

第5章 総括

最近の糖鎖生物学・糖鎖工学の進歩に伴い、糖蛋白質や糖脂質等の複合糖質糖鎖の役割が明らかになりつつある。具体的には、細胞間相互作用や細胞認識に関与している糖蛋白質や、細胞の分化・増殖・接着などに関与している糖脂質等の、多種・多様な機能を有する複合糖質糖鎖が細胞表面に存在して、細胞の生命活動を支えていることが分子レベルで理解されつつある。これらの複合糖質糖鎖を構成する糖質の中で、シアル酸が極めて重要な機能を担っていることが明らかにされている。従ってシアル酸を含むオリゴ糖・複合糖質糖鎖を合成し、その生物活性・生理活性を探ることは非常に有意義なことと考えられる。

本研究は、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、その産業上の利用を実現することを目的とした、細菌由来のシアル酸転移酵素に関するものである。シアル酸転移活性を有する細菌の探索を行い、その結果、シアル酸転移酵素を生産する新規海洋性細菌の単離に成功した。また、この細菌が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、その酵素化学的諸性質を明らかにした。次に、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、簡便なシアル酸含有オリゴ糖・複合糖質糖鎖を合成する可能性を示した。さらに、このシアル酸転移酵素をコードする遺伝子を単離し、この酵素蛋白質の分子レベルでの解析を行い、本酵素を可溶性酵素として生産することに成功した。

本研究で得られた成果は、今後の糖鎖工学・糖鎖生物学の分野に広く貢献するものと考えられる。以下、本研究で得られた知見を各章毎に述べる。

第1章

110 菌株の海洋性細菌及び 172 菌株の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をスクリーニングした結果、シアル酸転移活性を示した海洋性細菌を単離することに成功した。この菌株は、その形態観察、生理的性状試験、菌体内 DNA の GC 含量の測定結果から *Photobacterium damsela* と同定され、この菌株を *P.damsela* JT0160 株と命名した[134]。

第2章

P.damsela JT0160 株の生産するシアル酸転移酵素 (STase 0160) は、菌体からの抽出の際に界面活性剤を必要としたことから動物由来のシアル酸転移酵素と同様に膜結合型酵素と考えられた。菌体から酵素を抽出後、イオン交換カラム、ハイドロキシアパタイトカラム、ゲルろ過カラム、アフィニティーカラムを用いたカラムクロマトグラフィーを行い、粗酵素液から収率 19% で電気泳動的に単一なシアル酸転移酵素を得ることに成功した。現在までに、細菌より精製されたシアル酸転移酵素に関する報告はこれまでに無く、*P.damsela* JT0160 株のシアル酸転移酵素は、原核生物より最初に精製されたシアル酸転移酵素である[134]。STase 0160 は分子量約 61,000 Da (SDS-PAGE 法) からなるシングルポリペプチドであり、その酵素反応に至適な pH、温度はそれぞれ、5.0、30℃であ

った。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、反応生成物の構造を解析した結果、反応生成物が 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を明らかにし、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。また、STase 0160 の糖受容体基質特異性の検討を行い、以下の知見を得た。

(1) 糖受容体基質として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、アノマー選択性が見られ、 β -アノマーに対して α アノマーに転移した約 3 倍量のシアル酸を転移することを明らかにした。ラクトース、N-アセチルラクトサミニド等の二糖に対する K_m 値はいずれも 10 mM 前後であり、メチル- β -D-ガラクトピラノシドの K_m 値 (174 mM) よりも一桁低いことから、STase 0160 は単糖よりも二糖に対して親和性が高いことを明らかにした。さらに、STase 0160 は非還元末端に Gal β 1-4Glc もしくは Gal β 1-4GlcNAc 構造を有する糖鎖にはシアル酸を転移するが、Gal β 1-3GlcNAc、Gal β 1-3GalNAc 構造等の構造を有する糖鎖にはシアル酸を転移しないことを明らかにした。この結果から、本酵素は糖鎖の非還元末端に存在するガラクトース残基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を、さらにはその結合様式も認識してシアル酸の転移を行っている と推定された。

(2) 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、動物由来の β -ガラクトシド

α 2,6-シアル酸転移酵素の場合とは大きく異なり、いずれの場合にも 10 mM 前後でほぼ同じ値であった。この結果から本酵素は (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こと、(2) 糖鎖の非還元末端に存在するガラクトース残基の 2 位、3 位に置換がある場合でも糖受容体基質とすることが明らかになった。これらの結果は、本酵素の糖受容体基質特異性が動物由来の酵素と比較して幅広いことを示しており、STase 0160 を用いることにより、これまで知られている α 2,6-シアル酸転移酵素では合成し得なかったシアル酸含有糖鎖も合成できる可能性を示した[134, 135]。

(3) 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のいずれの糖鎖にもシアル酸を転移することを明らかにし、STase 0160 を用いる糖蛋白質糖鎖の修飾の可能性を示すことができた。

第 3 章

STase 0160 を効率的に生産するために、*P.damsela* JT0160 株の培養条件の検討を行い、培養液 1 liter 当たり 550 U のシアル酸転移酵素を生産させることに成功した[136]。現在まで、このような高いレベルで α 2,6-シアル酸転移酵素の生産可能な生産系は報告されていない。また、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、本酵素の発

酵生産が容易にスケールアップ可能であることを示している。従って今回構築した培養条件で、大型の培養槽を用いて *P.damselfa* JT0160 株を培養することにより、STase 0160 の大量供給が可能であると考えられる。さらに、最適化した培養条件で得られた菌体より 6 段階の精製工程で、収率 18% で電気泳動的に単一の STase 0160 が得られる方法を確立したことにより、本菌を用いる α 2,6-シアル酸転移酵素の生産の有効性を示すことができた[136]。

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。これまでに知られている動物由来の 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酵素であり、これらは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いるために、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単体を糖受容体基質とすることができない。しかし、本酵素は *N*-アセチルガラクトサミン単体にもシアル酸を転移することを明らかにした。また、この結果は、STase 0160 が従来の酵素に比べ、広い糖受容体基質特異性を有することを示すものである。

第4章

P. damsela JT0160 株のゲノム DNA ライブラリーから STase 0160 をコードする遺伝子 (*bst*) をクローニングすることに成功した[137]。この *bst* 遺伝子の上流には、大腸菌の持つプロモーター領域と非常に類似した領域、またその下流にはターミネーター領域と考えられる領域を有することを明らかにした。STase 0160 の推定アミノ酸配列を Kyte-Doolittle の疎水性分布法を用いて解析した結果、メチオニン残基から始まる最初の 15 残基のアミノ酸部分は疎水性が高く、さらに、メチオニン残基の下流に 2 個の+チャージを持つリジンが存在した。また、精製酵素の N 末端アミノ酸配列が推定アミノ酸配列の 17 番目以降と完全に一致したことから、メチオニンから始まる最初の 15 残基のアミノ酸部分はシグナル配列と推定された。さらに転写一次産物がシグナル配列と考えられるアミノ酸配列を有しており、このアミノ酸配列が精製酵素には存在しなかったことから、STase 0160 は *P. damsela* JT0160 株の菌体内で細胞質に存在するのではなく、ペリプラズム空間に分泌されていることが推定された。

現在までクローニングされた動物由来のシアル酸転移酵素ファミリーの推定一次アミノ酸配列の解析結果から、これらの酵素間には高度に保存された領域(シアリルモチーフ)が存在することが明らかにされている。しかし、今回 STase 0160 の推定アミノ酸配列中にはシアリルモチーフが存在しないことを明らかにし、また、STase 0160 とこれまでにクローニングされている細菌由来のシアル酸転移酵素 (*Escherichia coli* K-1 の α 2,8-シアル酸転移酵素、*Neisseria meningitidis*

及び *Neisseria gonorrhoeae* の α 2,3-シアル酸転移酵素)との間にも高い相同性が認められなかったことから、*P. damsela* JT0160 株はシアル酸転移活性を、これまでに知られているシアル酸転移酵素とは全く異なる過程で獲得したものと推定された。一方、動物由来のシアル酸転移酵素はその蛋白質分子の構造上においても類似性が認められる。すなわち、それらは N 末端の短い細胞質領域、膜結合領域、ゴルジ内腔幹領域と酵素蛋白質の C 末端部分からなるゴルジ内腔活性領域からなるものと考えられている。しかし、本酵素の蛋白質分子の構造は動物由来の酵素とは大きく異なっていることを明らかにした。即ち、STase 0160 の C 末端側部分に存在する、大腸菌のリン酸輸送システム制御蛋白質 (PhoU 蛋白質) と非常に相同性が高い領域の二次構造解析から、この部分が α -ヘリックス構造を形成する可能性の高いことが、さらに、この α -ヘリックス構造中で疎水性アミノ酸が一方向に配列されうることが推定され、この領域が膜結合領域である可能性が考えられた。そこで、この部分の上流に停止コドンを挿入した発現プラスミドを構築し、大腸菌を用いて組換え体 STase 0160 を生産させた結果、この組換え体 STase 0160 が可溶性酵素であったことから、STase 0160 は (1) C 末端側部分に存在する α -ヘリックス構造を介して膜に結合している可能性が高いこと、(2) その活性領域は酵素蛋白質分子の上記 α -ヘリックス構造よりも N 末端側部分に存在することが推定され、本酵素はこれまでに知られている糖転移酵素とは構造的にも異なり、新規なものであることが明らかになった。また、今回構築した発現プラスミドで形質転換した大腸菌を用いる、可溶性 α 2,6-シア

ル酸転移酵素の供給の可能性を示すことができた[137]。

本研究により、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比較して、幅広い糖受容体基質特異性を有する細菌由来の α 2,6-シアル酸転移酵素 (STase 0160) を大量に供給することが可能となり、動物由来のシアル酸転移酵素では合成不可能であったシアリルオリゴ糖が生産可能となった。現在、本研究で得られた知見をもとに、サイテル社 (サンディエゴ、米国) において、STase 0160 の実用化に向けた試験・検討が行われている。

- [1] Aspinall, G. O., Chemistry of the carbohydrates. In "Ann. Rev. Biochem.", vol. 31, pp. 79-102 (1962).
- [2] Watkins, W. M., Blood group substances. *Science*, **152**, 172-181 (1966).
- [3] Ginsberg, V., Enzymatic basis for blood groups in man. In "Adv. in Enzymol.", vol. 36, pp. 131-149 (1972).
- [4] Sharon, S. (大沢利明 訳) 複合糖質, 学会出版センター, pp. 1-18 (1977).
- [5] Curatolo, W. Glycolipid function. *Biochim. Biophys. Acta.*, **906**, 137-160 (1987).
- [6] de Rosa, M., Gambacorta, A., and Glizzi, A. Structure, biosynthesis and physicochemical properties of archaeobacterial lipids. *Microbiological Reviews.*, **50**, 70-80 (1986).
- [7] Buddecke, E., Occurrence in animals and plants. In "Glycoproteins", ed Gottschalk A., 2nd edit., Part B, Elsevier, Amsterdam, pp 535-564 (1972).
- [8] Sharon, N. and Lis, H. Lectins: cell-agglutinating and sugar-specific proteins. *Science*, **177**, 949-959 (1972).
- [9] Ashwell, G. and Morell, A. G. The role of surface carbohydrates in the hepatic recognition and transport of circulating glycoproteins. In "Adv. in Enzymol.", vol. 41, pp. 99-128 (1978).
- [10] Gattegno, L., Bladier, D., and Cornillot, P. The role of sialic acid in the determination of survival of rabbit erythrocytes in the circulation. *Carbohydr. Res.*, **34**, 361-369 (1974).
- [11] Hudgin, R. I., Pricer, Jr. W. E. and Ashwell, G. The isolation and properties of a rabbit liver binding protein specific for asialoglycoproteins. *J. Biol. Chem.*, **249**, 5536-5543 (1974).
- [12] Stockert, R. J., Morell, A. G. and Scheinberg, I/H. Manmalian hepatic lectin. *Science*, **186**, 365-366 (1974).
- [13] Paulson, J. C. Glycoproteins.: what are the sugar chains for? *Trends Biochem. Sci.*, **14**, 272-276 (1989).
- [14] Hakomori, S. Bifunctional role of glycosphingolipids. *J. Biol. Chem.*, **265**, 18713-18716 (1990).
- [15] Lasky, L. A. Selectins: Interpreters of cell-specific carbohydrate information. *Science*, **258**, 964-969 (1992).
- [16] Feizi, T. Demonstration by monoclonal antibodies that carbohydrate structures of glycoproteins and glycolipids are onco-developmental antigens. *Nature*, **314**, 53-57 (1985).
- [17] 辻 宋一、グライコバイオロジーの新展開, 細胞工学, **15**(6), pp. 726-734 (1996).

- [18] Stoolman, L. M. Adhesion molecules controlling lymphocyte migration. *Cell*, **56**, 907-910 (1989).
- [19] Phillips, M. L., Nudelman, E., Gaeta, F. C. A., Perez, M., Singhal, A. K., Hakomori, S., Paulson, J. C. ELAM-1 mediates cell adhesion by recognition of a carbohydrate ligand, sialyl Le^x *Science*, **250**, 1130-1132 (1990)
- [20] 高橋誠一、糖蛋白質糖鎖の癌性変化、複合糖質の化学と応用、シーエムシー、pp. 149-165 (1989).
- [21] 佐藤武史、古川 清、アスパラギン結合型糖鎖およびムチン型糖鎖の構造、蛋白質 核酸 酵素 臨時増刊「複合糖質」、共立出版、pp. 2082-2087 (1992).
- [22] 木幡 陽、糖蛋白質の構造と機能、有機合成化学協会誌、**50**、pp. 451-463 (1992).
- [23] Hubbard, S. C. and Ivatt, R. J. Synthesis and processing of asparagine-linked oligosaccharides. In "Ann. Rev. Biochem.", vol. **50**, pp. 555-583 (1981).
- [24] Brockhausen, I., Matta, K. L., Orr, J., Schachter, H., Koederman, A. H. L., van den Eijnden, D. H. Mucin synthesis. *Eur. J. Biochem.*, **157**, 463-474 (1986).
- [25] Parodi, A. J., Leloir, L. F. The role of lipid intermediates in the glycosylation of proteins in eucaryotic cell. *Biochim. Biophys. Acta.*, **559**, 1-37 (1979).
- [26] Stults, C. L. M., Sweeley, C. C., Macher, B. A. Glycosphingolipids: Structure, biological source, and properties. In "Methods in Enzymol", vol. **179**, pp. 167-214 (1988).
- [27] Rosner, M. R., Hubbard, S. C., Ivatt, R. J., Robbins, P. W. *N*-asparagine-linked oligosaccharides: Biosynthesis of the lipid linked oligosaccharides. In "Methods in Enzymol.", vol. **83**, pp. 399-408 (1982).
- [28] Elting, J. J., Lennarz, W. J. *N*-asparagine-linked: Transfer of oligosaccharides to peptides and proteins in vitro. In "Methods in Enzymol.", vol. **83**, pp. 408-415 (1982).
- [29] Sadler, J. E., Beyer, T. A., Oppenheimer, C. L., Paulson, J. C., Prieels, J. P., Readick, J. I., and Hill, R. L. Purification of mammalian glycosyltransferases. In "Methods in Enzymol.", vol. **83**, pp. 458-514 (1982).
- [30] 鈴木啓介、長沢徹哉 O-グリコシドの合成手法における最近の進歩、有機合成化学協会誌、**50**、pp. 378-390 (1992).
- [31] Varki, A. Diversity in the sialic acids. *Glycobiology*, **2**, 25-40 (1992).
- [32] Schauer, R. Chemistry, metabolism, and biological functions of sialic acids. In "Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry", vol **40**, pp. 131-234, Academic Press, New York (1982).
- [33] Weisgerber, C., Hansen, A., and Frosch, M. Complete nucleotide and deduced

- aminoacid sequence of CMP-NeuAc: poly- α -2,8-sialosyl sialyltransferase of *Escherichia coli* K1. *Glycobiology*, **1**, 357-365 (1991).
- [34] Gilbert, M., Watson, D. C., Cunningham, A. -M., Jennings, M. P., Young, N. M., and Wakarchuk, W.W. Cloning of the lipooligosaccharide α -2,3-sialyltransferase from the bacterial pathogens *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Biol. Chem.*, **271**, 28271-28276 (1996).
- [35] Lee, Y. C., Kurosawa, N., Hamamoto, T., Nakaoka, T., and Tsuji, S. Molecular cloning and expression of Gal β 1,3GalNAc α 2,3-sialyltransferase from mouse brain. *Eur. J. Biochem.*, **216**, 377-385 (1993).
- [36] Chang, M. -L., Eddy, R. L., Shows, T. B., and Lau, J. T. Y. Three genes that encode human β -galactoside α 2,3-sialyltransferase. *Glycobiology.*, **5**, 319-325 (1995).
- [37] Gillespie, W., Kelm, S., and Paulson, J. C. Cloning and expression of the Gal β 1,3GalNAc α 2,3-sialyltransferase. *J. Biol. Chem.*, **267**, 21004-21010 (1992).
- [38] Kurosawa, N., Hamamoto, T., Inoue, M., and Tsuji, S. Molecular cloning and expression of chick Gal β 1,3GalNAc α 2,3-sialyltransferase. *Biochem. Biophys. Acta.*, **1244**, 216-222 (1995).
- [39] Lee, Y. C., Kojima, N., Wada, E., Kurosawa, N., Hamamoto, T., Nakaoka, T., and Tsuji, S. Cloning and expression of cDNA for a new type of Gal β 1,3GalNAc α 2,3-sialyltransferase. *J. Biol. Chem.*, **269**, 10028-10033 (1994).
- [40] Kitagawa, H., and Paulson, J. C. Cloning and expression of human Gal β 1,3(4)GlcNAc α 2,3-sialyltransferase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **194**, 375-382 (1993).
- [41] Wen, D. X., Livingstone, B. D., Medzihradsky, K. F., Kelm, S., Burlingame, A.L., and Paulson, J. C. Primary structure of Gal β 1,3(4)GlcNAc α 2,3-sialyltransferase determined by mass spectrometry sequence analysis and molecular cloning. *J. Biol. Chem.*, **267**, 21011-21019 (1992).
- [42] Kitagawa, H., and Paulson, J. C. Cloning of a novel α 2,3-sialyltransferase that sialylates glycoproteins and glycolipid carbohydrate groups. *J. Biol. Chem.*, **269**, 1394-1401 (1994).
- [43] Sasaki, K., Watanabe, E., Kawashima, K., Sekine, S., Dohi, T., Oshima, M., Hanai, N., Nishi, T., and Hasegawa, M. Expression cloning of a novel Gal β (1-3/1-4)GlcNAc α 2,3-sialyltransferase using lectin resistance selection. *J. Biol. Chem.*, **268**, 22782-22787 (1994).
- [44] Hamamoto, T., Kawasaki, M., Kurosawa, N., Nakaoka, T., Lee, Y. C., and Tsuji, S. Two-step single primer-mediated polymerase chain reaction. Application to

- cloning of putative mouse, β -galactoside α 2,6-sialyltransferase cDNA. *Bioorg. Med. Chem.*, **1**, 141-145 (1993).
- [45] Stamenkovic, I., Asheim, H. C., Deggerdal, A., Blomhoff, H. K., Smeland, E. B., and Funderud, S. The B cell antigen CD75 is a cell surface sialyltransferase. *J. Exp. Med.*, **172**, 641-643 (1990).
- [46] Grundmann, U., Nerlich, C., Rein, T., and Zettlmeissl, G. Complete CDNA sequence encoding human β -galactoside α 2,6-sialyltransferase. *Nucleic Acids Res.*, **18**, 667 (1990).
- [47] Weinstein, J., Lee, E. U., McEntee, K., Lai, P. H., and Paulson, J. C. Primary structure of β -galactoside α 2,6-sialyltransferase. *J. Biol. Chem.*, **262**, 17735-17743 (1987).
- [48] Kurosawa, N., Kawasaki, M., Hamamoto, T., Nakaoka, T., Lee, Y.C., Arita, M., and Tsuji, S. Molecular cloning and expression of chick embryo Gal β 1,4GlcNAc α 2,6-sialyltransferase: Comparison with the mammalian enzyme. *Eur. J. Biochem.*, **219**, 375-381 (1994).
- [49] Kurosawa, N., Hamamoto, T., Lee, Y.C., Nakaoka, T., Kojima, N., and Tsuji, S. Molecular cloning and expression of GalNAc α 2,6-sialyltransferase. *J. Biol. Chem.*, **269**, 1402-1409 (1994).
- [50] Kurosawa, N., Kojima, N., Inoue, M., Hamamoto, T., and Tsuji, S. Cloning and expression of Gal β 1,3GalNAc-specific GalNAc α 2,6-sialyltransferase. *J. Biol. Chem.*, **269**, 19048-19053 (1994).
- [51] Sjoberg, E. R., Kitagawa, H., Glushka, J., van Halbeek, H. and Paulson, J. C. Molecular Cloning of a developmentally regulated *N*-acetylgalactosamine α 2,6-sialyltransferase specific for sialylated glycoconjugates. *J. Biol. Chem.*, **271**, 7450-7459 (1996).
- [52] Yoshida, Y., Kojima, N., Kurosawa, N., Hamamoto, T., and Tsuji, S. Molecular cloning and expression of Sia α 2,3Gal β 1,4GlcNAc α 2,8-sialyltransferase from mouse brain. *J. Biol. Chem.*, **270**, 14628-14633 (1995).
- [53] Sasaki, K., Kurata, K., Kojima, N., Kurosawa, N., Ohta, S., Hanai, N., Tsuji, S., and Nishi, T. Expression cloning of a GM3-specific α 2,8-sialyltransferase (GD3 synthase). *J. Biol. Chem.*, **269**, 15950-15956 (1994).
- [54] Nara, K., Watanabe, Y., Maruyama, K., Kasahara, K., Nagai, Y., and Sanai, Y. Expression cloning of a CMP-NeuAc: NeuAc α 2-3Gal β 1-4Glc β 1-1' Cer α 2,8-sialyltransferase (GD3 synthase) from human melanoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 7952-7956 (1994).
- [55] Haraguchi, M., Yamashiro, S., Yamamoto, A., Furukawa, K., Takamiya, K.,

- Lloyd, K.O., Shiku, H., and Furukawa, K. Isolation of the GD3 synthase gene by expression cloning of GM3 α -2,8-sialyltransferase cDNA using the anti- GD2 monoclonal antibody. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*, **91**, 10455-10459 (1994).
- [56] Scheidegger, E. P., Sternberg, L. R., Roth, J., and Lowe, J. B. A human STX cDNA confers polysialic acid expression in mammalian cells. *J.Biol.Chem.*, **270**, 22685-22688 (1995).
- [57] Livingstone, B. D., and Paulson, J. C. Polymerase chain reaction cloning of a developmentally regulated member of the sialyltransferase gene family. *J.Biol.Chem.*, **268**, 11504-11507 (1993).
- [58] Tsuji, S. Molecular Cloning and Functional Analysis of Sialyltransferases *J. Biochem.*, **120**, 1-13 (1996).
- [59] 宮城妙子、シアリルトランスフェラーゼ、蛋白質 核酸 酵素、学会出版センター、**30**(6), pp.461-477 (1985).
- [60] DeNinno, M. P. The synthesis and glycosidation of *N*-acetylneuraminic acid. *Synthesis*, 583-593 (1991).
- [61] Maru, I., Ohta, Y., Okamoto, K., Suzuki, S., Kakehi, K., and Tsukada, Y. Synthesis of sialyllactose from *N*-acetylneuraminic acid and lactose by a neuraminidase from *Arthrobacter ureafaciens*. *Biosci.Biotech.Biochem.*, **56**, 1557-1561 (1992).
- [62] Pozsgay, V., Brisson, J. R., Jennings, H. J., Allen, S., and Paulson, J. C. Combined chemical and enzymatic synthesis of a pentasaccharide. Repeating unit of the capsular polysaccharide of type III Group B streptococcus and one- and two-dimensional spectroscopic studies. *J.Org.Chem.*, **56**, 3377-3385 (1991).
- [63] Unverzagt, C., Kunz, H., Paulson, J. C. High-efficiency synthesis of sialooligosaccharides and sialoglycopeptides. *J.Am.Chem. Soc.*, **112**, 9308-9309 (1990).
- [64] 新家 龍、今中忠行、微生物の応用、微生物工学入門、朝倉書店 pp. 95-127 (1985)
- [65] Varki, A. Selectin ligands. *Proc.Natl.Acad. Sci.USA*, **91**, 7390-7397 (1994).
- [66] 竹内 誠、エリトロポエチンの生物活性における糖鎖の機能、生化学、**62**, pp. 1272-1277 (1990).
- [67] Hong Lui、小島直也、辻 宗一、遺伝子発現制御を用いた糖鎖発現制御への新しい試み、細胞工学、**15**(6), pp. 765-773 (1996).
- [68] Jennings, H. J. Capsular polysaccharides as human vaccines. In "Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry", vol. 41, pp 155-208, Academic Press, New York (1983)

- [69] Lechner, J. and Wieland, F. Structure and biosynthesis of prokaryotic glycoproteins. In "Ann. Rev. Biochem." vol. **58**, 173-194 (1989).
- [70] 宮城妙子、新生化学実験講座 糖質 I 糖タンパク質 (下)、東京化学同人、pp. 41-445 (1990).
- [71] 長谷川 武治、微生物の分類と同定 (下)、学会出版センター、pp. 99-161 (1985)
- [72] Holt, J. G., Kreig, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J.T., and Williams, S.T. In "Bergey's manual of Determinative Bacteriology 9th edition", pp. 175-289, Williams and Wilkins, Baltimore (1994)
- [73] Macdonell, M. T., and Colwell, R. R. Phylogeny of the Vibrionaceae, and recommendation for two new genera, *Listonella* and *Shewanella*. *Syst. Appl. Microbiol.*, **6**, 171-182 (1985).
- [74] Smith, S. K., Sutton, D. C., Fuerst, J. A., and Reichelt, J. L. Evaluation of the genus *Listonella damsela* (Love et al.) MacDonell and Colwell to the genus *Photobacterium* as *Photobacterium damsela* comb. nov. with an emended description. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **41**, 529-534 (1991).
- [75] Fouz, B., Toranzo, A. E., Biosca, E. G., Mazoy, R., Amaro, C. Role of iron in the pathogenicity of *Vibrio damsela* for fish and mammals. *FEMS Microbiol. Lett.*, **121**(2), 181-188 (1994).
- [76] Veenemann, G. H., van Leenwen, S. H., and van Boom, J. H. Iodonium ion promoted reactions at the anomeric centre. II. An efficient thio glycoside mediated approach toward the formation of 1,2-trans linked glycosides and glycosidic esters. *Tetrahedron lett.*, **31**, 1331-1334 (1990).
- [77] Fujita, S., Numata, M., Sugimoto, M., Tomita, K., and Ogawa, T. Total synthesis of the modified ganglioside de-*N*-acetyl- GM3 and some analogs. *Carbohydr. Res.*, **228**, 347-370 (1992).
- [78] Matsuzaki, Y., Nunomura, S., Ito, Y., Sugimoto, M., Nakahara, Y., and Ogawa, T., Stereocontrolled synthesis of GD2. *Carbohydr. Res.*, **242**, C1-C6 (1993).
- [79] Okamoto, K., and Goto, T. Glycosidation of sialic acid. *Tetrahedron*, **46**, 5835-5857. (1990).
- [80] Ichikawa, Y., Look, G. C., and Wong, C. H. Enzyme-catalyzed oligosaccharide synthesis. *Anal. Biochem.*, **202**, 215-238 (1992).
- [81] 伊藤幸成、シアル酸転移酵素を用いるオリゴ糖の合成. 日本農芸化学会誌, **67**, 1757-1761 (1993).
- [82] 伊藤幸成、複合糖質糖鎖の合成化学および酵素化学的研究. 日本農芸化学

- 会誌, **67**, 1545-1554 (1993).
- [83] Sarkar, M., and Kabat, E. A. Synthesis of the anomers of methyl-2-acetamido-2-deoxy-D-galacto-furanoside and -pyranoside. *Carbohydr.Res.*, **69**, 143-149 (1979).
- [84] Kajihara, Y., Kodama, H., Wakabayashi, T., Sato, K., and Hashimoto, H. Characterization of inhibitory activities and binding mode of synthetic 6'-modified methyl *N*-acetyl- β -lactosaminide toward rat liver CMP-D-NeuAc: D-galactoside-(2,6)- α -D-sialyltransferase. *Carbohydr. Res.*, **247**, 179-193 (1993).
- [85] Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685 (1970).
- [86] Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J.Biol.Chem.* **193**, 265-275 (1951).
- [87] Matsudaira, P. Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. *J.Biol.Chem.*, **262**, 680-685 (1987).
- [88] Kondo, A., Suzuki, J., Kuraya, N., Hase, S., Kato, I., and Ikenaka, T. Improved method for fluorescence labeling of sugar chains with sialic acid residues. *Agric.Biol.Chem.*, **54**, 2169-2170 (1990).
- [89] Sabesan, S., and Paulson, J. C. Combined chemical and enzymatic synthesis of sialyloligosaccharides and characterization by 500-Mhz ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy. *J.Am.Chem.Soc.*, **246**, 2068-2080 (1986).
- [90] Jourdain, G. W., Dean, L., and Roseman, S. The sialic acids. *J.Biol.Chem.*, **246**, 430-435 (1971).
- [91] Weinstein, J., de Souza-e-Silva, U., and Paulson, J. C. Sialylation of glycoprotein oligosaccharides N-linked to asparagine. *J.Biol.Chem.*, **257**, 13845-13853 (1982).
- [92] Zapata, G., Vann, W. F., Aaronson, W., Lewis, M. S., and Moos, M. Sequence of the cloned *Escherichia coli* cytidine 5'-monophosphate *N*-acetylneuraminic acid synthetase gene. *J.Biol.Chem.*, **264**, 14769-14774 (1989).
- [93] Silver, R. P., Vann, W. F., and Aaronson, W. Genetic and molecular analyses of *Escherichia coli* K1 antigen genes. *J.Bacteriol.*, **157**, 568-575 (1984).
- [94] Paulson, J. C., Rearick, J. I., and Hill, R. L. Enzymatic properties of β -D-galactoside α 2,6-sialyltransferase from bovine colostrum. *J.Biol.Chem.*, **252**, 2363-2371 (1977).
- [95] Weinstein, J., de Souza-e-Silva, U., and Paulson, J. C. Purification of a Gal β 1-4 GlcNAc α 2,6-sialyltransferase and a Gal β 1-3(4) α 2,3-sialyltransferase to homogeneity from rat liver. *J.Biol.Chem.*, **257**, 13835-13844 (1982).
- [96] Joziassse, D. H., Bergh, M. L. E., ter Hart, H. G. J., Koppen, P. L., Hooghwinkel, G. J. M., and van den Eijnden, D. H. Purification and

- characterization of CMP-sialic acid: β -galactosyl-3-*N*-acetylgalactosaminide α 2-3-sialyltransferase from human placenta. *J.Biol.Chem.*, **260**, 4941-4951 (1985).
- [97] Miyagi, T., and Tsuiki, S. Purification and characterization of β -galactoside (α 2-6) sialyltransferase from rat liver and hepatomas. *Eur.J.Biochem.*, **126**, 253-261 (1982).
- [98] 中原義昭, 小川智也, O-グリコシド型 (ムチン型) 糖蛋白質糖鎖と糖オリゴペプチドの合成, 有機化学協会誌, **50**, 410-428 (1992).
- [99] Ichikawa, Y., Liu, J. L.-C., Sen, G. -J., Wong, C. -H. A highly efficient multienzyme system for the one-step synthesis of a sialyl trisaccharide. In situ generation of sialic acid and *N*-acetylglucosamine coupled with regeneration of UDP-glucose, UDP-galactose, and CMP-sialic acid. *J.Am.Chem. Soc.*, **113**, 6300-6302 (1991).
- [100] Ichikawa, Y., Sen, G. -J., Wong, C. -H. Enzyme-catalyzed synthesis of sialyloligosaccharide with in situ regeneration of CMP-sialic acid. *J.Am.Chem. Soc.*, **113**, 4698-4700 (1991).
- [101] Gilbert, M., Cunningham, A. -M., Watson, D. C., Martin, A., Richards, J. C., and Wakarchuk, W. W. Characterization of a recombinant *Nisseria meningitidis* α -2,3-sialyltransferase and its acceptor specificity. *Eur.J.Biochem.*, **249**, 187-194 (1997).
- [102] Inagaki, K., Terada, I., and Yamazaki, Y. Purification and characterization of a neuraminidase from a marine bacterium, *Vibrio* sp. strain JT0205. *J.Mar.Biotechnol.*, **4**, 138-144 (1996).
- [103] Aminoff, D. Methods for the quantitative estimation of *N*-acetylneuraminic acid and their application to hydrolysates of sialomucoids. *Biochem. J.*, **81**, 384-392 (1961).
- [104] Dorland, L., Haverkamp, J., Vliegthart, J. F. G., Strecker, G., Michalski, J.-C., Fournet, B., Spik, G., and Montreuil, J. 360-Mhz 1 H-nuclear-magnetic-resonance spectroscopy of sialyl-oligosaccharides from patients with sialidosis (Mucopolidosis I and II). *Eur.J.Biochem.*, **87**, 323-329 (1978).
- [105] Paulsen, H., von Deessen, U., and Tietz, H. Synthesis einer disaccharideinheit aus *N*-acetyl-neuraminsäure und 2-acetamide-2-deoxy-D-galactose. *Carbohydr.Res.*, **137**, 63-77 (1985).
- [106] Grag, C. T., Wimpenny, J. W. T., and Moosman, M. R. Regulation of metabolism in facultative bacteria II. Effects of aerobiosis, anaerobiosis and nutrition on the fermentation of krebs cycle enzymes in *Escherichia coli*. *Biochem.Biophys. Acta.*, **117**, 33-41 (1966).

- [107] Rinas, V., Kracke-Helm, H.-A., and Schugerl, K. Glucose as a substrate in recombinant strain fermentation technology. *Appl.Microbial. Biotechnol.*, **31**, 163-167 (1989).
- [108] Luli, G. W., and Strohi, W. R. Comparison of growth, acetate production, and acetate inhibition of *Escherichia coli* strains in batch and fed-batch fermentations. *Appl.Environ.Microbiol.*, **56**, 1004-1011 (1990).
- [109] Sasaki, K. Molecular cloning and characterization of sialyltransferase. *Trends.Glycosci.Glycotechol.*, **8**, 195-215 (1996).
- [110] Datta, A. K., and Paulson, J. C. The sialyltransferase "Sialyl motif" participates in binding the donor substrate CMP-NeuAc. *J.Biol.Chem.*, **270**, 1497-1500 (1995).
- [111] 井原義人, 顧 建国, 西川 淳, 谷口直之、糖転移酵素: β 1-4GlcNAc 転移酵素 (GnT-III) のクローニング, 日本農芸化学会誌 **67**, 1734-1740 (1993).
- [112] Cohen, S. N., Chang, A. C. Y., and Hsu, L. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Pro.Natl.Acad.Sci.USA* , **69**, 2110-2114 (1972).
- [113] Saito, H., and Miura, K. Preparation of transforming deoxyribonucleic acid by phenol treatment. *Biochem.Biophys.Acta.*, **72**, 619-629 (1963).
- [114] Frishauf, A. M., Lehrach, H., Poustka, A., and Hurry, N. Lamda replacement vectors carrying polylinker sequences. *J.Mol.Biol.*, **170**, 827-842 (1983).
- [115] Birnboim, H. C. A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. In "Methods in Enzymol.", **100**, 243-255 (1983).
- [116] Perbel, B. In "A Practical Guide to Molecular cloning", pp.221-223, John Wiley and Sons, New York (1984).
- [117] Kushner, S. R. In "Genetic engineering", pp. 17-23, Elsevier/North-Holland, Amsterdam. (1987).
- [118] Southern, E. M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J.Mol.Biol.*, **98**, 503-517 (1975).
- [119] Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. In "Molecular Cloning: a laboratory manual", 2.60-2.121 Cold Springer Harbor Laboratory, Cold Springer Harbor New York (1989)
- [120] Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Pro.Natl.Acad.Sci.USA* , **74**, 5463-5467 (1977).
- [121] Murray, V. Improved double-stranded DNA sequencing using the linear polymerase chain reaction. *Nucl.Acids Res.*, **17**, 8889 (1989).
- [122] Kyte, J., and Doolittle, R. F. A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J.Mol.Biol.* , **157**, 105-132 (1982).

- [123] Amemura, M., Makino, K., Shinagawa, H., Kobayashi, A., and Nakata, A. Nucleotide sequence of the genes involved in phosphate transport and regulation of the phosphate regulation in *Escherichia coli*. *J.Mol.Biol.*, **184**, 241-250 (1985).
- [124] Lee, Y.C., Miyata, Y., Terada, I., Ohta, T., and Matsuzawa, H. Involvement of NH₂-terminal pro-sequence in the production of active Aqualysin I (a thermophilic serine protease) in *Escherichia coli*. *Agric.Biol.Chem.*, **55**, 3027-3032 (1991).
- [125] Kunkel, T. A. Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 488-492 (1985).
- [126] Shine, J., and Dalgarno, L. Determination of cistron specificity in bacterial ribosomes. *Pro.Natl.Acad.Sci.USA*, **71**, 1342-1346 (1974).
- [127] Harley, C. B., and Reynolds, R. P. Analysis of *E. coli* promoter sequences. *Nucleic Acids Res.*, **15**, 595-623 (1987).
- [128] Hawley, D. K., and McClire, W. R. Compilation and analysis of *Escherichia coli* promoter sequences. *Nucleic Acids Res.*, **11**, 2237-2255 (1983).
- [129] Vollenweider, H. J., Fiandt, M., and Szybalsky, W. A relationship between DNA helix stability and recognition sites for RNA polymerase. *Science*, **205**, 508-511 (1979).
- [130] Vollenweider, H. J., and Szybalsky, W. Electron microscopic mapping of RNA polymerase binding to coliphage lambda DNA. *J.Mol.Biol.*, **123**, 485-498 (1978).
- [131] Tinoco, I., Borer, P., Dengler, B., and Levine, M. D. Improved estimation of secondary structure in ribonucleic acids. *Nature*, **246**, 40-41 (1973).
- [132] Hamamoto, T., Lee, Y.C., Kurosawa, N., Nakaoka, T., Kojima, N., and Tsuji, S. Expression of mouse Gal β 1,4GlcNAc- α 2,6-sialyltransferase in an insoluble form in *Escherichia coli* and partial renaturation. *Bioorg.Med.Chem.*, **2**, 79-84 (1994).
- [133] Recny, M. A., Grabau, C., Cronan, J. E. Jr., and Hager, L. P. Characterization of the α -peptide released upon pretease activation of pyruvate oxidase. *J.Biol.Chem.*, **260**, 14287-14291 (1985).
- [134] Yamamoto, T., Nakashizuka, M., Kodama, H., Kajihara, Y., and Terada, I. Purification and Characterization of a Marine Bacterial β -Galactoside α 2,6-Sialyltransferase from *Photobacterium damsela* JT0160. *J. Biochem.*, **120**, 104-110 (1996).
- [135] Kajihara, Y., Yamamoto, T., Nagae, H., Nakashizuka, M., Sakakibara, T., and Terada, I. A Novel α 2,6-Sialyltransferase: Transfer of Sialic Acid to Fucosyl and Sialyl Trisaccharides. *J. Org. Chem.*, **61** (24), 8632-8635 (1996).

- [136] Yamamoto, T., Nagae, H., Kajihara, Y., and Terada, I. Mass Production of Bacterial α 2,6-Sialyltransferase and Enzymatic Syntheses of Sialyloligosaccharides. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62** (2), 210-214 (1998).
- [137] Yamamoto, T., Nakashizuka, M., and Terada I. Cloning and Expression of a Marine Bacterial β -Galactoside α 2,6-Sialyltransferase Gene from *Photobacterium damsela* JT0160. *J. Biochem.*, **123**, 94-100 (1998).

謝辞

本研究をまとめるにあたり、終始御親切な御指導、御教示を賜りました山形大学農学部教授、佐々武史博士に心から深甚なる感謝の意を表します。

本論文を作成にあたり、貴重な御指導、御助言を賜りました山形大学農学部助教授、三橋 渉博士、山形大学農学部、豊増知伸博士に厚く御礼申し上げます。

本研究を行う機会を与えてくださいました日本たばこ産業株式会社海水総合研究所（現：財団法人塩事業センター海水総合研究所）、有田正俊前所長、橋本俊夫元所長、三上 洋一元所長に深甚の謝意を表します。

本論文をまとめる機会を与えてくださいました日本たばこ産業株式会社、内山研輔取締役、同たばこ中央研究所、櫛山両蔵所長、佐野 実副所長、松倉正雄チームリーダー（現：同品質分析部部長）に厚く御礼申し上げます。

本研究を進めるにあたり、多くの御助言と御協力を戴きました日本たばこ産業株式会社生命科学研究所、児玉 久博士（現：同医薬総合研究所）、日本たばこ産業株式会社海水総合研究所、寺田一郎博士（現：同医薬総合研究所）、海水総合研究所、中静素子主任研究員（現：同食生活研究所）ならびに生命科学研究所、梶原康宏博士（現：横浜市立大学理学部）に深く感謝いたします。

アミノ酸分析を行うにあたり、御指導を戴きました日本たばこ産業株式会社医薬探索研究所、鎌田雅史博士に深く感謝いたします。

培養試験及び酵素大量精製試験を進めるにあたり、並々ならぬ御協力を戴いた海水総合研究所、永江英樹研究員（現：同たばこ中央研究所）に厚く御礼申し上げます。

終始、有益な御助言、御協力を戴きました海水総合研究所、菅野靖史博士（現：東京工業大学資源化学研究所）、稲垣浩二研究員（現：同医薬総合研究所）に心から感謝いたします。

最後に、酵素学の楽しさを教えていただき、終始温かい励ましを戴きました山形大学名誉教授小田圭昭先生に謹んで厚く御礼申し上げます。