。さらに、酵素法と比較し広い適用性や、高い柔軟性があるなどの利点が上げられる[30]。しかし、化学合成法を用いた場合、保護/脱保護のプロセスが避けられないことから、その反応工程は複雑になり、また、必然的に反応工程が多くなるなどの問題がある。一方、酵素法は高い立体選択性を有し、化学合成法の場合には避けられない保護/脱保護のプロセスが必要なく、一段階で反応が終了するという利点を持つが、現在のところ、使用できる酵素の種類が限られている。また、前述のように、糖転移酵素はいずれも極微量しか得られないために、糖転移酵素を用いた大量の糖鎖合成ができないなどの問題がある。

0.2. 本研究の目的

シアル酸はノイラミン酸のアシル誘導体の総称で、カルボキシル基を有する酸性単糖の一種であり、これまでに 30 種類以上が確認されている[31]。シアル酸は各種の生物に含まれ、通常細胞表層糖質を構成している糖蛋白質、糖脂質などの複合糖質の末端にグリコシド結合して存在する[32]。生物界に一番多く見いだされるシアル酸は *N*-アセチルノイラミン酸であり、大部分の哺乳動物においてもこのシアル酸が見いだされている。一部の動物からは *N*-グリコリルノイラミン酸も見いだされている[31]。また、イカ、エビ、イソギンチャクなどにも各種のシアル酸が見いだされており、大腸菌にはコロミン酸と呼ばれる *N*-アセチルノイラミン酸の重合体が存在する[31]などの報告がある。以下、本論文では特に記さない限り、*N*-アセチルノイラミン酸をシアル酸として示す。

複合糖質糖鎖の生理機能、生物学的意義が注目されるなかで、シアル酸は特に重要な機能を担っていることが明らかとなっている[32]。例えば、糖鎖構造中にシアル酸を含む糖脂質であるガングリオシドは、動物細胞の表層に存在し、その糖鎖部分を細胞外に配向させ、外界の情報の認識や細胞自己の存在を示し、細胞間認識や細胞の分化、増殖、免疫等の基本的な生命現象に深く関与する分子種の一つであることが証明されている。このように複合糖質糖鎖中に存在するシアル酸の役割が明らかになるに従い、生体内で複合糖質糖鎖にシアル酸を転移させるシアル酸転移酵素の重要性が認識され、これまでに糖受容体基質特異性や結合様式の異なる 10 種類以上の動物由来のシアル酸転移酵素をコードす

る遺伝子がクローニングされている (Table 0-1)。一方、細菌の生産するシアル酸転移酵素の精製に関する報告は無いものの、これまでに細菌由来のシアル酸転移酵素遺伝子として、1991年に *Escherichia coli* K-1 より α 2,8-シアル酸転移酵素をコードする遺伝子が[33]、1996年に *Neisseria meningitidis* 及び *Neisseria gonorrhoeae* より α 2,3-シアル酸転移酵素をコードする遺伝子[34]がそれぞれクローニングされている。ところで、シアル酸転移酵素は以下の反応を触媒する酵素群の総称である。



糖ヌクレオチドである CMP-シアル酸は、いずれのシアル酸転移酵素にも共通の糖供与体基質である。これまでに知られているシアル酸転移酵素は Table 0-1 に示すとおり、シアル酸が結合する糖や形成される結合様式の違いなどから分類されており、これらの動物由来のシアル酸転移酵素は非常に厳密な糖受容体基質特異性を有している[58, 59]。

様々なシアル酸含有糖鎖の機能解析や利用においてシアル酸含有糖鎖の合成が必須である。前述のとおり、これら糖鎖の合成方法には、化学合成法と酵素法の2種類がある。化学合成法を用いたシアル酸のグリコシル化反応の場合には0.1.で述べた以外にも以下のような問題がある。すなわち、シアル酸のアノマ一位に存在するカルボキシル基の電子吸引性のために、この位置でのカチオンの生成、すなわち、グリコシル化がエネルギー的に不利となり、必然的に通常のグリコシル化と比べて副反応を生じやすい欠点がある[60]。更に、そのグリコ

Table 0-1 これまでにクローニングされている動物由来のシアル酸転移酵素遺伝子

酵素	起源 (Ref.)
Gal β 1,3GalNAc α 2,3-シアル酸転移酵素 (糖蛋白質)	m(35), h(36), p(37), c(38)
Gal β 1,3GalNAc α 2,3-シアル酸転移酵素 (糖脂質)	m(39), r(39)
Gal β 1,3(4)GlcNAc α 2,3-シアル酸転移酵素	h(40), r(41)
Gal β 1,4(3)GlcNAc/Gal β 1,3GalNAc α 2,3-シアル酸転移酵素	h(42,43)
Gal β 1,4GlcNAc α 2,6-シアル酸転移酵素	m(44), h(45,46), r(47), c(48)
GalNAc α 2,6-シアル酸転移酵素	c(49)
Gal β 1,3GalNAc α 2,6-シアル酸転移酵素	c(50)
NeuAc α 2,3Gal β 1,3GalNAc α 2,6-シアル酸転移酵素	r(51)
GD3合成酵素	m(52), h(53-55)
(NeuAc α 2,8)nNeuAc α 2,3Gal β 1,4(3)GlcNAc α 2,8-シアル酸転移酵素	m(52), h(56), r(57)
NeuAc α 2,3Gal β 1,4GlcNAc α 2,8-シアル酸転移酵素	m(52)

シアル酸転移酵素遺伝子の cDNA が単離された起源を示す。 m: マウス, h: ヒト, p: ブタ, r: ラット, c: ニワトリ

シド結合の立体化学は常に 2- α (エカトリアル) であり、これはアノメリック効果といわれ、電子論的に不安定である。また、アノマー位の隣接基がデオキシ体となっているために、このままでは隣接基関与を立体化学制御に用いることができない。一方、酵素法による糖鎖合成には 2 種類の方法、(i) 糖加水分解酵素の逆反応を用いる方法と (ii) 糖転移酵素を用いる方法がある。いずれの方法の場合にも、化学合成法を用いた場合には避けられない保護/脱保護というプロセスが必要無く、一段階で反応が終了するという特徴を持つ。(i) の方法の場合、シアル酸加水分解酵素は既に市販されており、その入手も容易であるが、反応収率が低く、副産物を生じる問題がある[61]。一方、(ii) のシアル酸糖転移酵素を用いた方法は反応収率が非常に高く、しかも副産物がほとんど生成しないため、(i) の方法や化学合成法と比較して、有利であると考えられる[62]。また糖蛋白質、糖脂質などの生体分子にシアル酸を付加させる場合、これらの有する生理活性を損なうことなくシアル酸を付加させるには、化学合成法よりも温和なシアル酸転移酵素を用いる酵素法が有利と考えられる[63]。これまでは、シアル酸転移酵素の糖供与体基質である CMP-シアル酸が非常に高価であることから、シアル酸転移酵素を用いたシアル酸含有糖鎖の合成は実用的ではないと考えられていた。しかし、この点については、酵素反応系内で CMP-シアル酸をリサイクルする方法や CMP-シアル酸の大量生産法が開発されたことなどにより、現在では解決された問題と考えられている。

これまでに、糖受容体基質特異性や結合様式を異にする動物由来のシアル酸転移酵素が精製、あるいはそれらをコードする遺伝子がクローニングされてお

り、その内の幾つかの酵素は遺伝子工学的手法を用いて生産されている。また、これまでに2種類の微生物由来のシアル酸転移酵素遺伝子がクローニングされ、*Neisseria meningitidis* 由来の α 2,3-シアル酸転移酵素の高発現系が構築されている。しかし、現在入手可能な多くのシアル酸転移酵素についてはその安定性、コスト、また糖受容体基質特異性等の点から工業的な実用化の段階には達していない。

細菌の培養条件の検討を行うことにより、細菌の生産する酵素を大量に生産することが可能である[64]。そこで著者は、多くの機能を有するシアル酸含有糖鎖を効率的、かつ大量に生産し産業上の利用を可能にすることを目的として、細菌由来のシアル酸転移酵素の研究を行った。具体的には、海洋性細菌、好塩性細菌を探索源として、シアル酸転移活性を有する細菌の探索を行い、シアル酸転移活性を有する新規海洋性細菌を単離することに成功した。次に、得られた海洋性細菌よりシアル酸転移酵素を電気泳動的に単一なバンドにまで精製し、この細菌由来のシアル酸転移酵素の糖受容体基質特異性が動物由来のシアル酸転移酵素のそれとは大きく異なることを明らかにした。また、この細菌由来のシアル酸転移酵素の大量生産系を構築することに成功し、シアリルオリゴ糖を効率的、かつ大量に生産する可能性を示した。さらにこの細菌由来のシアル酸転移酵素をコードする遺伝子をクローニングし、この遺伝子を大腸菌で発現させることにも成功した。

本論文は、5章で構成されている。以下に各章の概要について説明する。

第1章では、海洋性及び好塩性細菌からシアル酸転移活性を示す細菌を探索した。その結果、シアル酸転移活性を有する菌株 (JT0160 株) を単離することに成功し、その菌学的性質から JT0160 株を、*Photobacterium damsela* と同定した。

第2章では、シアル酸転移活性を示した *Photobacterium damsela* JT0160 株の生産するシアル酸転移酵素を電気泳動的に単一なバンドにまで精製し、その酵素化学的な諸性質を明らかにし、この細菌由来のシアル酸転移酵素が β -ガラクトシド α 2,6-シアル酸転移酵素であることを明らかにした。また、本酵素の各種糖鎖に対する糖受容体基質特異性の検討を行い、その糖受容体基質特異性が従来のシアル酸転移酵素のそれとは大きく異なることを明らかにした。さらに、各種複合糖質を糖受容体基質とした場合の酵素反応生成物の解析から、このシアル酸転移酵素が *N*-リンク型糖蛋白質糖鎖ばかりではなく、*O*-リンク型糖蛋白質糖鎖にもシアル酸を転移できることを明らかにした。

第3章では、*P. damsela* JT0160 株が生産するシアル酸転移酵素の生産条件の検討を行い、シアル酸転移酵素の大量生産の可能性を示した。さらに、大量に生産した粗酵素を用いたシアリルオリゴ糖の酵素合成の検討を行い、その簡便な酵素合成法の可能性を示した。

第4章では、*P. damsela* JT0160 株の生産するシアル酸転移酵素の遺伝子をクローニングした後、その全塩基配列を解析して、*P. damsela* JT0160 株由来のシアル酸転移酵素のアミノ酸配列を推定した。また、その解析結果から、動物由来のシアル酸転移酵素に共通に存在する、高度に保存されているアミノ酸配列 (シア

リルモチーフ) が本酵素には存在しないことを明らかにし、本遺伝子がコードするシアル酸転移酵素の一次構造はこれまでに知られていない新規なものである可能性を示した。

また、クローニングしたシアル酸転移酵素の遺伝子を tac プロモーターを基本とする発現プラスミドに組み込み、大腸菌における発現を行った。また、その塩基配列の解析から、このシアル酸転移酵素の膜結合領域と考えられるアミノ酸配列部分を推定した。さらに、可溶性のシアル酸転移酵素を生産することを目的として、この部分をコードする遺伝子配列の上流に停止コドン挿入した発現プラスミドを構築して、大腸菌において可溶性のシアル酸転移酵素として発現させることにも成功した。

第5章では、「総括」として、本研究のまとめと今後の展望について論じた。

第 1 章 シアル酸転移活性を有する海洋性細菌、好塩性細菌の探索及び

Photobacterium damsela JT0160 株の菌学的性質

1.1. 緒論

複合糖質糖鎖に関する多くの研究結果から、複合糖質糖鎖の有する生理活性が徐々に明らかになっている。複合糖質糖鎖を構成する単糖の中で、糖鎖構造中の非還元末端に存在することの多いシアル酸が極めて重要な機能を有することが明らかになっている。具体例をあげると、血中での血清糖蛋白質の維持・安定化、神経接着分子である N-CAM の活性制御、セレクチンの仲介する細胞接着及び CD22 を介した細胞間の相互作用など多くの生命現象の過程でシアル酸が重要な役割を果たしている[9, 10, 13-16, 65]。

近年の遺伝子工学の発展により、大腸菌や酵母等の微生物を用いて異種蛋白質を生産することが頻繁に行われている。しかし、天然に存在する蛋白質分子と組換え体蛋白質分子を比較すると、組換え体蛋白質分子では全く糖鎖が付加されていないか、もしくは糖鎖が付加されていても本来の糖鎖構造とは異なるなどの相違がみられる。こうした糖鎖の有無あるいは糖鎖構造の相違は、生体内での蛋白質分子の寿命や安定性、また、それらの活性に甚大な影響を及ぼすことが知られている[66]。こうした問題を解決するために、組換え体蛋白質に正確な糖鎖を付加するための各種宿主-プラスミド系に関する研究、あるいは糖転移酵素遺伝子を挿入した改変宿主の構築に関する研究等が行われはじめている[67]。

蛋白質、脂質などの生体分子へ糖を付加させる場合、これらの有する生理活性を損なうことなく糖を付加させるには、緒論で詳しく述べたように化学合成法よりも温和な糖転移酵素を用いる酵素法が有利と考えられる。しかしながら、現在入手可能な糖転移酵素はその多くが動物由来であり酵素の安定性、コスト、種類等の点から実用段階には至っていない。そこで、複合糖質糖鎖の機能が重要視されるなかで、とりわけ重要な役割を有すると考えられているシアル酸を糖鎖構造中に転移するシアル酸転移酵素に注目し、同酵素を生産する新規細菌のスクリーニングを試みた。これまでに、多くの病原性を有する細菌やある種の好塩性細菌の糖鎖構造に関する研究があるが[32, 68, 69]、これらの糖鎖を生合成する糖転移酵素に関する研究は、糖鎖構造に関する研究と比較して少ない。また、細菌由来のシアル酸転移酵素に関しては、これまでに *Escherichia coli* K-1 の α 2,8-シアル酸転移酵素遺伝子[33]と、*Neisseria meningitidis* 及び *Neisseria gonorrhoeae* の α 2,3-シアル酸転移酵素遺伝子[34]がクローニングされているのみであり、現在までに細菌由来のシアル酸転移酵素の精製に関する報告はない。

そこで、シアル酸転移活性を有する新規細菌のスクリーニングの対象としてユニークな糖鎖構造が報告されている好塩性細菌を選んだ。また、現段階で陸上の微生物に比べ研究がなされておらず、陸上由来の細菌にはみられない特徴や機能を有することが期待される海洋性細菌もその対象として選択した。

1.2. 実験材料及び方法

1.2.1. 材料

海洋性細菌の単離源として日本沿岸海水及び海泥を用いた。これらのサンプルは4℃で冷蔵保存した。好塩性細菌は、日本たばこ産業（株）海水総合研究所の保有菌株（110 菌株）を用いた。また、アメリカンタイプカルチャーコレクション（米国、以下、ATCC とする。）より 5 菌株の *Photobacterium damsela*（ATCC33536 株、ATCC33537 株、ATCC33538 株、ATCC33539 株、ATCC35083 株）を購入した。

1.2.2. 細菌の単離及び培養方法

海水サンプルは原水及び滅菌海水で 10 倍、100 倍に希釈した各サンプル 100 μ l をマリンプロス 2216（Table 1-1、ディフコ社、デトロイト、米国）-寒天プレートに塗布し、25℃で好氣的に培養した。海泥サンプルは滅菌海水に懸濁後、海水サンプルと同様の処理を行った。培養後、生じたコロニーを再度マリンプロス 2216-寒天プレート上で画線培養し、25℃の培養器中で培養した。上記の培養で独立したコロニーに対し、さらに同様の操作を繰り返し菌株の純化を行った。得られた菌株は、25℃でマリンプロス 2216-寒天プレート上に画線培養して保存した。

純化した海洋性細菌は、10ml のマリンプロス 2216 培地（pH 8.2）を用い、25℃、200rpm で振とう培養した。培養時間は 12 時間から 24 時間とした。

Table 1-1 マリンブロス 2216、SGC培地の組成

マリンブロス 2216培地

Bacto peptone	5.0g	Sodium bicarbonate	0.16g
Bacto yeast extract	1.0g	Potassium bromide	0.08g
Ferric citrate	0.1g	Strontium chloride	0.034g
Sodium chloride	19.45g	Boric acid	0.022g
Magnesium chloride dried	5.9g	Sodium silicate	0.004g
Sodium sulfate	3.24g	Sodium fluoride	0.0024g
Calcium chloride	1.8g	Ammonium nitrate	0.0016g
Potassium chloride	0.55g	Disodium phosphate	0.008g

この組成からなるマリンブロス 2216 (37.4g)を蒸留水 1 literに溶解し、pHを8.2とした。

SGC (Sehgal and Gibbons) 培地

Casamino acid	7.5g
Yeast extract	10.0g
Sodium citrate	3.0g
Potassium chloride	2.0g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	20.0g
FeCl ₂	0.023g
Sodium chloride	250g

これらを蒸留水 1literに溶解し、最終 pH7.4に調整した。

好塩性細菌は、10ml の SGC 培地 (Table 1-1、pH 7.4) を用い、30°C、200rpm で振とう培養した。培養時間は 5 日から 14 日とした。

1.2.3. 菌体破砕液の調製

海洋性細菌、好塩性細菌の各菌株をそれぞれ培養し、得られた培養液を 6,000 xg で 10 分間、4°C で遠心分離して菌体を回収した。得られた菌体に 1ml の抽出緩衝液 {0.2% (V/V) Triton X-100 を含む 50mM カコジレート緩衝液 (pH 6.0) } を加え、氷水中で 10 分間超音波処理を行い菌体を破砕し、菌体破砕液として用いた。

1.2.4. シアル酸転移活性の測定

シアル酸転移活性の測定は、以下のように行った[70]。

(1) 糖受容体基質溶液 {100% (W/V) アシアロフェツイン (シグマ社、セントルイス、米国) -50 mM カコジレート緩衝液 (pH 6.0) }、糖供与体基質溶液 {¹⁴C でシアル酸をラベルした CMP-シアル酸 (220 pmole、45,100 cpm) -50 mM カコジレート緩衝液 (pH 6.0) } を調製した。

(2) 糖受容体基質溶液 50 μ l、糖供与体基質溶液 10 μ l、菌体破砕液 40 μ l を混合し、30°C、30 分間インキュベートしてシアル酸転移反応を行った。

(3) 反応液を、0.1M 塩化ナトリウムで平衡化したセファデックス G-50 (0.8 cm x 18.0 cm、ファルマシア社、ウプサラ、スウェーデン) に供し、ゲルろ過を行った (流速 0.5 ml/min)。

(4) セファデックス G-50 を用いたゲルろ過では、糖受容体基質を含む高分子はポイド画分に溶出するため、この画分を回収し、放射活性を液体シンチレーションカウンターを用いて測定し、糖受容体基質に転移したシアル酸の定量を行った。この方法で放射活性が認められた場合、シアル酸転移活性が存在するものと判断した。

1.2.5. 菌株の生化学的性状と同定

微生物の種々の生化学的試験及び同定は、成書[71, 72]に記された方法に従って、日本食品分析センターで行われた。

1.3. 結果

1.3.1. シアル酸転移活性を示した菌株

172 菌株の海洋性細菌及び 110 菌株の好塩性細菌を用いて、シアル酸転移活性を有する菌株の探索を行った結果、1993 年 6 月に相模湾酒匂沿岸（神奈川県小田原市）で採取した海水中から単離した、海洋性細菌 JT0160 株の菌体破碎液中にシアル酸転移活性が認められた。しかし、今回スクリーニングの対象とした JT0160 株以外の 281 菌株の菌体破碎液中には、シアル酸転移活性は認められなかった。

長期の保存では、マリンプロス 2216 培地 (pH 8.2) で JT0160 株を培養後、終濃度 40% のグリセリン溶液中、 -80°C で保存した。この状態で JT0160 株は、少なくとも 3 年間、生存できることを確認した。

1.3.2. JT0160 株の形態学的特徴

前述の寒天平板上で 25°C 、2 日間培養した菌体を 1 白金耳採取し、これを 5ml の滅菌海水に懸濁後、スライドガラス上に適量滴下し、プレパラートを作製した。これを光学顕微鏡で観察したところ、菌体は活発に遊走していた。本菌株の形態を Fig. 1-1 (1)、(2)、(3) に示す。

1.3.3. JT0160 株の生化学的性状と同定結果

種々の生化学的試験により解析された JT0160 株の生化学的性状を Table 1-2、1-3 に示す。

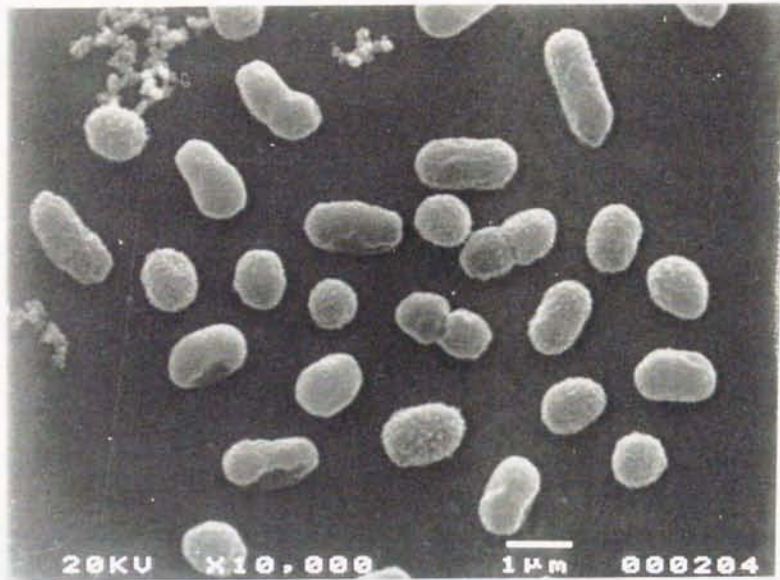


Fig. 1-1 (1) 分離菌 JT0160株の形態例
液体培地で18時間振とう培養した時の形態を示す。

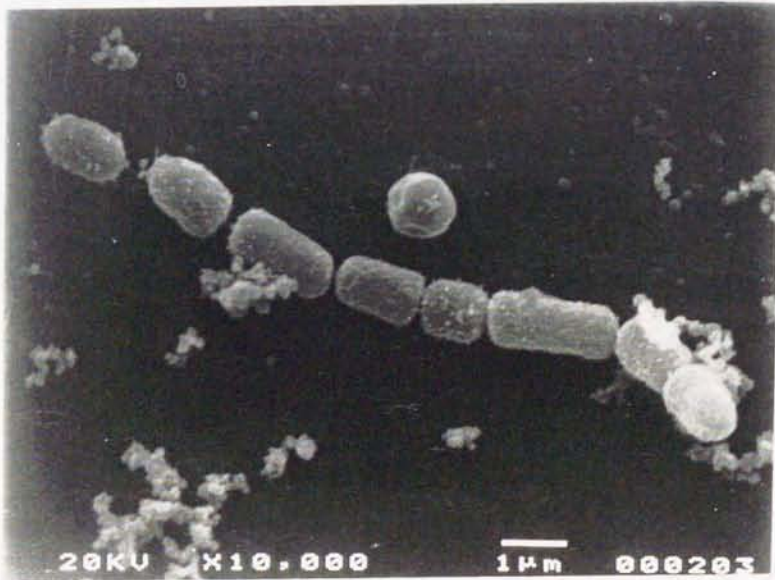


Fig. 1-1 (2) 分離菌 JT0160株の形態例
液体培地で18時間静置培養した時の形態を示す。

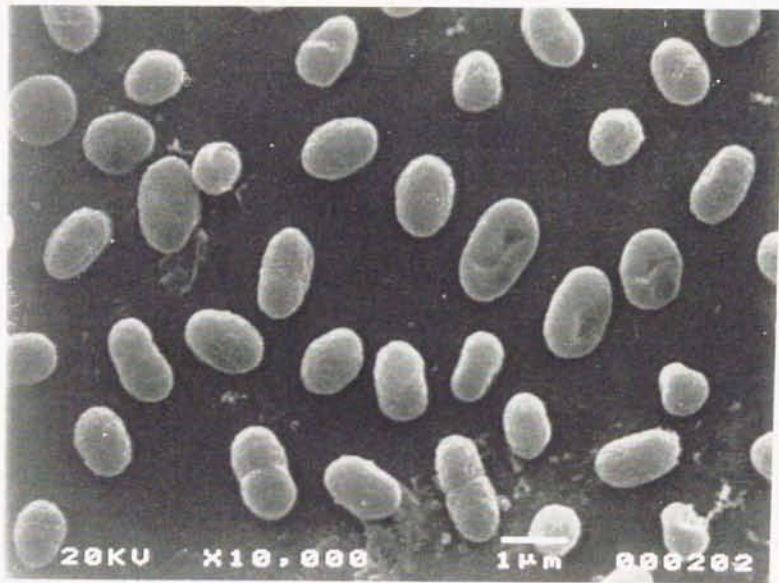


Fig. 1-1 (3) 分離菌JT0160株の形態例
斜面培地で18時間培養した時の形態を示す。

Table 1-2 海洋性細菌JT0160株の性状 (1)

試験項目	試験結果	
	JT0160株	<i>Photobacterium damsela</i> (Type strain, ATCC33539)
形態	桿菌	桿菌
グラム染色性	-	-
孢子	-	-
運動性	+	+
鞭毛	単極毛	単極毛
酸素に対する態度	通性嫌気性	通性嫌気性
色素生産	-	-
オキシダーゼ	+	+
カタラーゼ	+	+
アルギニンジヒドラーゼ	+	+
リパーゼ	+	+
OF	F	F
Na ⁺ 要求性	+	+
0%NaCl培地での生育	-	-
1%NaCl培地での生育	+	+
3%NaCl培地での生育	+	+
6%NaCl培地での生育	+	+
4°Cでの生育	-	-
30°Cでの生育	+	+
40°Cでの生育	-	-
菌体内DNAのG C含量 (mole%)	42	43

Table 1-3 海洋性細菌JT0160株の性状 (2)

試験項目	試験結果	
	JT0160株	<i>Photobacterium damsela</i> (Type strain, ATCC33539)
硝酸塩還元	+	+
発光性	-	-
グルコースからのガス生成	+	+
VP反応	+	+
ゼラチン液化	-	-
資化性		
酢酸塩	-	-
マルトース	+	+
L-プロリン	+	+
ピルビン酸塩	-	-
D-キシロース	-	-
セロビオース	-	-
D-ガラクトース	+	+
D-ガラクチュロン酸	-	-
D-グルコン酸塩	-	-
グルコース	+	+
L-グルタミン酸塩	-	+
D-マンノース	+	+
シュークロース	-	-
マンニトール	-	-

形態観察、生理的性状試験、菌体内 DNA の GC 含量の測定結果から、JT0160 株は *Photobacterium damsela* と同定された。そこで、本菌株を *P. damsela* JT0160 株と命名した。

なお、*P. damsela* は 1985 年に *Vibrio* 属から *Listonela* 属に[73]、さらに 1991 年に *Listonela* 属から *Photobacterium* 属へ分類学的に移行されている[74]。

1.3.4. アメリカンタイプカルチャーコレクションより購入した 5 菌株の

Photobacterium damsela のシアル酸転移活性

アメリカンタイプカルチャーコレクションより購入した 5 菌株の *P. damsela* のシアル酸転移活性を上述の方法で測定したところ、ATCC33536 株、ATCC33537 株にはシアル酸転移活性は認められなかったが、ATCC33538 株、ATCC33539 株、ATCC35083 株にそれぞれシアル酸転移活性が認められた。しかし、*P. damsela* JT0160 株及びこれら 3 種類の ATCC 株では単位菌体量当たりの酵素活性に違いが認められた。*P. damsela* JT0160 株と ATCC33538 株の酵素活性は高く単位菌体量当たりの酵素活性は両者でほぼ同じであった。一方、ATCC33539 株、ATCC35083 株では *P. damsela* JT0160 株の約 6 割の活性であった。

1.4. 考察

今回 282 菌株の好塩性細菌、海洋性細菌を対象にシアル酸転移活性を有する菌株のスクリーニングを行い、シアル酸転移活性を有する一菌株の海洋性細菌 (JT0160 株) の単離に成功した。この菌株は *Photobacterium damsela* と同定され、*P. damsela* JT0160 株と命名した。しかし、スクリーニングの対象とした JT0160 株以外の菌株については、シアル酸転移活性が全く検出できなかったことから、本活性は細菌においては非常に特殊な酵素活性と考えられた。

P. damsela (ATCC33539 株) は、ルリスズメダイの体表に潰瘍を引き起こす病原性細菌であることが知られている[75]。*P. damsela* (ATCC33539 株) がシアル酸転移活性を有することから、同菌の細胞表面にはシアル酸を含む糖鎖が存在することが予想され、このシアル酸を含む糖鎖を介してルリスズメダイの体表に接着し、潰瘍を引き起こしている可能性が考えられる。今回相模湾沿岸海水中から単離した *P. damsela* JT0160 株及びシアル酸転移活性を示した ATCC の 3 菌株とシアル酸転移活性を持たない ATCC の 2 菌株間の病原性との関係を調べることは、今後、シアル酸と病原性との関係を明らかにしていく上で大変興味深い問題と思われる。

原核細胞、真核細胞由来を問わず、シアル酸は多くの場合、糖鎖構造の非還元末端に存在する。これらの知見から、*P. damsela* JT0160 株の生産するシアル酸転移酵素も生体内に存在する何らかの糖鎖の生合成に関与しており、また、その糖鎖の非還元末端がシアル酸である可能性が高いものと思われる。この観点からすれば、*P. damsela* JT0160 株の生産するシアル酸転移酵素の細胞内における

糖受容体基質の探索は非常に重要であると考えられる。今後、本菌株の糖受容体基質の糖鎖構造を明らかにすることにより、シアル酸転移酵素以外の糖転移酵素も検出されるものと期待される。

細菌由来のシアル酸転移酵素に関しては、これまでに *Escherichia coli* K-1 の α 2,8-シアル酸転移酵素遺伝子[33]と、*Neisseria meningitidis* 及び *Neisseria gonorrhoeae* の α 2,3-シアル酸転移酵素遺伝子[34]がクローニングされているのみであり、現在までに細菌由来のシアル酸転移酵素の精製に関する報告はない。

そこで、今回のスクリーニングで単離した *P.damsela* JT0160 株の生産するシアル酸転移酵素の酵素化学的性質を明らかにするために、次章においてシアル酸転移酵素の精製を試みた（第2章参照）。