

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

近年複合糖質糖鎖の有する生物学的機能が医学・薬学・農学といった多くの分野で注目されるようになり、その機能を解析、応用するために複合糖質糖鎖の化学合成法の研究が活発に行われ、従来のグリコシル化反応に比べて著しい反応効率の改善がなされている[76-78]。しかし、依然としてある種のグリコシル結合、例えば α -シアリル化、 β -マンノシル化等の構築は化学合成では非常に困難である[60, 79]。

これらの問題点を解決しうる方法として、糖転移酵素を用いる化学・酵素法が考えられる[80]。化学・酵素法とは、化学合成法と酵素法を用いる糖鎖の合成法である。この方法でシアル酸転移酵素は、 α -シアリル化が化学的手法では困難なグリコシル化反応の一つであること、また、通常シアル酸は複合糖質糖鎖の非還元末端に存在することが多いことから、始めにシアル酸以外の糖鎖部分を化学合成法を用いて合成し、最後にシアル酸転移酵素で糖鎖にシアル酸を転移させるという比較的単純な戦略がたてられる等の点から、この化学・酵素法を用いる糖鎖合成への有効利用が最も現実的と考えられているものの一つである[62]。

しかし、この方法を用いて糖鎖を合成する場合、酵素の大量供給や酵素の持

つ基質特異性等解決しなければならない問題点がある[81]。これまでに多くの動物由来シアル酸転移酵素遺伝子がクローニングされているものの、同酵素の安定的な供給は未だ困難である。また、シアル酸転移酵素の糖受容体基質特異性が非常に厳密であることから、これまで知られている酵素が大量に供給可能となっても合成可能な糖鎖の種類は限定されてしまう[81, 82]。

一般に細菌由来の酵素は大量に供給することが可能であり、また同様な機能を有する酵素でもその起源が全く異なることから、動物由来の酵素の基質特異性とは異なることが期待される。そこで上記の問題点を解決する方法の一つとして細菌由来の酵素の探索を行い、前章に記したようにシアル酸転移活性を示す新規海洋性細菌を単離した。本章では、このシアル酸転移酵素を使用してシアリルオリゴ糖を生産する場合に、本酵素の酵素化学的性質を明らかにする必要があることから、*P. damsela* JT0160 株の生産するシアル酸転移酵素を精製し、本酵素の酵素化学的な諸性質及び各種の糖に対する糖受容体基質特異性について調べた。

2.2 実験材料及び方法

2.2.1. 材料

メチル- α -D-N-アセチルガラクトサミニド、メチル- β -D-N-アセチルラクトサミニドは、Sarker and Kabat の方法[83]、及び Kajihara らの方法[84]でそれぞれ合成した。アシアロフェツイン、アシアロムチン、 α -1 酸性糖蛋白質は、シグマ社（セントルイス、米国）より購入した。アシアロ α -1 酸性糖蛋白質は、 α -1 酸性糖蛋白質を 0.1 M 硫酸を用いて酸加水分解を行い調製した[70]。その他の試薬は全て市販の特級試薬を用いた。

2.2.2. 酵素活性測定法

シアル酸転移酵素活性は、シアル酸部分を放射性同位元素 (^{14}C) ラベルした CMP-シアル酸 [CMP-[4,5,6,7,8,9- ^{14}C]-シアル酸は NEN デュポン社（ボストン、米国）、CMP-シアル酸はシグマ社（セントルイス、米国）} を糖供与体基質として用いて酵素反応を行い、糖受容体基質として用いたラクトース（関東化学、東京、日本）に転移したシアル酸量を定量した。具体的には、以下の手順で行った。0.02% (V/V) の Triton X-100 を含む 20mM カコジレート緩衝液 (pH 5.0) 25 μ l 中に、70 nmol の CMP-シアル酸 (642 cpm/nmol)、1.25 μ mol のラクトース及び酵素 (0.02 U 以下) を混合し、30 $^{\circ}\text{C}$ で 3 分間シアル酸転移反応を行った。このシアル酸転移反応終了後、反応溶液を 5 mM リン酸緩衝液 (pH 6.8) で 2ml となるように希釈し、この希釈溶液を Dowex 1x8 (フォスフェート型、ダウケミカル社、ミシガン、米国) のカラム (0.5 x 2 cm) に供した。このカラムの溶出

液 (2 ml、流速 1ml/min) を直接、シンチレーションバイアルに分取して、液体シンチレーションカウンター (パッカード社 モデル TR1900、コネチカット、米国) で放射活性を測定し、転移したシアル酸量を定量した。上記の条件で、1分間に 1 μ mol のシアル酸をラクトースに転移させる酵素量を 1 単位 (U) とした。

2.2.3. 糖蛋白質を糖受容体基質とした酵素活性測定法

糖蛋白質を糖受容体基質とした場合、酵素活性はシアル酸部分を放射性同位元素 (14 C) でラベルした CMP-シアル酸 (NEN デュボン社、ボストン、米国) を糖供与体基質として用い、糖受容体基質として用いた各種糖蛋白質に転移したシアル酸量を定量することで求めた。具体的には、以下の手順で行った。

0.02% (V/V) Triton X-100 を含む 20 mM カコジレート緩衝液 (pH 5.0) 100 μ l 中に、70 nmol の CMP-シアル酸 (642 cpm/nmol)、2 mg の糖蛋白質及び酵素 (0.1 U) を混合し、30 $^{\circ}$ C で酵素反応を行った。酵素反応を一定時間行った後に、反応溶液を 100 $^{\circ}$ C で 1 分間加熱することで酵素反応を停止した。その後、反応溶液を 0.1 M 塩化ナトリウムで平衡化したセファデックス G-50 (super fine, 0.8 x 14 cm、ファルマシア社、ウプサラ、スウェーデン) に供し、0.1 M 塩化ナトリウムで反応生成物を溶出した (流速 0.5 ml/min)。この条件で、2~4 ml の画分に溶出する糖蛋白質を集め、放射活性を測定して転移したシアル酸量を定量した。

2.2.4. 糖脂質を糖受容体基質とした酵素活性測定法

糖脂質を糖受容体基質とした場合の酵素活性測定も、糖蛋白質の場合と同様にシアル酸部分を放射性同位元素 (^{14}C) でラベルした CMP-シアル酸を糖供与体基質として用い、糖脂質に転移したシアル酸量を定量することで行った。具体的には、以下の手順で行った。

0.3% (V/V) Triton X-100 を含む 20 mM カコジレート緩衝液 (pH 5.0) 60 μl 中に、70 nmol の CMP-シアル酸 (642 cpm/nmol)、0.2 mM の糖脂質及び酵素 (0.1 U) を添加し、30 $^{\circ}\text{C}$ で反応を行った。酵素反応を一定時間行った後に、反応溶液を 100 $^{\circ}\text{C}$ で 1 分間加熱することで酵素反応を停止し、反応溶液を蒸留水で 1 ml に希釈して、セップパック C_{18} (ウォータズ社、マサチューセッツ、米国) に供した。その後、セップパック C_{18} を 24 ml の蒸留水で洗浄し、10 ml のメタノールで糖脂質を溶出させてこの画分の放射活性を測定し、転移したシアル酸量を定量した。

2.2.5. *P. damsela* JT0160 株の培養

マリンプロス 2216 培地 (pH 7.6) を調製して 10 ml ずつ試験管に分注し、滅菌した。これにマリンプロス 2216-寒天プレートで継代培養した *P. damsela* JT0160 株のコロニーから 1 白金耳の菌体を採取し、接種した。これを、30 $^{\circ}\text{C}$ 、150 rpm で 8 時間、振とう培養して種培養液とした。種培養液を、500 ml のマリンプロス 2216 液体培地 (pH 7.6) に 1% (V/V) 添加し、30 $^{\circ}\text{C}$ 、150 rpm で 16 時間培養した。培養終了後、培養液を遠心分離 (6,000 $\times g$ 、20 分) して菌体を回収し、湿菌体 3 g を得た。

2.2.6. シアル酸転移酵素の精製

(1) 菌体からの粗酵素液の調製

2.2.5.の方法で得られた湿菌体を滅菌海水で洗浄後、湿菌体 3 g に対し 60 ml の抽出緩衝液 {0.2% (V/V) Triton X-100 及び 1 M 塩化ナトリウムを含む 20mM カコジレート緩衝液 (pH 6.0) } を加えて菌体を懸濁した。なお、抽出緩衝液のイオン強度を増加させるために、1 M 塩化ナトリウムを加えた。菌体懸濁液を氷冷下、超音波処理 (ブランソンソニファイヤーモデル 450、パルスデューティサイクル 50%、出力レベル 2、ブランソン社、ダンバリー、米国) した。菌体の破碎は、懸濁液の 660 nm の吸光度が破碎前の値の 30%以下になるまで行った。得られた菌体破碎液を直ちに 4℃、100,500 xg で一時間遠心分離して上清を集めた。得られた上清を 0.2% (V/V) Triton X-100 を含む 20mM カコジレート緩衝液 (pH 6.0) に対して 12 時間透析した。透析終了後、4℃、100,500 xg で一時間遠心分離して上清を集め、これを粗酵素液とした。

(2) Q-セファロース HR 26/10 カラムクロマトグラフィー

得られた粗酵素液 80 ml を 0.2% (V/V) Triton X-100 を含む 20mM カコジレート緩衝液 (pH 6.0) で平衡化した Q-セファロース HR 26/10 カラム (ファルマシア社、ウプサラ、スウェーデン) に供した。カラムをカラム体積の 3 倍容の同緩衝液で洗浄後、0 から 1 M 塩化ナトリウムの直線濃度勾配で溶出した (流速 6 ml/min、全溶出量 1,060 ml) 。この間、溶出液を 10 ml ずつ分取し、各画分の酵素活性を測定し、活性画分を集めた。得られた活性画分を、0.2% (V/V) Triton

X-100 を含む 20mM カコジレート緩衝液 (pH 6.0) に対して 12 時間透析した。

(3) ハイドロキシアパタイトカラムクロマトグラフィー

2.2.6. (2) で得られた活性画分 20 ml を、0.2% (V/V) Triton X-100 を含む 20mM カコジレート緩衝液 (pH 6.0) で平衡化したハイドロキシアパタイトカラム (2 x 10 cm、高研、東京、日本) に供した。カラムをカラム体積の 3 倍容の同緩衝液で洗浄後、同緩衝液から 0.2% (V/V) Triton X-100 を含む 350 mM リン酸緩衝液 (pH 6.0) への直線濃度勾配で溶出した (流速 3 ml/min、全溶出量 620 ml)。この間、溶出液を 5 ml ずつ分取し、各画分の酵素活性を測定し、活性画分を集めた。得られた活性画分を、限外ろ過膜 (モルカット L、日本ミリポア社、東京、日本) で、3.2 倍に濃縮した。

(4) セファクリル S-200 カラムクロマトグラフィー

2.2.6. (3) で得られた活性画分 10 ml を 0.2% (V/V) Triton X-100、0.1 M 塩化ナトリウムを含む 20mM カコジレート緩衝液 (pH 6.0) で平衡化したセファクリル S-200 (2.6 x 60 cm、ファルマシア社、ウブサラ、スウェーデン) に供し、同緩衝液で溶出した (流速 2 ml/min、全溶出量 350 ml)。溶出液を 10 ml ずつ分取して、各画分の酵素活性を測定し、活性画分を集めた。得られた活性画分を、0.2% の Triton X-100 を含む 20mM カコジレート緩衝液 (pH 6.0) に対して 12 時間透析した後に、限外ろ過膜で 5.3 倍に濃縮した。

(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

2.2.6. (4) で得られた活性画分 2 ml を 0.2% (V/V) Triton X-100、0.1 M 塩化ナトリウムを含む 20mM カコジレート緩衝液 (pH 6.0) で平衡化した CDP-ヘキサノールアミンアガロースカラム (1 x 3 cm、ゲンザイム社、マサチューセッツ、米国) に供し、カラムをカラム体積の 6 倍容の同緩衝液で洗浄後、8 倍容の 2 M 塩化ナトリウムと 0.2% (V/V) Triton X-100 を含む 20mM カコジレート緩衝液 (pH 6.0) で溶出した (流速 0.5 ml/min)。溶出液は 2 ml ずつ分取した。

2.2.7. 分子量測定

精製した酵素の分子量は、Laemmli の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (以下、SDS-PAGE とする。) [85]、及びゲル濾過法によって求めた。SDS-PAGE のゲルには、12.5%ゲルを用いた。分子量マーカークには分子量 97kDa のホスホリラーゼ、66kDa の牛血清アルブミン、42kDa のアルドラーゼ、30kDa のカルボニックアンヒドラーゼを用い、精製酵素標品の移動度より分子量を求めた。また、ゲルろ過法を用いた場合、マトリックスとしてアサヒパック GS-510 (旭化成、東京、日本) を用い、分子量マーカーク (分子量 97kDa のホスホリラーゼ、66kDa の牛血清アルブミン、42kDa のアルドラーゼ、30kDa のカルボニックアンヒドラーゼ) の溶出時間との比較から分子量を求めた。

2.2.8. 蛋白質量の測定

蛋白質量は牛血清アルブミン (BSA) をスタンダードとして、Lowry 法[86]で

測定した。

2.2.9. シアル酸転移酵素の N 末端アミノ酸配列の決定

シアル酸転移酵素の N 末端アミノ酸配列は、Matsudaira の方法[87]に従い、以下のように決定した。精製したシアル酸転移酵素標品を Laemmli の方法で SDS-PAGE を行った。泳動終了後、ゲル中の酵素蛋白質を PVDF 膜に転写し、0.2% (W/V) クマジブリリアントブルー-R-250 で染色した。その後、シアル酸転移酵素標品が転写された膜部分を切り出し、自動プロテインシークエンサー (パーキンエルマー社 モデル 476A、カリフォルニア、米国) を用いて、精製酵素標品の N 末端アミノ酸配列を決定した。

2.2.10. 等電点測定

ファストゲル IEF 4.0-6.5 ゲル (ファルマシア社、ウプサラ、スウェーデン) を用いてファストシステム (ファルマシア社) で等電点電気泳動を行い、等電点電気泳動用マーカー蛋白質 {大豆トリプシンインヒビター (pI 4.55)、 β -ラクトグロブリン A (pI 5.20)、ウシカルボニックアンヒドラーゼ b (pI 5.85)} の移動度から精製酵素標品の等電点を測定した。

2.2.11. 単糖に対する糖受容体基質特異性

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-マンノピラノシド、メチル- β -D-マンノピラノシド、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-N-アセチルグルコサミニド、メチル-β-D-N-アセチルグルコサミニド（以上シグマ社、セントルイス、米国）、メチル-α-D-N-アセチルガラクトサミニドを糖受容体基質として用い、シアル酸転移酵素の単糖に対する糖受容体基質特異性を解析した。酵素反応は 2.2.2. に記した方法で行った。

2.2.12. オリゴ糖に対する糖受容体基質特異性

ピリジルアミノ化糖鎖を用いて、シアル酸転移酵素のオリゴ糖に対する糖受容体基質特異性の検討を行った。ピリジルアミノ化糖鎖は全て、宝酒造（京都、日本）より購入した。具体的には、以下に示す方法で行った。

(1) 酵素反応

酵素反応溶液（25 μl）は、糖受容体基質（ピリジルアミノ化糖鎖）50 pmol、糖供与体基質 CMP-シアル酸 143 pmol、精製酵素 3 mU 及び 0.02% (V/V) Triton X-100 を含む 20 mM カコジレート緩衝液（pH 5.0）からなり、酵素反応は 30°C で 4.5 から 20 時間行った。反応溶液を 100°C で、2 分間処理することにより反応を停止して、反応生成物の分析を行った。

(2) 反応生成物の分析

HPLC システムとしてシマズ LC-10（島津製作所、京都、日本）、分析用カラムとしてタカラパルパックタイプ R（宝酒造、京都、日本）を用いた。（1）の方法で調製した反応溶液を、溶液 A {0.15% (V/V) n-ブタノールを含む 100 mM

酢酸-トリエチルアミン緩衝液、pH 5.2} で平衡化した分析用カラムに注入し、その後、溶液 A 及び溶液 B {0.5% (V/V) n-ブタノールを含む 100 mM 酢酸-トリエチルアミン、pH 5.2} を用いて、溶液 A に対して溶液 B の濃度が 30-100% の直線濃度勾配 (0-35 分)、次いで 100% 溶液 B (35-50 分) により、ピリジルアミノ化糖の溶出を行った。流速は 1ml/min、カラム温度は 40°C とした。ピリジルアミノ化糖鎖は蛍光 (Ex:320 nm、Em:400nm) で検出した[88]。

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

精製酵素 200 mU、200 μmol のメチル-β-D-N-アセチルラクトサミニド、16 μmol の CMP-シアル酸を 1 ml の 20 mM カコジレート緩衝液 (pH 6.0) に溶解し、30°C で 1 時間、シアル酸転移反応を行った。なお、この反応条件は糖供与体基質として ¹⁴C でラベルしたシアル酸を含む CMP-シアル酸を用いた反応の結果から設定した。

反応生成物の精製は、Sahasran らの方法[89]の変法で行った。シアル酸転移反応終了後、反応溶液 1 ml を蒸留水で 10 倍希釈した。この溶液を、Dowex 1x2 (フوسفフェート型、ダウケミカル社、ミシガン、米国) のカラム (1.5 cm x 9 cm) に供した。このカラムを 90 ml の蒸留水で洗浄後、60 ml の 5 mM リン酸緩衝液 (pH 6.8) で反応生成物を溶出させ (流速 1 ml/min)、5 ml ずつ分取した。各画分中の反応生成物は、過ヨウ素酸-レゾルシノール法で確認した[90]。反応生成物を含む画分を回収し、ロータリーエバポレーターで濃縮し、活性炭カラム

(1.5 cm x 6.8 cm) に供した。その後、カラム体積の 3 倍容の蒸留水で洗浄し、2 倍容の 10%、20%、50%、100%のエタノールでそれぞれ溶出し(流速 1 ml/min)、分取した。反応生成物を含む画分を集めて、ロータリーエバポレーターで濃縮し、精製反応生成物とした。反応生成物の構造解析は、FAB-MS、 $^1\text{H-NMR}$ 及び $^{13}\text{C-NMR}$ を用いて行った。

2.3.結果

2.3.1. 培養及びシアル酸転移酵素の精製

P. damsela JT0160 株を、マリンプロス 2216 液体培地を用いて 30°C、16 時間フラスコ培養した。この培養条件での酵素活性と菌体の増殖の経時変化を Fig. 2-1 に示す。培養後、培養液を遠心分離して菌体を集め、培養液 10 liter から湿重で 30 g の菌体を得た。粗酵素液は 2.2.6. (1) で示した方法で調製した。菌体破碎液と粗酵素液の酵素活性及び酵素抽出における界面活性剤の添加効果を Table 2-1 に示す。

粗酵素液からシアル酸転移酵素を Q-セファロース HR26/10、ハイドロキシアパタイト、セファデックス S-200、CDP-ヘキサノールアミンアガロースカラムを用いた各種カラムクロマトグラフィーを順次行い、SDS-PAGE で単一バンドを示すまで精製した。粗酵素液からの精製倍率は 687 倍、収率は 19%であった (Table 2-2)。

精製酵素の SDS-PAGE 結果を Fig. 2-2 に示す。この精製酵素は、61,000 Da の分子マスを示した。また、ゲルろ過法を用いた分子マスの測定から、精製酵素の分子マスは 64,000 Da と推定された。精製酵素標品の N 末端アミノ酸配列は、N-末端側から NH₂-XNSDNTSLKETVSSXXAXV (X は、未同定のアミノ酸残基) であった。また、精製酵素標品の等電点電気泳動の結果 (Fig. 2-3)、pI=4.6 の単一バンドとして検出された。これらの結果より、本酵素はシングルポリペプチドと結論された。以下、他のシアル酸転移酵素との混同を避けるため、本酵素を STase0160 と称することとした。

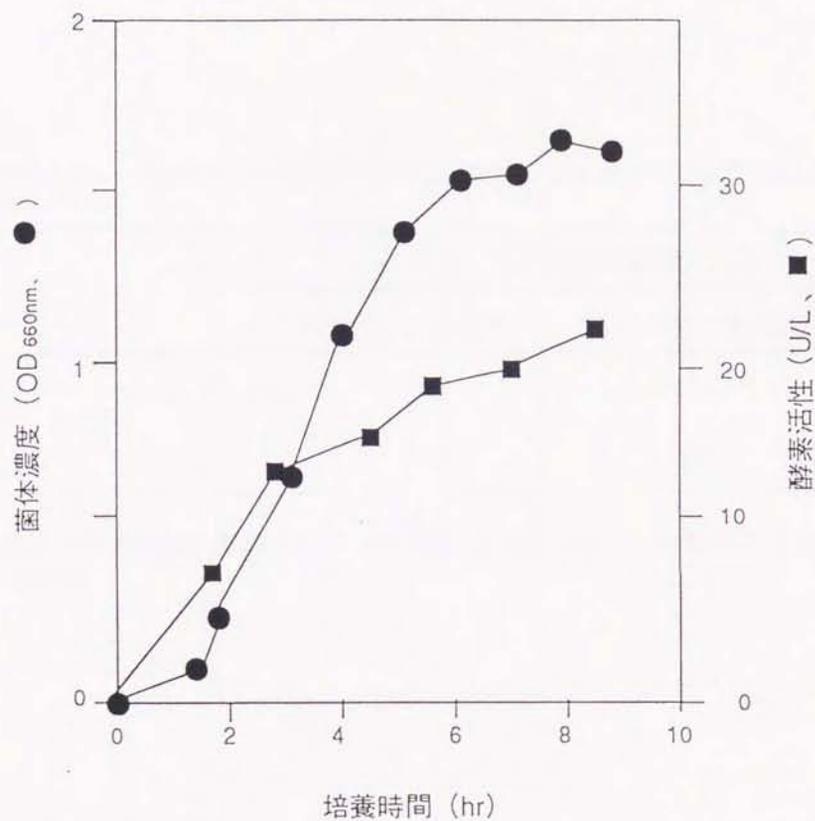


Fig. 2-1 *P. damsela* JT0160株培養時の菌体増殖とシアル酸転移活性の経時変化

マリンプロス2216培地で *P. damsela* JT0160株を培養した際の、菌体増殖とシアル酸転移活性の経時変化を示す。菌体量は660 nmの吸光度 (OD) で測定した。酵素活性は、2.2.2.に示した方法で測定した。

Table 2-1 菌体からの酵素抽出におけるTriton X-100の添加効果

	シアル酸転移活性 (U/L)	
	Triton X-100添加	Triton X-100無添加
菌体破碎液	23	19
粗酵素液	2.1	N.D.

菌体破碎液及び粗酵素液の酵素活性は、培養液 (1 liter) 当たりの酵素量で示している。
N.D.: 検出不能

Table 2-2 粗酵素液からのシアル酸転移酵素の精製表

Step	Volume (ml)	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	yield (%)	Purification (fold)
Crude extract	760	2,584	21.1	0.008	100	1
Q-Sepharose	240	552	12.4	0.022	59	2.8
Hydroxyapatite	120	85	8.0	0.094	38	11.8
Sephacryl S-200	30	20.1	6.7	0.3	32	37.5
CDP-hexanolamine-agarose	15	0.75	4.1	5.3	19	687.5

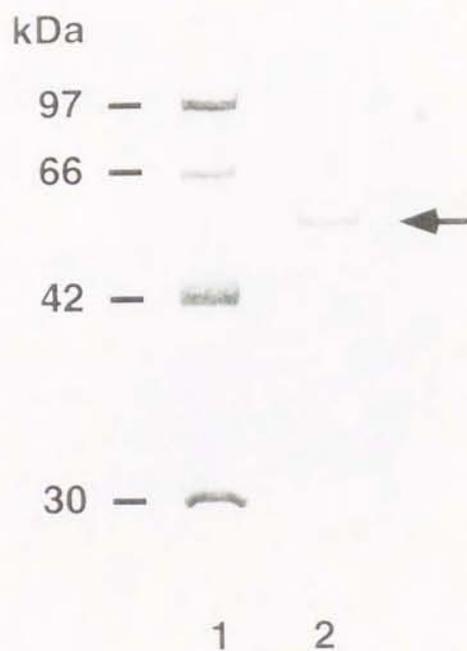


Fig. 2-2 精製酵素標品のSDS-PAGE

12.5% ポリアクリルアミドゲルを用いて、電気泳動を行った。
 蛋白質の染色は銀染色法を用いた。

1、分子量マーカー {ホスホリラーゼ (97kDa)、牛血清アルブミン (66kDa)、アルドラーゼ (42kDa)、カルボニックアンハイドラーゼ (30kDa)}、2、シアル酸転移酵素精製標品

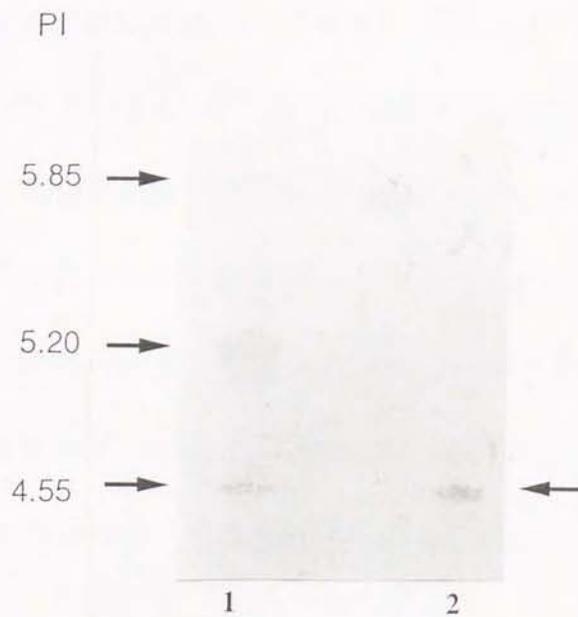


Fig. 2-3 精製酵素標品の等電点電気泳動

IEF 4-6.5 ゲルを用いて、電気泳動を行った。蛋白質の染色は銀染色法を用いた。

1, 等電点マーカー {大豆トリプシンインヒビター (4.55)、 β -ラクトグロブリン A (5.20)、ウシカルボニックアンハイドラーゼ b (5.85)}、2, シアル酸転移酵素精製標品

2.3.2. *P. damsela* JT0160 由来シアル酸転移酵素 (STase 0160) の性質

(1) 反応至適温度と熱安定性

STase 0160 の反応至適温度は 30°C であった (Fig. 2-4)。本酵素を、20 mM カコジレート緩衝液中 (pH 5.0) で 40°C、5 分間処理した後に、通常の実験を行った場合、無処理の場合と比較して、酵素活性は 85% に低下した。さらに、55°C で 5 分間処理した場合には、酵素活性は 5% に低下した (Fig. 2-5)。これらの結果から、STase 0160 は動物由来の酵素と比較して熱には不安定な酵素であると考えられた。本酵素を -80°C で保存した場合、20 mM カコジレート緩衝液中 (pH 5.0) で少なくとも 3 カ月間、活性の低下は認められなかった。

(2) 反応至適 pH と pH 安定性

各 pH における STase 0160 の酵素活性の相対比を Fig. 2-6 に示す。この結果から本酵素の反応至適 pH は、5.0 であった。また、異なる pH で同酵素を 30°C で 1 時間放置し、初期反応量の 80% 以上の活性を保持する pH 領域を本酵素の安定 pH 領域として求めたところ、4.5~6.0 であった (Fig. 2-7)。

(3) 単糖に対する糖受容体基質特異性

単糖を糖受容体基質として酵素反応を行った結果 (Table 2-3)、STase 0160 は今回用いた単糖の中では、メチル-β-D-ガラクトピラノシドに最も多くのシアル酸を転移した。また、メチル-D-ガラクトピラノシドを糖受容体基質とした場合には、STase 0160 はアノマー選択性を示し、β-アノマーに対して α-アノマーの

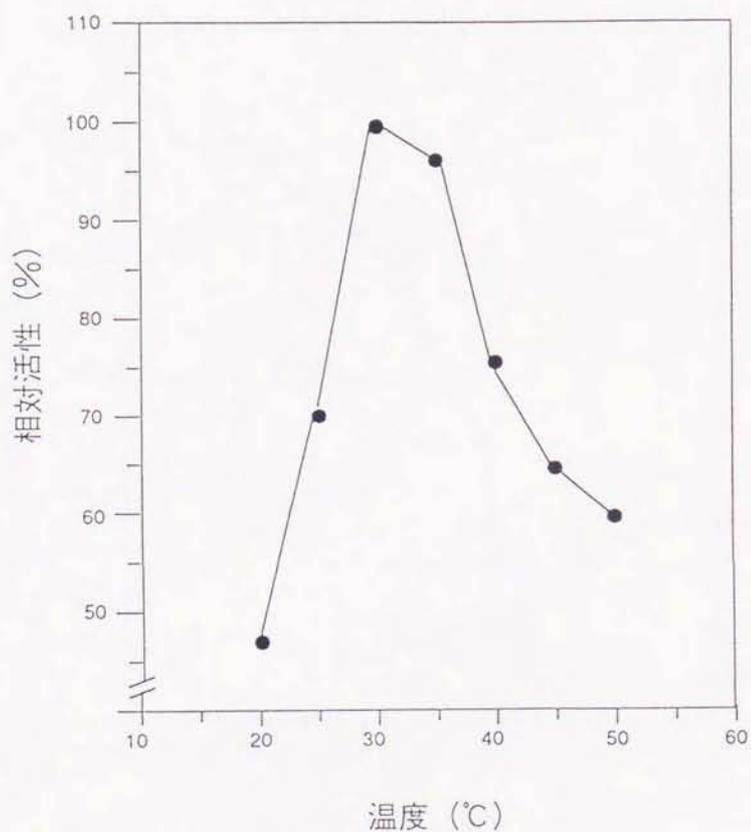


Fig. 2-4 シアル酸転移酵素の反応至適温度

20°C、25°C、30°C、35°C、40°C、45°C、50°Cにて、2.2.2.に記した方法で酵素反応を行い、各温度における酵素活性を比較した。

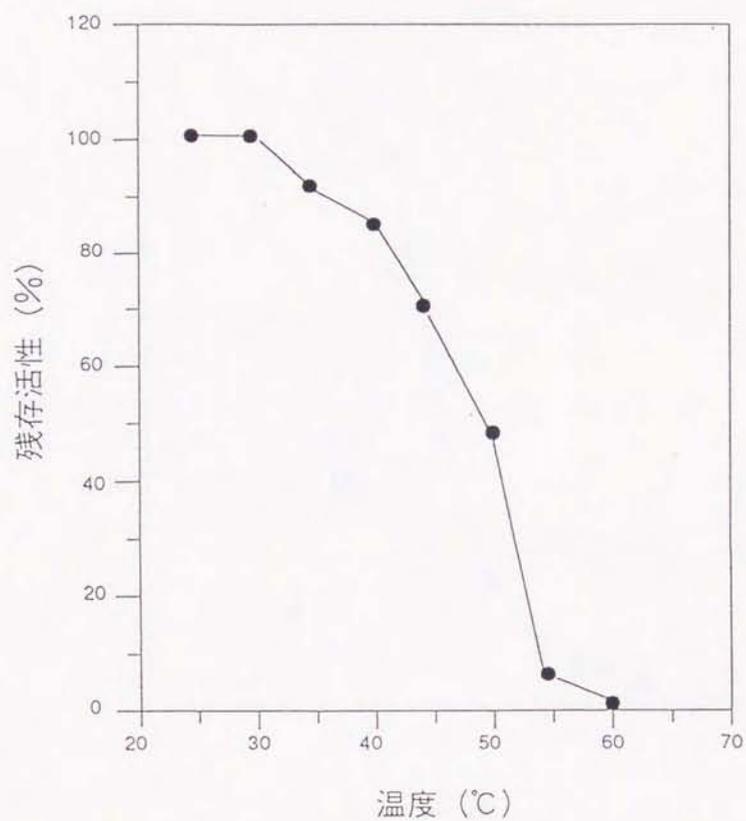


Fig. 2-5 シアル酸転移酵素の熱安定性

精製酵素溶液を25°Cから60°Cの水浴中で、5分間加熱した後、酵素活性を2.2.2の方法で測定した。なお、非加熱時の酵素活性を100%として活性を比較した。

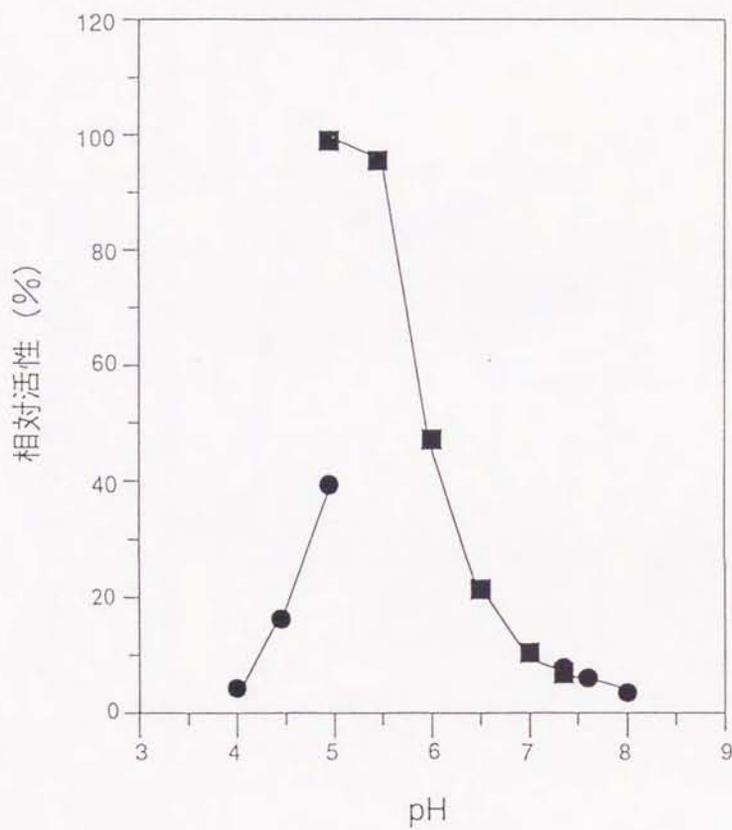


Fig. 2-6 シアル酸転移酵素のpH-活性曲線

pH4.0から5.0（酢酸緩衝液）、pH5.0から7.3（カコジル酸緩衝液）、pH7.3から8.0（リン酸緩衝液）を用いて、各pHにおける酵素活性を2.2.2.に記した方法で測定した。

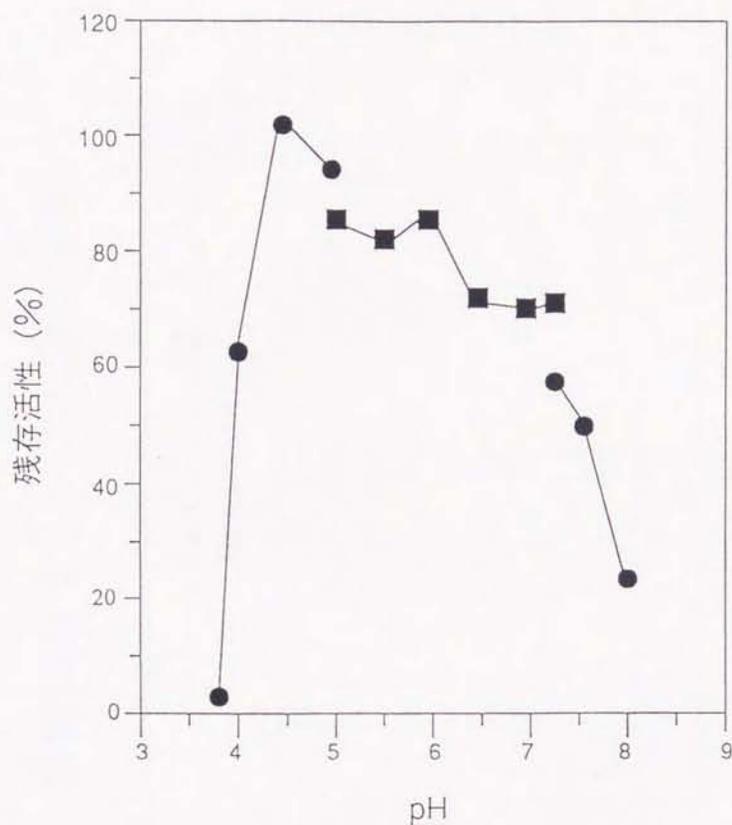


Fig. 2-7 シアル酸転移酵素のpH安定性

pH3.7から5.0 (酢酸緩衝液)、pH5.0から7.3 (カコジル酸緩衝液)、pH7.3から8.0 (リン酸緩衝液) を用いて、精製酵素溶液を調製し、30°Cで1時間放置した後に、酵素活性を2.2.2.に記した方法で測定した。なお、最大活性を示したpHでの酵素活性を100%として活性を比較した。

Table 2-3 単糖に対するシアル酸の転移

糖受容体 (単糖)	転移したシアル酸量 (pmole/min)	相対活性 (%)
メチル- α -D-ガラクトピラノシド	120	34
メチル- β -D-ガラクトピラノシド	350	100
メチル- α -D-グルコピラノシド	20	8
メチル- β -D-グルコピラノシド	38	11
メチル- α -D-マンノピラノシド	22	6
メチル- β -D-マンノピラノシド	28	8
メチル- α -D-N-アセチルガラクトサミニド	110	32
メチル- α -D-N-アセチルグルコサミニド	16	5
メチル- β -D-N-アセチルグルコサミニド	19	5

3倍近く高い基質選択性を示した (Table 2-3)。しかし、メチル-D-ガラクトピラノシド以外の単糖については、明確なアノマー選択性は見られなかった。

(4) オリゴ糖に対する糖受容体基質特異性

各種ピリジルアミノ化糖鎖を用いて、オリゴ糖に対する基質特異性を検討した。用いたピリジルアミノ化糖鎖の構造及びシアル酸転移の有無を Table 2-4 に示す。STase 0160 は、PA1 から PA5 に示した糖鎖構造を持つオリゴ糖にシアル酸を転移した。しかし、酵素反応時間を 4.5 時間から 20 時間に延ばした場合でも PA6 から PA10 に示した糖鎖構造を持つオリゴ糖にシアル酸の転移は認められなかった。これらの結果から、STase 0160 は糖鎖構造中の (1) Gal β 1-4Glc もしくは Gal β 1-4GlcNAc 構造を認識してシアル酸の転移を行っていること、(2) Gal β 1-4Glc もしくは Gal β 1-4GlcNAc 構造のガラクトース残基の 3 位に二糖までの置換がある場合、あるいは 2 位に一糖までの置換がある場合においても糖受容体基質とすることが明らかとなった。

(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

本酵素の糖供与体基質、糖受容体基質に対する反応速度定数を Table 2-5 に示す。STase 0160 の糖供与体基質である CMP-シアル酸に対する K_m 値は、320 μ M であった。この K_m 値はラット肝臓由来の酵素のそれと比較すると 20 倍高い値であった[91]。

Table 2-4 ピリジルアミノ化糖鎖の構造とシアル酸転移の有無

略称	ピリジルアミノ化糖鎖の構造#	シアル酸の転移*
PA1	Gal β 1,4 Glc-PA	+
PA2	NeuAc α 2,3 Gal β 1,4 Glc-PA	+
PA3	NeuAc α 2,8 NeuAc α 2,3 Gal β 1,4 Glc-PA	+
PA4	Fuc α 1,2 Gal β 1,4 Glc-PA	+
PA5	Gal β 1,4 GlcNAc β 1,3 Gal β 1,4 Glc-PA	+
PA6	Gal β 1,4 (Fuc α 1,3) GlcNAc β 1,3 Gal β 1,4 Glc-PA	-
PA7	Gal β 1,3 GalNAc β 1,4 (NeuAc α 2,3) Gal β 1,4 Glc-PA	-
PA8	NeuAc α 2,3 Gal β 1,3 GalNAc β 1,4 (NeuAc α 2,3) Gal β 1,4 Glc-PA	-
PA9	Gal β 1,3 (Fuc α 1,4) GlcNAc β 1,3 Gal β 1,4 Glc-PA	-
PA10	Gal β 1,3 GalNAc β 1,4 (NeuAc α 2,8 NeuAc α 2,3) Gal β 1,4 Glc-PA	-

* + ; シアル酸の転移あり, - ; シアル酸の転移なし

ピリジルアミノ化糖の構造

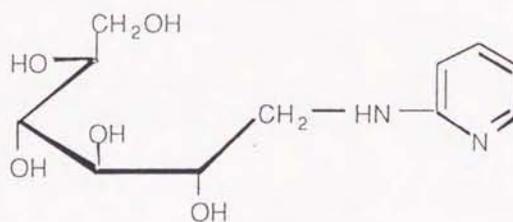


Table 2-5 糖供与体基質、糖受容体基質に対する
反応動力学的定数

基質	Km (mM)	Vmax (units/mg)	Vmax/Km
糖供与体基質			
CMP-シアル酸	0.32	7.7	24.0
糖受容体基質			
ラクトース	6.82	6.4	0.93
<i>N</i> -アセチルラクトサミニド	8.95	9.7	1.08
2'-フコシルラクトース	13.60	8.6	0.63
3'-シアリルラクトース	8.14	9.0	1.10
メチル-β-D-ガラクトピラノシド	174	6.4	0.04

また、今回用いた各種糖受容体基質に対する K_m 値は、メチル- β -D-ガラクトピラノシドに対して 174 mM であったが、ラクトース、N-アセチルラクトサミニド、2'-フコシルラクトース、3'-シアリルラクトースに対してはいずれも 10 mM 前後であり、さらにこれらの糖受容体基質に対する V_{max} 値はいずれの場合にも、ほぼ同様の値であった (Table 2-5)。

(6) 糖蛋白質・糖脂質に対する糖受容体基質特異性

糖受容体基質として N-リンク型糖蛋白質糖鎖のみを持つアシアロ α -1 酸性糖蛋白質、O-リンク型糖蛋白質糖鎖のみを持つアシアロムチン及び、N-リンク型と O-リンク型糖蛋白質糖鎖を持つアシアロフェツインを用いて酵素反応を行った結果、いずれの糖蛋白質にもシアル酸の転移が認められた (Table 2-6)。しかし、ピリジルアミノ化糖鎖を用いて糖受容体基質の検討を行った際 (Table 2-4) にシアル酸の転移が認められた糖鎖構造を有する、ラクトシルセラミド及び GM3 の糖脂質にはシアル酸の転移は認められなかった (Table 2-6)。

(7) 酵素反応生成物の同定

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て酵素反応を行い、反応生成物を精製後、その構造解析を行った。

まず、 ^{14}C でシアル酸をラベルした糖供与体基質を用いた予備実験から、CMP-シアル酸のシアル酸が全て、糖受容体基質として用いたメチル- β -D-N-アセチルラクトサミニドに転移される反応系 (方法は、2.2.13.に述べた。) を構築した。

Table 2-6 糖蛋白質、糖脂質に対するシアル酸転移活性

糖受容体基質	転移したシアル酸量 (nmol)	
	反応時間	
	5min	60min
アシアロフェツイン	3.3	11.2
アシアロ- α 1酸性糖蛋白質	3.1	10.9
アシアロムチン	0.9	3.5
ラクトシルセラミド	N.D.	N.D.
GM3	N.D.	N.D.

N.D.: 検出不能

次に 2.2.13.の方法で精製した反応生成物を FAB- M_s 、 1H -NMR 及び ^{13}C -NMR を用いて分析した。FAB- M_s の結果、分子量 689 の $(M+H)^+$ と考えられるイオンピークが、さらに $(M+Na)^+$ と考えられるイオンピークが検出された (Fig. 2-8)。この結果から、反応生成物はシアル酸とメチル- β -D-N-アセチルラクトサミニドがグリコシド結合した化合物であると考えられた。また、 1H -NMR の結果 (Fig. 2-9) は、報告されている α 2,6-シアリルメチル- β -D-N-アセチルラクトサミニドの文献値と一致した[89]。さらに、 ^{13}C -NMR のケミカルシフト値も、 α 2,6-シアリルメチル- β -D-N-アセチルラクトサミニドのそれと合致した (Table 2-7)。これらの結果から、反応生成物は α 2,6-シアリルメチル- β -D-N-アセチルラクトサミニドであることが明らかになり、STase 0160 を β -ガラクトシド α 2,6-シアル酸転移酵素と同定した。

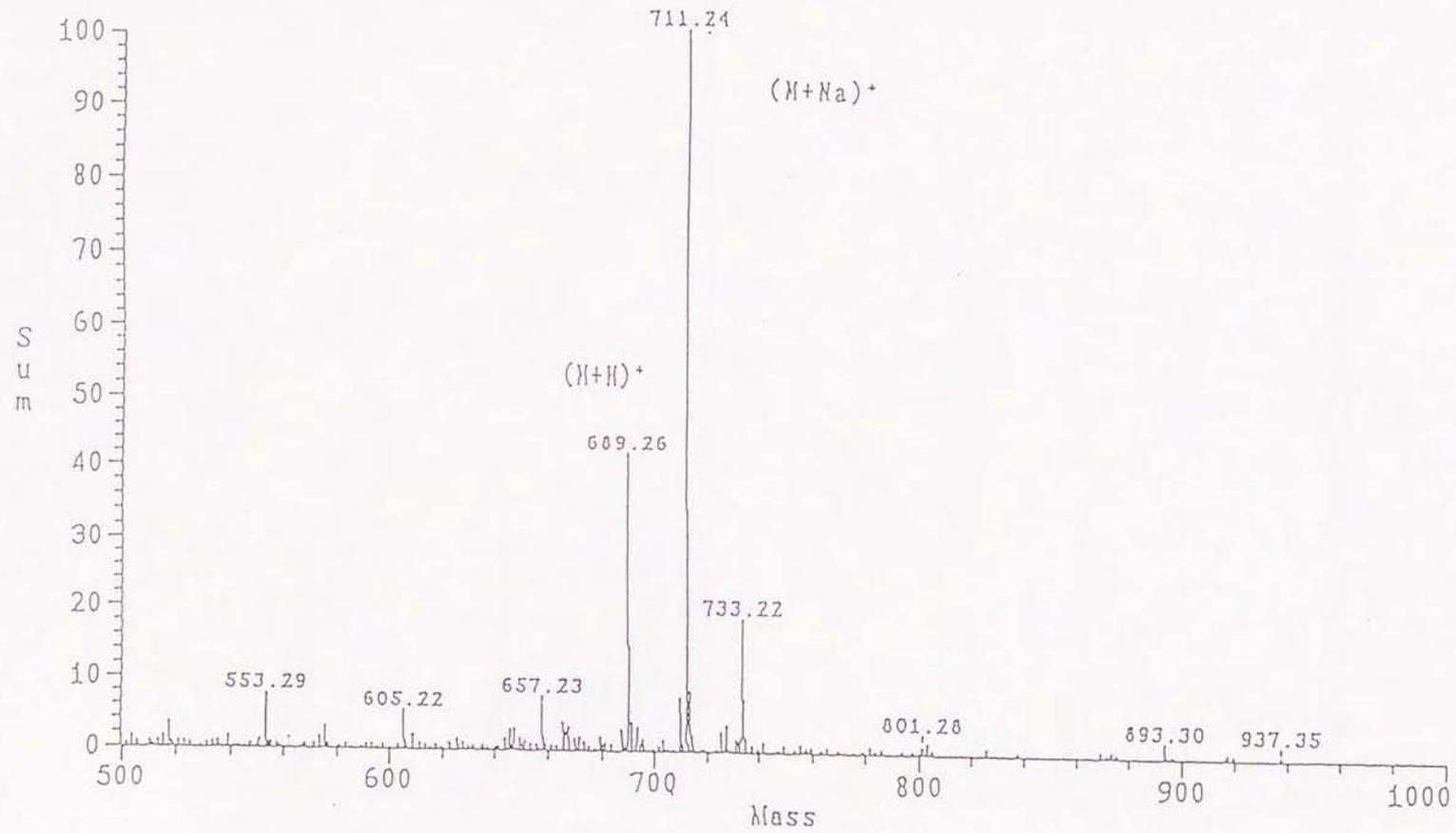


Fig. 2-8 酵素反応生成物のFAB-MSスペクトル



Fig. 2-9 酵素反応生成物の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル

Table 2-7 シアリルメチル-β-D-N-アセチルラクトサミニドと
反応生成物の¹³C-NMRのケミカルシフト値

sugar unit	carbon atom	reaction product	NeuAc α2,6-LacNAc-OMe
β-D-GlcNAc	1	102.12	102.08
	2	55.13	55.12
	3	72.84	72.83
	4	81.15	81.19
	5	74.89	74.88
	6	60.77	60.79
	N-C=O	175.06	175.30
	CH ₃	22.69	22.69
β-D-Gal	1	103.87	103.86
	2	71.13	71.12
	3	72.96	72.95
	4	68.80	68.77
	5	74.08	74.08
	6	63.74	63.72
α-D-NeuAc(2-6)	1	173.90	173.80
	2	100.57	100.54
	3	40.46	40.49
	4	68.59	68.59
	5	52.31	52.30
	6	72.96	72.95
	7	68.59	68.59
	8	72.10	72.09
	9	63.07	63.06
	N-C=O	175.35	175.61
CH ₃	22.43	22.42	

2.4. 考察

現在までに細菌由来のシアル酸関連の酵素として、大腸菌由来の α 2,8-シアル酸転移酵素[33]、CMP-シアル酸合成酵素[92]、ポリシアル酸合成酵素複合体[93] 及び *Neisseria meningitidis* と *Neisseria gonorrhoeae* の α 2,3-シアル酸転移酵素[34] の遺伝子がクローニングされている。しかし、これ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く、今回、*P. damsela* JT0160 株から精製された STase 0160 が細菌由来のシアル酸転移酵素の精製に関する初めての報告である。また、酵素反応生成物の解析結果から、本酵素が糖鎖構造中のガラクトースの 6 位にシアル酸を α 2,6 結合で転移させる事を明らかにした (Fig. 2-8, Fig. 2-9, Table 2-7)。このタイプの結合は動物由来の複合糖質糖鎖や Group B *streptococcus* の夾膜多糖中などに広く見受けられることから[68]、本酵素も細胞内でシアル酸を α 2,6 結合で結合している糖鎖の生合成に関与しているものと考えられる。現在のところ、STase 0160 の存在部位は不明であるが、*P. damsela* JT0160 株の糖鎖生合成を知る上でも、本酵素の細胞内局在性の検討が重要であると思われる。

STase 0160 の反応至適温度は 30°C であり (Fig. 2-4)、この値は動物由来のシアル酸転移酵素の反応至適温度と比較すると 7°C 低い[94]。これは、*P. damsela* JT0160 株が海洋性細菌であり、その生育至適温度が 30°C であることに起因すると考えられる。

STase 0160 を細胞より抽出する際に、界面活性材 (Triton X-100) の添加が必要であったことから (Table 2-1)、動物由来の酵素と同様に本酵素も膜結合型酵

素と推定された[95-97]。動物由来の糖転移酵素間には、その種類、起源を問わず、酵素蛋白質分子の膜結合部位の様式及び、その構造、また酵素蛋白質分子の一次構造上における触媒部位の位置等、非常に多くの類似性が認められる[58]。本酵素とこれまでに知られている糖転移酵素の分子レベルでの比較・検討を行うことにより、糖転移酵素分子群の進化に関する知見が得られる可能性があり、本酵素の分子レベルでの解析に興味を持たれる。また、本酵素の N 末端アミノ酸配列を決定したが、その N 末端のアミノ酸残基は解析不能であったことから、この残基が修飾を受けているか、もしくはシステイン残基である可能性が考えられた。この点を明らかにするためにも、本酵素をコードする遺伝子のクローニングが重要である（第 4 章参照）。

本酵素の反応速度論的な解析結果から、糖供与体基質である CMP-シアル酸に対する K_m 値は $320 \mu\text{M}$ であった (Table 2-5)。この値は動物由来の酵素、例えば、ラット肝臓由来の β -ガラクトシド $\alpha 2,6$ -シアル酸転移酵素の $16 \mu\text{M}$ と比較すると 20 倍であり[91]、STase 0160 の CMP-シアル酸に対する親和性はラット肝臓由来のシアル酸転移酵素と比較して低いことが明らかとなった。しかしながら、STase 0160 が糖供与体基質としてこれまでに知られている動物由来のシアル酸転移酵素と同じ CMP-シアル酸を用いていることから (Table 2-5)、STase 0160 の活性中心付近に存在する糖供与体基質結合部位と動物由来のシアル酸転移酵素の糖供与体基質結合部位の間には相同性があるものと推定される。さらに本酵素の糖受容体基質特異性は、ラット肝臓由来の β -ガラクトシド $\alpha 2,6$ -シアル酸

転移酵素のそれと以下の点で類似性が認められた[91]。すなわち、STase 0160 は糖受容体基質として用いた単糖の中で、メチル-β-D-ガラクトピラノシドに対して最も多くのシアル酸を転移した (Table 2-3)。また、メチル-D-ガラクトピラノシドを糖受容体基質とした場合には、アノマー選択性が見られた。すなわち、STase 0160 はメチル-β-D-ガラクトピラノシドに、メチル-α-D-ガラクトピラノシドに転移されたシアル酸量の約 3 倍のシアル酸を転移した。この結果から、STase 0160 はシアル酸を転移するガラクトース残基ばかりではなく、その結合様式も認識してシアル酸の転移を行っていると考えられる。

さらに、ラクトース、*N*-アセチルラクトサミニドなどの二糖に対する STase 0160 の K_m 値はそれぞれ、6.82 mM、8.95 mM とメチル-β-D-ガラクトピラノシドの K_m 値 (174 mM) よりも一桁低い値であり、STase 0160 は単糖よりも二糖に対して高い親和性を示した (Table 2-5)。また、ピリジルアミノ化糖鎖を用いた糖受容体基質特異性の解析結果から、非還元末端に Galβ1-4Glc もしくは Galβ1-4GlcNAc 構造を有する糖鎖にはシアル酸の転移が認められたものの、Galβ1-3GlcNAc、Galβ1-3GalNAc 構造などの構造を有する糖鎖にはシアル酸の転移が認められなかったことから (Table 2-4)、本酵素が糖鎖の非還元末端に存在するガラクトースばかりではなく、ガラクトースが結合している還元末端側の糖とその結合様式を認識してシアル酸の転移を行っていることが明らかとなった。現在までに知られているシアル酸転移酵素も糖受容体基質に対する反応速度論的な解析や糖受容体基質特異性の解析などから、非還元末端に存在する

糖ばかりではなく、糖鎖構造をも認識してシアル酸を転移していることが知られていることから[91]、本酵素も一般的なガラクトース認識機構を有している可能性がある。

しかしながら、STase 0160 の糖受容体基質の認識はラット肝臓由来の酵素のそれと比較した場合、あまり厳密ではないと考えられる。ラット肝臓由来のシアル酸転移酵素の *N*-アセチルラクトサミニドに対する K_m 値は 1.62 mM であるのに対し、ラクトースに対する K_m 値は 129 mM と報告されており[95]、ラット肝臓由来のシアル酸転移酵素が非常に厳密な糖受容体基質特異性を有していることが明らかにされている。一方、STase 0160 のラクトース、*N*-アセチルラクトサミニド、2'-フコシルラクトース、3'-シアリルラクトースに対する K_m 値はほぼ同じ値であった (Table 2-5)。この結果から、STase 0160 が (1) *N*-アセチルラクトサミニドの 2-アセトアミド基を認識していない、(2) 糖鎖の非還元末端に存在するガラクトースの 2 位、3 位に置換がある場合でも糖受容体基質とするなどの性質を持つことを明らかにした。

現在シアル酸を含む糖鎖を合成する場合、シアル酸は通常、糖鎖の非還元末端に存在することから、化学合成法を用いてシアル酸以外の糖鎖部分を合成し、最後にシアル酸転移酵素を用いてシアル酸を糖鎖に結合させる方法が考えられている。しかし、シアル酸転移酵素の糖受容体基質特異性が、シアル酸を含む糖鎖の合成法として幅広く応用される上で大きな障害となっていた。動物由来の酵素は非常に厳密な糖受容体基質特異性を有するため、この方法で合成する糖鎖の種類は限られてくる。しかし、STase 0160 は動物由来の酵素と比較して

広い糖受容体基質特異性を持つことから、本酵素を用いることにより、これまでのシアル酸転移酵素ではその合成が困難であったシアリルオリゴ糖の合成が可能になるものと考えられる。

糖蛋白質を糖受容体基質とした場合の酵素反応の解析結果から、STase 0160が糖蛋白質中に存在する *N*-リンク型及び *O*-リンク型糖蛋白質糖鎖、いずれの糖鎖にもシアル酸を転移することが明らかになった (Table 2-6)。この結果は、本酵素を用いることにより *N*-リンク型及び *O*-リンク型糖蛋白質糖鎖を持つ糖蛋白質の修飾が可能であること、すなわちシアル酸が結合していない糖蛋白質にシアル酸を転移させてその機能を改変できる可能性を示している。現在までに、3種類の *N*-アセチルガラクトサミニド α 2,6-シアル酸転移酵素の遺伝子がクローニングされている[49-51]ものの、いずれも大量発現には成功していない。GalNAc α 2,6-Ser/Thr 構造を基本骨格とするムチン型糖鎖 (*O*-リンク型糖蛋白質糖鎖) の機能は未だ十分に解明されておらず[98]、これらの機能解析のためにも糖蛋白質及びそのアナログを調製することは非常に重要であり、*O*-リンク型糖蛋白質糖鎖の機能解明にも本酵素は有用であると思われる。しかし、ピリジルアミノ化糖鎖を用いた場合にシアル酸の転移が認められた糖鎖構造を有する糖脂質のラクトシルセラミドや GM3 には、今回の反応条件ではシアル酸の転移は認められなかった (Table 2-6)。STase 0160 を用いた糖脂質へのシアル酸の転移条件を構築することができれば、非常に多くの生理活性が明らかにされているシアル酸含有糖脂質を合成可能となり、本酵素の応用範囲がさらに広がると期待

される。このことから、今後糖脂質を糖受容体基質とした場合の反応条件について、詳細な検討を行う必要がある。

今回用いた培養条件では、培養液 1liter あたり約 20 U の酵素が生産されたが (Fig. 2-1)、酵素生産量は産業上の利用を考えた場合には十分なものではない。また、菌体からの抽出効率が約 10% と低く (Table 2-1)、今後、大量培養後の酵素抽出法に関するさらなる検討が必要である。酵素の精製については、イオン交換、アフィニティークロマトグラフィー等を組合わせた比較的簡便な精製方法を用いて、抽出液から精製倍率 687 倍、収率 19% と良好な結果を得ることができた。酵素生産のための培養条件の検討及び効率的な酵素の抽出条件の検討を行うことにより、本酵素を大量に供給することが可能になるものと期待されたので、次章において詳細な検討を試みた (第 3 章参照)。