

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

1980年代後半までは、シアル酸転移酵素の共通の糖供与体基質である CMP-シアル酸の大量供給がコスト上困難であり、シアル酸転移酵素を用いた糖鎖合成を大規模に行うことは難かしいと指摘されていた。しかしこの問題については、1991年に、Ichikawa、Wong 等により報告されたマルチエンザイムの系を用いて CMP-シアル酸をリサイクルさせるという、極めて画期的な方法によって解決されたと考えられている[99, 100]。この方法では CMP-シアル酸供給のコスト面での改善を行ったばかりでなく、シアル酸転移酵素の阻害剤となる CMP（生成物）が反応系内に蓄積されないために反応が阻害されず、高い収率で反応生成物が得られ、さらに水溶液中での CMP-シアル酸の不安定性も回避できる[99, 100]。このような方法を導入することにより、シアル酸転移酵素の反応を大規模レベルで用いることが現実的に可能なものとなってきている。

1997年には、*Neisseria meningitidis* の生産する α 2,3-シアル酸転移酵素の高発現系が構築され[101]、この酵素の大量供給が現実のものとなりつつある。一方、 α 2,6-シアル酸転移酵素の高発現系は未だ構築されておらず、同酵素の大量生産系の構築が望まれている。第2章で示したとおり、STase 0160 を粗酵素液から高収率で精製することに成功し、またこの精製酵素がユニークな糖受容体基質特

異性を有することから、STase 0160 の大量生産系を構築することができれば、精製した α 2,6-シアル酸転移酵素の大量供給が、さらには動物由来の α 2,6-シアル酸転移酵素では合成が困難であったシアリルオリゴ糖の大量生産が可能になると期待される。

細菌由来の酵素は、その生産菌の培養条件・培地組成を最適化することにより、酵素生産性を大幅に増加させることが可能である。第 2 章では、マリンプロス 2216 培地を用いて *P. dansela* JT0160 株の培養を行い、培養液 1 liter あたり約 20 U の STase 0160 が生産されていることを明らかにした。しかし、本酵素の産業的な利用を考えた場合、その大量供給が必須であることから、酵素生産性を向上させる必要がある。これらの諸問題について、本章では、(1) STase 0160 を大量に生産するための培地組成と培養条件について、(2) 簡便なシアリルオリゴ糖の合成等について検討したので報告する。

3.2. 実験材料及び方法

3.2.1. 材料

培地組成の検討に用いた培地素材は、全て市販品を用いた。また、酵素合成に用いた糖受容体基質は、全て市販の特級試薬を用いた。

3.2.2. 培養及び培地中の糖、酢酸の測定

P. damsela JT0160 株のグリセロール保存液 (0.5 ml) を 100 ml のマリネブロス 2216 培地 (ディフコ社、デトロイト、米国) を含む 500-ml 容の三角フラスコに添加し、30℃、8 時間、150rpm で振とう培養した。この種培養液を 1 liter の培地を含む 3-l 容三角フラスコ、または 3 liter の培地を含む 5-l 容ジャーファメンターに培地の 1% (V/V) 量を添加して本培養を行った。特に記さない限り、培養温度は 30℃で、培養時間は 8 時間とした。フラスコ培養の場合は 150 rpm で振とう培養した。ジャーファメンター培養の場合、通気攪拌条件は、フラスコ培養時の酸素移動容量係数となるように設定 (600 rpm、0.5 vvm) した。また、培養時の菌体濃度は 660 nm の吸光度を測定し、これを指標とした。

培地中の糖と酢酸は、培養中の培養液を少量サンプリングして、これを 15,000 rpm、10 分間遠心分離し、その上清を陽イオン交換カラムを用いて HPLC で定量した。カラムにはウルترون PS-80H (4.4 x 250 mm、新和化工社、東京、日本)、移動相には 3 mM の過塩素酸水溶液を使用した。カラム温度は 50℃、流速 1ml/min で溶出時間は 20 分とした。糖及び酢酸の検出は示差屈折計で行い、糖及び酢酸量はそれぞれのピーク面積から算出した。

3.2.3. 酵素活性測定法

酵素活性の測定は、2.2.2.に記した方法を用いて測定した。活性は、1分間に1 μmol のシアル酸をラクトース（関東化学、東京）に転移させる酵素量を1単位（U）とした。

3.2.4. 菌体破碎液、粗酵素液の調製及び酵素の精製

菌体破碎及び粗酵素液の調製は基本的に2.2.6. (1)に記載した方法を用いて行った。ただし、粗酵素液の調製は、菌体破碎液を4°Cで8時間攪拌した後に行った。また、酵素の精製は基本的には2.2.6.に記載した方法で行った。

3.2.5. シアリダーゼ活性の測定

粗酵素液のシアリダーゼ活性はコロミン酸（ナカライテスク社、東京、日本）、及び6'-シアリルラクトース（オックスフォードグライコシステムズ社、ロンドン、英国）をそれぞれ基質としてInagakiらの方法で測定した[102]。シアリダーゼによりコロミン酸、または6'-シアリルラクトースから切断されたシアル酸はチオバルピツール法を用いて測定した[103]。

3.2.6. 粗酵素液を用いたシアリルオリゴ糖の合成

N-アセチルガラクトサミン（ナカライテスク社、東京、日本）、メチル- β -D-ガラクトピラノシド（シグマ社、セントルイス、米国）及びラクトース（関東化学、東京、日本）を糖受容体基質として酵素合成を行った。酵素反応溶液（0.5

ml) は、それぞれの糖受容体基質 (30 μmol)、糖供与体基質 CMP-シアル酸 (16 μmol 、9.6 mg)、粗酵素 (0.1 U) 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 時間行った。反応終了後、反応溶液に蒸留水を 10 ml 添加して希釈した。この溶液を、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 (1.5 x 9 cm) に供した。このカラムを 50 ml の蒸留水で洗浄後、5 mM リン酸緩衝液 (pH 6.8) で反応生成物を溶出させて分画した (流速 1ml/min)。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後、5 ml の溶媒 A (酢酸エチル:メタノール:水 = 3:2:1) に溶解し、シリカゲルカラム (1.5 x 6.8 cm) に供した。生成物は溶媒 A で溶出した (流速 1ml/min)。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後、精製した反応生成物を $^1\text{H-NMR}$ で分析した。

3.3. 結果

3.3.1. 菌体量と酵素生産量の関係

第2章で示したように (Fig. 2-1)、マリンプロス 2216 培地によるフラスコ培養では *P. damsela* JT0160 株の増殖は培養開始後 6~7 時間後に最高濃度に達し、その時点での 660 nm の吸光度は 1.5~1.8 であった。また、STase 0160 の生産は増殖連動型であり (Fig. 2-1)、最大菌体濃度に達した時点でのシアル酸転移活性は培養液 1 liter あたり約 20 U であった。

STase 0160 の生産が、培地の種類に関わらず増殖連動型であることを確かめる目的で、ニュートリエントブロス培地 (オキシイド社、シェフィールド、英国) を用いてフラスコ培養を行い、経時的に菌体量と酵素活性を測定した。なお、この培地には、塩濃度を海水と同等にするために 1.5% の塩化ナトリウムを添加した。マリンプロス 2216 培地とニュートリエントブロス培地を用いた培養時の菌体濃度と酵素活性の関係を Fig. 3-1 に示す。酵素活性は両培地において菌体濃度に比例し、培地の種類に関わらず菌体濃度 1 OD_{660 nm} あたり約 10 U/L の酵素生産が認められた。この結果は、単位培養液あたりの菌体量を増加させることが、シアル酸転移酵素の生産性を上昇させることを示している。また、ニュートリエントブロス培地での菌体濃度はマリンプロス 2216 培地でのそれより高いことから、ニュートリエントブロス培地に含まれる肉エキスに *P. damsela* JT0160 株の増殖効果があるものと考えられた。

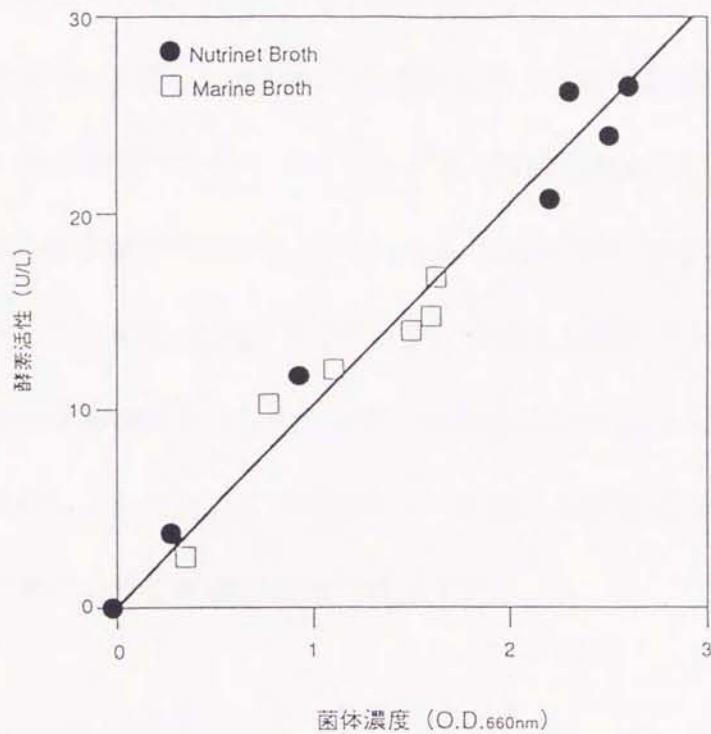


Fig. 3-1 *P. damsela* JT0160株の菌体量と酵素活性の関係

マリネブロス2216培地及びニュートリエントブロス培地を用いて *P. damsela* JT0160株を培養した際の、菌体量とシアル酸転移活性の関係を示す。菌体量は660 nmの吸光度 (OD) で測定した。酵素活性は、3.2.3.に示した方法で測定し、培養液1 liter当たりの酵素活性を示している。

3.3.2. 至適培養条件の検討

(1) 増殖至適温度

1.5% (W/V) の塩化ナトリウムを含むニュートリエントブロス培地を L 字型試験管に 9 ml 分注し、15~40°C の範囲で約 1°C 毎に温度変化を与えた。それぞれの L 字型試験管に、前培養液を 0.04% (V/V) 接種して振とう培養した。培養 6 時間後に菌体濃度を測定して *P.damsela* JT0160 株の増殖における培養温度の影響を検討した。結果を Fig. 3-2 に示す。培養 6 時間においては 29~32°C の温度範囲で高い菌体濃度を示した。また、本菌株は 37°C 以上の温度では 24 時間後でも全く増殖しなかった。この結果から、本菌株の増殖至適温度を 30°C と判断し、以降の実験における培養温度は 30°C とした。

(2) 増殖至適 pH

(1) の場合と同じ培地成分で pH を変化させた培地を調製し、前培養液を 0.04% (V/V) 接種して 30°C で振とう培養した。培養 6 時間後に菌体濃度を測定して本菌株の増殖における培養 pH の影響を検討した。結果を Fig. 3-3 に示す。*P.damsela* JT0160 株は pH 5.0 から 9 以上の広い pH 範囲で増殖が可能であったが、pH 4.5 以下では全く増殖しなかった。*P.damsela* JT0160 株の培地の至適 pH は 8.0 であった。

3.3.3. 培地成分の検討

(1) 窒素源の効果

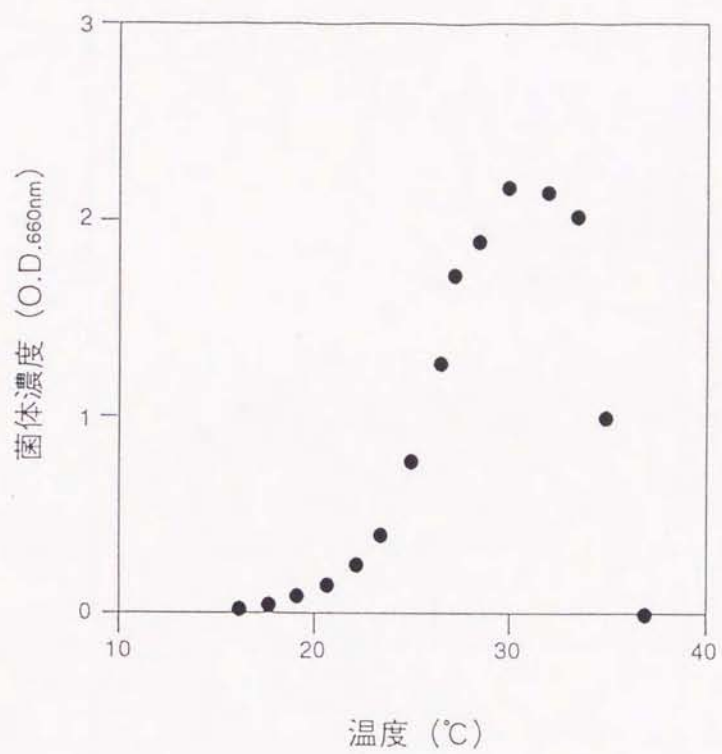


Fig. 3-2 培養温度と菌体増殖量との関係

ニュートリエントブロス培地を用い、培養温度を変化させて *P. damselae* JT0160株を培養した際の、菌体増殖量との関係を示す。菌体量は660 nm の吸光度 (OD) で測定した。

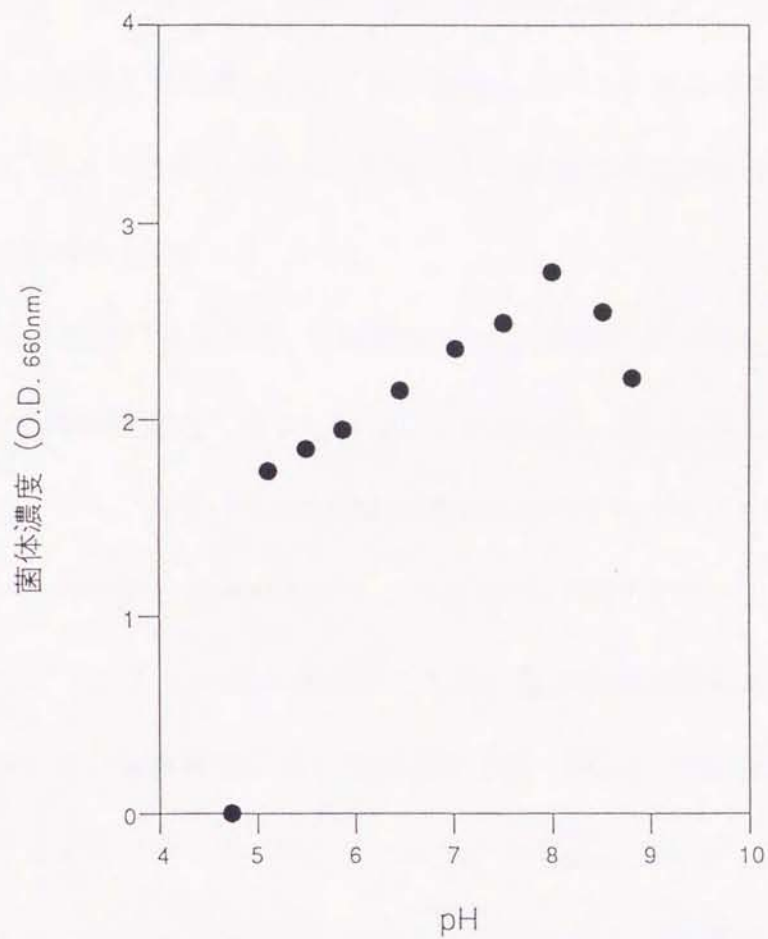


Fig. 3-3 培地のpHと菌体増殖量との関係

ニュートリエントブロス培地を用い、培地のpHを変化させて *P.damsela* JT0160株を培養した際の、菌体増殖量の関係を示す。菌体量は660 nmの吸光度 (OD) で測定した。

各種のペプトンを用いて *P. damsela* JT0160 株の増殖に対する効果を検討した。培地は、0.5% (W/V) の各種ペプトン、0.1% (W/V) のバクト酵母エキス（ディフコ社、デトロイト、米国）及び人工海水（pH 8.0）からなり、これらを用いて 3.2.2.の方法で培養した。なお、培地へのバクト酵母エキスの添加は、マリンプロス 2216 培地に 0.1% (W/V) のバクト酵母エキスが含まれることからペプトンとの比較を行うために加えた。

結果を Table 3-1 に示す。各数値はマリンプロス 2216 培地での最大菌体濃度を 1 とした菌体濃度比で示している。この比率は、前述の通り酵素生産量に比例している。マリンプロス 2216 培地に含まれるペプトンはカゼインペプトンとプロテオースペプトンの混合ペプトンであるが、今回用いたいずれのペプトンの場合でもマリンプロス 2216 培地よりも高い菌体濃度を示した。これらペプトンの中で最も高い菌体濃度が得られたのはポリペプトン Y（日本製薬社、東京、日本）とカザミノ酸（ディフコ社、デトロイト、米国）であり、これら 2 種類のペプトンを用いた培養では、コントロールの約 2.5 倍の菌体濃度を示した。この 2 種類のペプトンは、蛋白質がアミノ酸単位にまで分解されていること、ビタミンなどの生育因子を多く含むことから高い菌体増殖を示したものと考えられる。

(2) 肉エキスの効果

0.5% (W/V) のカザミノ酸またはポリペプトン Y、0.3% (W/V) の肉エキス（ディフコ社、デトロイト、米国）、0.1% (W/V) のバクト酵母エキスを含む人工

Table 3-1 *P. damsela* JT0160株の生育に対する各種ペプトン
及び肉エキスの影響

添加した培地素材	最大菌体濃度比
Marine broth 2216 (control)	1.00
Polypeptone Y	2.16
Proteose peptone	1.15
Soytone	1.23
Casamino acids	2.55
Tryptone	1.60
Polypeptone Y + Beef extract	3.55
Casamino acids + Beef extract	3.51

基本培地は0.1% (W/V) バクト酵母エキスを含む人工海水からなり、それぞれの培地素材を添加した場合の、*P. damsela* JT0160株の増殖に対する影響を示す。最大菌体濃度比はマリンプロス2216での菌体濃度を1とした場合の、相対値で示した。なお、各種のペプトンは0.5% (W/V) で、肉エキスは0.3% (W/V) 濃度になるように添加した。マリンプロス2216、プロテオースペプトン、ソイトーン、カザミノ酸、トリプトン、肉エキスは、ディフコ社から、ポリペプトンYは日本製薬社から購入した。

海水からなる培地を調製し、*P.damsela* JT0160 株の培養を行った。3.3.3. (1) で高い最大菌体濃度を示したカザミノ酸およびポリペプトン Y にさらに肉エキスを添加した結果、最大菌体濃度比はマリンプロス 2216 培地の約 3.5 倍となった (Table 3-1)。肉エキスを添加した際の最大菌体濃度比はカザミノ酸、ポリペプトン Y で同程度であったが、カザミノ酸には大量の塩が含まれ、培養液に多くの沈殿を生成させたことから、以後の実験では後の精製操作が容易と考えられたポリペプトン Y を用いることとした。

(3) 酵母エキスの効果

0.5% (W/V) のポリペプトン Y、0.3% (W/V) の肉エキス、0.1% (W/V) の 4 種類の酵母エキス { (バクト酵母エキス、ディフコ社)、(ドライド酵母エキス S、日本製薬)、(粉末酵母エキス、極東)、(酵母エキス、オリエンタル酵母) } を含む人工海水からなる培地を調製し、*P.damsela* JT0160 株の培養を行った。その結果、今回用いた 4 種類のいずれの酵母エキスの添加においても、同程度の比増殖速度の向上が見られた (データは示さない。)。このことから、以後の培地にはバクト酵母エキスを添加することとした。

(4) 炭素源の効果

P.damsela JT0160 株の菌学的性質を検討した際に資化性を示した単糖 (Table 1-3) を中心に、それらを培地に添加した際の増殖に対する効果を検討した。

結果を Fig. 3-4 に示す。最も高い最大菌体濃度を与えた糖は D-ガラクトース

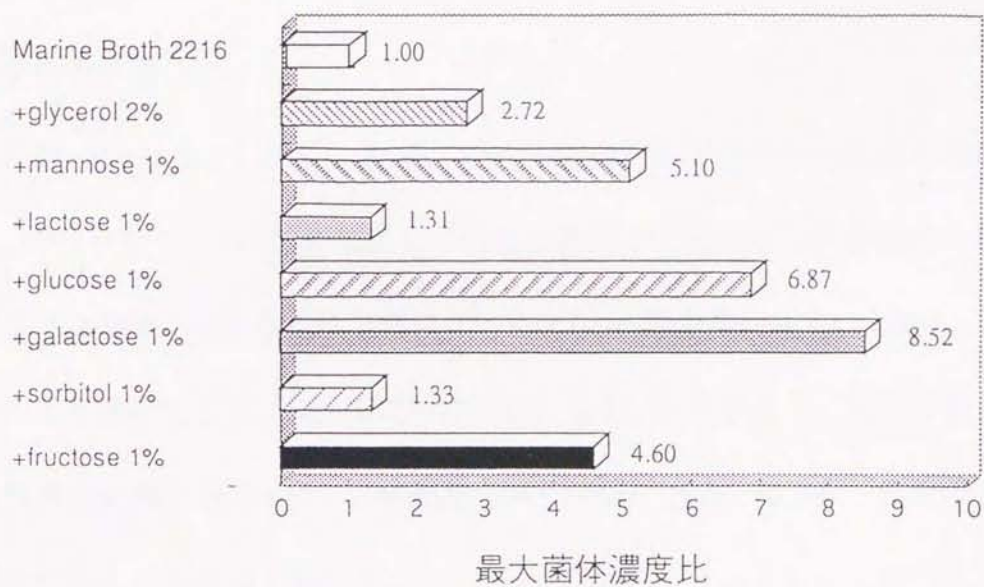


Fig. 3-4 菌体増殖に対する各種糖類の効果

各種の糖類をマリンブロス2216培地に添加し、その菌体増殖に対する効果を示す。菌体量は660 nm の吸光度 (OD) で測定した。

であり、マリンプロス 2216 培地の 8.5 倍の最大菌体濃度が得られた。

3.3.4. 最適培地組成の検討

3.3.3. で得られた結果から人工海水をベースに、ポリペプトン Y、バクト酵母エキス、肉エキス、D-ガラクトースをそれぞれ 0.5%、0.1%、0.3%、1%含む培地を基本培地組成 (PYBG 培地) とした。これらの培地の添加比率を変化させ酵素生産性を検討した。

結果を、Table 3-2 に示す。まず、PYBG 培地の D-ガラクトース量を検討した結果、D-ガラクトース 1%まではその濃度に比例して活性の上昇が認められ、1%処理区で培養液 1 liter あたり 200 U の STase 0160 が生産された。しかし、2%ではその生産量は培養液 1 liter あたり 280 U となり、D-ガラクトースの添加量に対する酵素生産量が低下した。この結果から、PYBG 培地では 1%の D-ガラクトース濃度が適していると判断した。

次に、PYBG 培地の濃度を増加させて培養を行った。その結果、3xPYBG 培地まで、STase 0160 生産量は培地濃度に比例して増加した。

3.3.5. ジャーファメンター培養及び STase 0160 の精製

スケールアップした際の *P.damsela* JT0160 株の増殖、酵素生産性についての検討を行うため、5-l 容ジャーファメンターを用いて培養を行った。培地には、3xPYBG 培地を用いた。通気攪拌条件はフラスコ培養時の酸素移動容量係数となるように設定した。また、培養時の培養液の pH は 4 M の水酸化ナトリウムを用

Table 3-2 各種培地におけるシアル酸転移酵素の生産量

培地名	濃度 (%)			Galactose	Beef extract	O.D. 660nm)	酵素活性 (U/L)	菌体濃度あたりの酵素活性
	Polypeptone Y	Yeast extract	Galactose					
1xPYB1/2G	0.5	0.1	0.5	0.3	10.5	110	10.5	10.5
1xPYBG	0.5	0.1	1.0	0.3	22.0	200	200	9.1
1xPYB2G	0.5	0.1	2.0	0.3	27.0	280	280	10.4
2xPYBG	1.0	0.2	2.0	0.6	43.0	400	400	9.3
3xPYBG	1.5	0.3	3.0	0.9	55.5	550	550	9.9

いて制御した。

培養結果を Fig. 3-5 に示した。今回行ったジャーファメンター培養で、フラスコ培養での菌数と酵素生産量を再現することができた。8 時間の培養で OD_{660nm} は 55、酵素生産量は培養液 1 liter あたり 550 U であった。また、倍加時間は約 30 分であった。炭素源として加えた D-ガラクトースは、菌体濃度の上昇に従って資化された。代謝産物として低濃度ではあるが培地中に酢酸が蓄積した。

次に、得られた培養液 (2 liter) から菌体を集め、3.2.4.の方法で粗酵素液の調製を行った結果、約 70%の効率で菌体破砕液から酵素が抽出された (Table 3-3)。また、STase 0160 の精製を行った結果、収率 18%で電気泳動的に単一なバンドとして 200 U の STase 0160 が得られた (Fig. 3-6)。

3.3.6. 粗酵素液を用いたシアリルオリゴ糖の合成

粗酵素液中のシアリダーゼ活性を測定したが、その活性は認められなかった (データは示さない。)。そこで粗酵素液を酵素源として、ラクトース、*N*-アセチルガラクトサミン及びメチル- β -D-ガラクトピラノシドを糖受容体基質として酵素合成を行い、反応生成物を精製・単離して反応生成物の構造を $^1\text{H-NMR}$ で解析 (重水中、298K) した。反応のスキームを Fig. 3-7 に示す。

ラクトースを糖受容体基質とした場合、6.4 mg の $\text{NeuAc}\alpha 2,6\text{-Gal}\beta 1\text{-4Glc}$ (10.2 μmol 、収率 63.6%) が得られた。反応生成物の $^1\text{H-NMR}$ は報告されている $\text{NeuAc}\alpha 2,6\text{-Gal}\beta 1\text{-4Glc}$ のケミカルシフト値と良く一致していた[104]。反応生成物の構造上、特徴的な $^1\text{H-NMR}$ のシグナルを以下に示す。: δ 5.21 (d, 0.4 H,

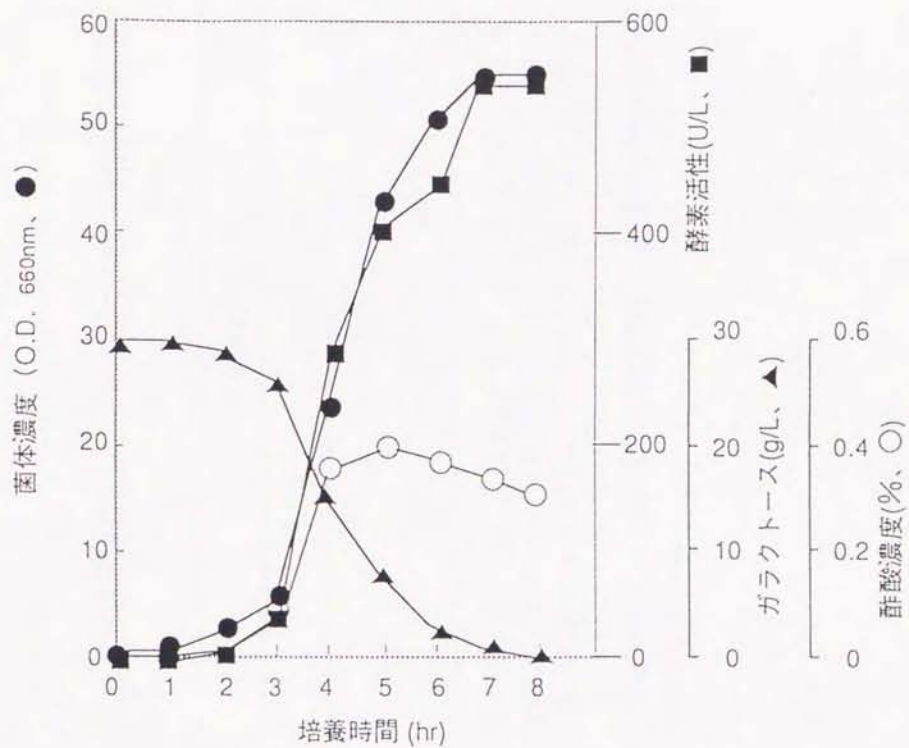


Fig.3-5 3xPYBG培地による培養結果

3xPYBG培地を用いたジャーファメンター培養の結果を示す。菌体量は660 nmの吸光度 (OD) で測定した。酵素活性及び培養液中のガラクトース、酢酸は3.2.2.及び3.2.3.に示した方法で測定した。

Table 3-3 菌体からの酵素抽出における抽出時間の影響

	シアル酸転移活性 (U/L)	
	(A)	(B)
菌体破砕液	550	550
粗酵素液	50	400

菌体破砕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。

(A)、(B) の粗酵素液の調製は、それぞれ2.2.6.及び3.2.4.に示した方法で行った。

(A) : 菌体破砕液を調製後、直ちに粗酵素液を調製した場合の菌体破砕液と粗酵素液の酵素活性、

(B) : 菌体破砕液を調製後、8 時間攪拌した後に粗酵素液を調製した場合の菌体破砕液と粗酵素液の酵素活性を示している。

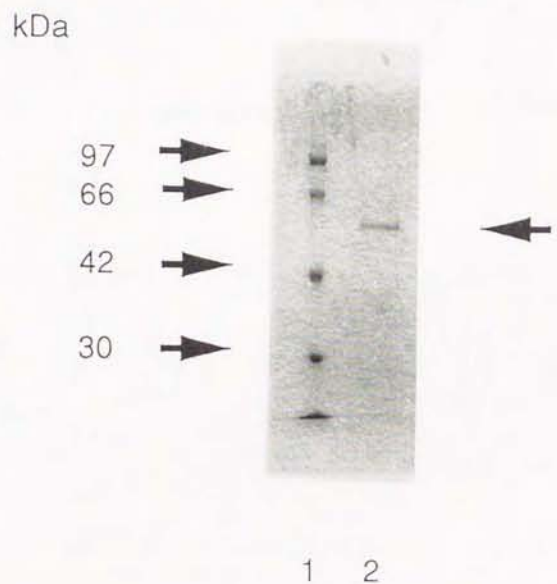


Fig. 3-6 精製酵素標品のSDS-PAGE

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、クマジブリリアントブルーR250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

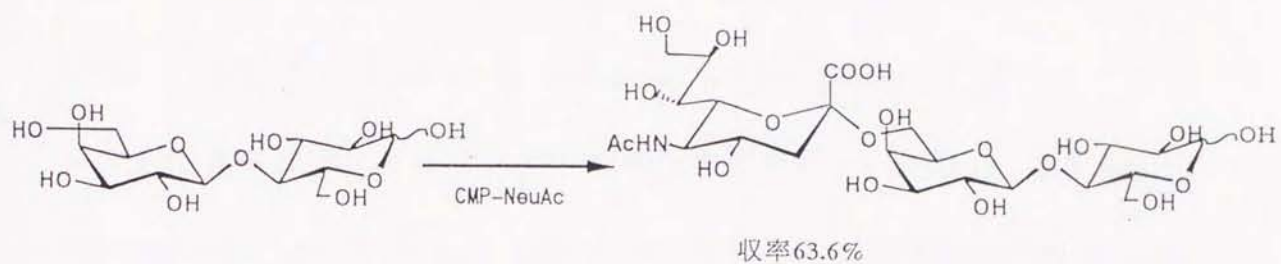
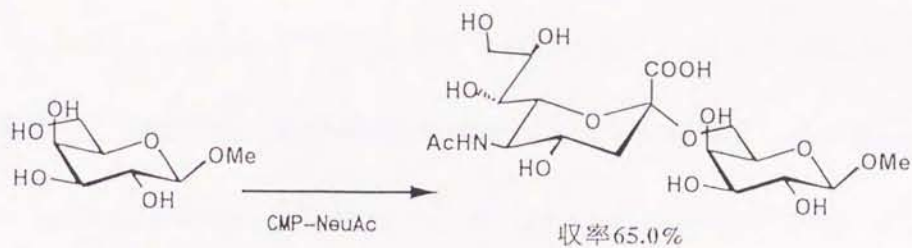
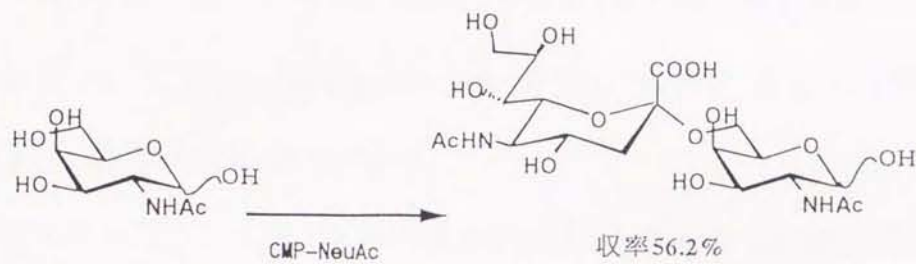


Fig. 3-7 酵素反応スキーム

単糖、二糖を糖受容体基質とした酵素反応のスキームと、
反応生成物の単離収率を示す。

$J=3.5$ Hz, Glc α H-1), δ 4.66 (d, 0.6 H, $J=8.0$ Hz, Glc β H-1), δ 4.42 (d, 1 H, $J=7.8$ Hz, Gal H-1), δ 3.30 (dd, 0.6 H, $J=8.4$ Hz, 8.4 Hz, Glc β H-2), δ 2.70 (dd, 1 H, $J=4.5$ Hz, 12.35 Hz, NeuAc H-3 eq), δ 2.02 (s, 3 H, Ac), δ 1.73 (dd, 1 H, $J=12.3$ Hz, 12.3 Hz, NeuAc H-3 ax).

N-アセチルガラクトサミンを糖受容体基質とした場合、4.6 mg の NeuAc α 2,6-GalNAc (9.0 μ mol、収率 56.2%) が得られた。反応生成物の $^1\text{H-NMR}$ は報告されている NeuAc α 2,6-GalNAc のケミカルシフト値と良く一致していた[105]。反応生成物の構造上、特徴的な $^1\text{H-NMR}$ のシグナルを以下に示す。: δ 5.22 (d, 0.5 H, $J=3.7$ Hz, GalNAc α H-1), δ 4.63 (d, 0.5 H, $J=8.4$ Hz, GalNAc β H-1), δ 2.74 (dd, 0.5 H, $J=4.6$ Hz, 12.5 Hz, NeuAc H-3 eq), δ 2.73 (dd, 0.5 H, $J=4.6$ Hz, 12.4 Hz, NeuAc H-3 eq), δ 2.05, 2.04 (each 3 H, Ac), δ 1.71 (dd, 0.5H, $J=12.2$ Hz, 12.2 Hz, NeuAc H-3 ax), δ 1.70 (dd, 0.5 H, $J=12.1$ Hz, 12.1 Hz, NeuAc H-3 ax).

メチル- β -D-ガラクトピラノシドを糖受容体基質とした場合、5.0 mg の NeuAc α 2,6-Gal-OMe (10.4 μ mol、収率 65.0%) が得られた。反応生成物の $^1\text{H-NMR}$ は報告されている NeuAc α 2,6-Gal-OMe のケミカルシフト値と良く一致していた[89]。反応生成物の構造上、特徴的な $^1\text{H-NMR}$ のシグナルを以下に示す。: δ 4.31 (d, 1 H, $J=7.94$ Hz, Gal H-1), δ 3.57 (s, 3 H, OMe), δ 3.49 (dd, 1 H, $J=8.0$ Hz, 9.9 Hz, Gal H-2), δ 2.73 (dd, 1 H, $J=4.68$ Hz, 12.5 Hz, NeuAc H-3 eq), δ 2.04 (s, 3 H, Ac), δ 1.70 (dd, 1 H, $J=12.2$ Hz, 12.2 Hz, NeuAc H-3 ax).

3.4. 考察

従来の培養条件では、*P.damsela* JT0160 株のシアル酸転移酵素生産量は培養液 1 liter あたり約 20 U であった。この低い酵素生産性を改良し、工業的レベルで STase 0160 を生産するために、培養条件の検討を行った。その結果、酵素生産量を従来の約 28 倍、培養液 1 liter あたり 550 U の STase 0160 を生産させることに成功した。今回構築した培養条件はフラスコ培養、ジャーファメンター培養いずれの場合にも適用可能であった。フラスコ培養での高い酵素生産性をジャーファメンター培養で再現できたことは、大型の培養槽を用いて *P.damsela* JT0160 株を培養し、STase 0160 の工業的レベルでの生産が十分可能であることを示している。また、本酵素は細菌由来であるために短時間で大量の酵素を生産することも可能である。さらに、最適化された培養条件で増殖させた菌体から 6 段階の精製工程で、精製倍率 700 倍、収率 18% で精製酵素が得られたことも、本菌を用いる α 2,6-シアル酸転移酵素の生産が有用であることを示している。

第 2 章で述べた粗酵素液の調製方法 (2.2.6.) では、酵素の抽出効率が約 10% と低く (Table 2-1)、これは酵素を大量に供給するために改善しなければならない問題であった。今回、菌体の破碎方法は以前と同様であるが、菌体破碎液を 4℃ で 8 時間攪拌することにより、約 70% の抽出効率で STase 0160 が可溶化されることを明らかにした (Table 3-3)。この結果も、本酵素の大量供給を行う際の有用な知見である。また、この結果から、STase 0160 は菌体内において、比較的膜と強く結合していることが示された。

大腸菌などの培養において、グルコースを炭素源及びエネルギー源として使用した場合、クラブトリー効果として知られる酸性副生成物の蓄積がしばしば観察される[106,107]。その中でも、酢酸の生成は菌体増殖阻害の主たる要因として知られている[108]。今回構築した STase 0160 の高生産系 (3xPYBG 培地) においても低レベルではあるが、酢酸の蓄積が確認されたことから本菌の増殖が酢酸によって阻害されている可能性がある。将来的には、培養液中から酢酸を除去することができれば、更に高い生産系の構築も可能と考えられる。

P. damsela JT0160 株によるシアル酸転移酵素の生産はある特定の生育ステージで生産されるのではなく、菌体増殖型であったことから (Fig. 3-1)、STase 0160 によって生産された生体内物質が本菌株の生存に極めて重要な機能・役割を担っている可能性もある。菌体量と STase 0160 生産量に比例関係が見られたことから、本酵素の生体内での糖受容体基質量も増加しているものと考えられる。生体内における本酵素の糖受容体基質の解明は、今後の課題として非常に興味深い。

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、STase 0160 は糖鎖構造中の非還元末端に存在する Gal β 1-4Glc もしくは Gal β 1-4GlcNAc 構造を認識してシアル酸を転移していると考えられることから (Table 2-4)、ガラクトース転移酵素や *N*-アセチルグルコサミン転移酵素などの糖転移酵素が菌体内に存在することが推察される。もしこれらの糖転移酵素の存在が確認されれば、今回構築した培養条件でこれらの酵素を大量に生産・単離することも可能と考えられる。

P. damsela JT0160 株の菌体から調製した粗酵素液中には、今回測定した条件ではシアリダーゼ活性が認められなかった。そこで 0.1 U の STase 0160 を含む粗酵素液を用いてシアリルオリゴ糖の酵素合成を行い、6.4 mg の NeuAc α 2,6-Gal β 1-4Glc、4.6 mg の NeuAc α 2,6-GalNAc、5.0 mg の NeuAc α 2,6-Gal-OMe が得られた。この結果は、今回構築した培養条件で 1liter スケールの培養を行い、それから簡便な方法で得られる粗酵素液を用いてシアリルオリゴ糖のグラムスケール合成が可能であることを示唆するものである。今後、粗酵素液を固定化したシアル酸転移酵素の固定化カラムを作製することで、より簡便なシアリルオリゴ糖の酵素合成も可能になるものと期待される。

また、*N*-アセチルガラクトサミンを糖受容体基質とした酵素反応生成物の構造解析の結果から、STase 0160 が β -ガラクトシド α 2,6-シアル酸転移酵素としてのみではなく、*N*-アセチルガラクトサミニド α 2,6-シアル酸転移酵素として機能することを明らかにした。現在までに、動物由来の 3 種類の *N*-アセチルガラクトサミニド α 2,6-シアル酸転移酵素が知られている[49-51]。これらの酵素はいずれも糖蛋白質に *O*-リンク型で結合している *N*-アセチルガラクトサミン残基に α 2,6 結合でシアル酸を転移する。これらの酵素の糖受容体基質特異性はそれぞれ異なるが、いずれも糖受容体基質である糖蛋白質の蛋白質部分をも認識してシアル酸を転移することが知られている。そのために、これらの酵素は単独で存在する *N*-アセチルガラクトサミンを基質とすることができない。一方、STase 0160 は蛋白質と結合していない *N*-アセチルガラクトサミン単体も糖受容体基質

として、シアル酸を転移することができる。このように、STase 0160 は広い糖受容体基質特異性を持ち、これまでに知られているシアル酸転移酵素では合成することができなかつたシアリルオリゴ糖を酵素合成することが可能であると考えられる。

これまでに、STase 0160 の酵素化学的性質を明らかにし、さらに本酵素の大量生産の可能性を示すことができた。しかし、本酵素の一次構造・高次構造に関する知見は得られてはおらず、また、N 末端アミノ酸も不明である。これらに関する知見を得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必要である。また、本酵素の可溶化には界面活性剤の添加が必要であったことから、本酵素は膜結合型酵素であると考えられる。本酵素をコードする遺伝子をクローニングして、膜結合領域を明らかにすることができれば、この部分を削除した組換え体 STase 0160 を生産することにより、可溶性酵素を供給することが可能になると期待されたので、次章において STase 0160 をコードする遺伝子のクローニング及びその発現を行った（第 4 章参照）。