

論文の内容の要旨

氏名：上 宮 悠

博士の専攻分野の名称：博士（工学）

論文題名：海洋性細菌由来のシアル酸転移酵素によるガングリオシド合成とその解析に関する研究

ガングリオシドはシアル酸と呼ばれる酸性糖を一つ以上有するスフィンゴ糖脂質の総称であり、動物細胞表面に普遍的に存在する細胞膜の主要な構成成分の一つである。細胞膜上でガングリオシドは、膜の外側に親水性の糖鎖部分を突出す形で存在し、細胞間の認識、細胞の増殖や分化の調節、細胞のガン化、細菌やウイルスの感染など、様々な生物学的現象において重要な役割を果たしていることが知られている。しかしながら、糖鎖構造と機能の関連性は、その構造類似分子が多いことや存在量が少ないことから未だに明らかになっていない点も多い。そのため、研究材料としてガングリオシドをより容易に入手し、利用できるようにすることが、糖鎖研究を進展させる上で重要な課題の一つと考えられる。

シアル酸転移酵素 (ST) は、供与体基質であるシチジン-リン酸-N-アセチルノイラミン酸 (CMP-NeuAc) から、受容体基質である糖鎖の非還元末端にシアル酸の分子種の一つである NeuAc を転移させる触媒能を有している。近年の研究で、*Photobacterium* 属、*Vibrio* 属といった海洋性のグラム陰性細菌の一部が、シアル酸および ST を有していることが明らかとなった。海洋性細菌由来の ST は、動物由来の ST とは異なり、ガラクトースや N-アセチルガラクトサミンなど様々な糖に NeuAc を転移できることから、シアロ糖鎖を合成するための新しいツールとなることが期待された。

以上のような背景を受け、本研究ではガングリオシド研究における海洋性細菌由来の ST の有用性を明らかにすることを広義の目的とし、(I) ガングリオシド合成ツールとしての確立を将来的な視野に入れた、海洋性細菌由来 ST のスフィンゴ糖脂質に対する反応性の解析、および (II) シアル酸を過剰に発現した細胞株を樹立することを目標とした、動物細胞における海洋性細菌由来 ST 発現系の構築を行った。併せて、細胞株樹立後のガングリオシド分析を迅速に行うための簡便な試料調製法を確立した。本博士論文は全 5 章から構成されており、各章の概要は以下の通りである。

第 1 章 序論

本章では、ガングリオシドの構造的特徴、ST の反応機構、本研究の背景について概説し、本論文の目的を示した。特に、従来の動物由来の ST と海洋性細菌由来の ST の特徴的な違いについて言及し、本研究の意義を述べた。また、本研究では、NeuAc を α 2-3 結合で転移させる α 2-3ST (#1~#3)、および NeuAc を α 2-6 結合で転移させる α 2-6ST (#4~#6) をそれぞれ用いて研究を行った。

第 2 章 海洋性細菌由来シアル酸転移酵素によるガングリオシド合成と酵素学的諸性質の検討

本章では、ネオラクト系スフィンゴ糖脂質であるネオラクトテトラオシルセラミド (nLc_4Cer) を受容体基質として用いた際の酵素反応の結果と、それに基づく酵素学的諸性質の検討結果についてそれぞれ述べた。酵素反応は、25 μ g のスフィンゴ糖脂質に対し、333 mM のカコシル酸ナトリウム緩衝液 (pH6.5)、10 mM の塩化マンガン、500 mM の塩化ナトリウム、3.33 mM の CMP-NeuAc、0.3% の Triton-X100、およびそれぞれの ST (0.2 U) からなる 30 μ L の反応液を加え、37°C で 3 時間反応を行った。酵素合成物の分析は TLC、TLC/免疫染色法、SIMS、¹H-NMR、およびメチル化分析 (GC/MS) により行った。また、酵素合成物の定量は、Image J ソフトウェア (National Institutes of Health) により行った。

【ネオラクト系ガングリオシドの合成】海洋性細菌由来 ST が nLc_4Cer に対して、シアル酸を転移できることを明らかにした。各種の分析から、 α 2-3ST、および α 2-6ST 酵素合成物は、 nLc_4Cer の非還元末端 Gal にそれぞれ α 2-3、 α 2-6 結合で NeuAc が結合したガングリオシドであることを示した。

【酵素学的諸性質の検討】反応時間、温度、pH、および基質濃度依存性について、 nLc_4Cer を用いて検討を行い、海洋性細菌由来 ST の反応性を明らかにした。反応時間依存性の検討では、全ての α 2-3ST が反応時間 30 分で合成量が平衡に達した。一方、 α 2-6ST では平衡化は確認されず、180 分まで検討を行ったが、反応時間の延長とともに合成量が増加した。温度および pH 依存性の検討では、 α 2-3ST

は 37°C よりも低い温度条件で、 α 2-6ST は pH6.5 よりも高い pH で、それぞれ合成量が増加する傾向を示した。さらに、基質濃度依存性の検討結果から、それぞれの ST の K_m および V_{max} 値をそれぞれ算出したところ、 α 2-3ST では #3 が、 α 2-6ST では #4 が最も効率よく nLc₄Cer に反応性を示すことを示した。

【インフルエンザ A ウイルス結合実験】酵素合成したガングリオシドである NeuAc α 2-3nLc₄Cer (#3 酵素合成物)、NeuAc α 2-6nLc₄Cer (#4 酵素合成物) の生理活性を検討するために、インフルエンザ A ウイルス (H3N2) との結合実験を行い、ウイルスと結合性を有していることを明らかにした。

第 3 章 海洋性細菌由来シアル酸転移酵素による様々なガングリオシド合成

本章では、nLc₄Cer 以外の様々な系列のスフィンゴ糖脂質を受容体基質に用いて検討を行った。酵素反応、および酵素合成物の確認は前章と同じ条件、方法で行った。

【長鎖型ネオラクト系、およびラクト系ガングリオシドの合成】本酵素が、長鎖型のネオラクト系スフィンゴ糖脂質であるネオラクトヘキサオシルセラミド (i-スフィンゴ糖脂質)、イソネオラクトオクタオシルセラミド (I-スフィンゴ糖脂質)、およびラクト系スフィンゴ糖脂質であるラクトテトラオシルセラミド (Lc₄Cer) に対して反応性を示すことを明らかにした。結果として、これまでと同様に α 2-3ST、 α 2-6ST 酵素反応物において合成物が確認され、それぞれ α 2-3、 α 2-6 結合で NeuAc が結合したガングリオシドが合成できたと考えられた。

【ガングリオ系ガングリオシドの合成】本酵素が、アジアロガングリオ系スフィンゴ糖脂質であるガングリオテトラオシルセラミド (GA1)、ガングリオトリアオシルセラミド (GA2) を受容体基質に対して反応性を示すことを明らかとした。GA1 では α 2-3ST、 α 2-6ST それぞれの酵素反応物において、GA2 では α 2-6ST 酵素反応物においてそれぞれ合成物が確認された。GA2 から得られた α 2-6ST 酵素合成物に対して各種分析を行い、糖鎖構造を解析したところ、天然には存在が確認されていない新規のガングリオシド (NeuAc α 2-6GA2) であることが示された。

【インフルエンザ A ウイルス結合実験】新規のガングリオシドである NeuAc α 2-6GA2 (#4 酵素合成物) の生理活性を検討する目的で、インフルエンザ A ウイルス (H3N2) との結合実験を行い、NeuAc α 2-3nLc₄Cer および NeuAc α 2-6nLc₄Cer と同様に、インフルエンザ A ウイルスが結合性を示すことを明らかにした。

第 4 章 動物細胞における海洋性細菌由来シアル酸転移酵素の発現系構築、およびガングリオシド分析のための簡便な試料調製法の確立

シアル酸を過剰に発現した細胞株は、糖鎖と生物学的現象に関する新たな知見を得るための有効な研究材料となる。前章までの結果で、海洋性細菌由来 ST がガングリオシド合成に有用であることが明らかとなったことから、本章では動物細胞における海洋性細菌由来 ST の発現系の構築を行った。また、遺伝子導入した細胞のガングリオシドは、ST やその他の内在性の糖転移酵素の影響により、さらに複雑化することが予測されたことから、それらをより迅速かつ簡便に分析するための新たな試料調製法の確立を行った。

【動物細胞における海洋性細菌由来 ST 発現系の構築】海洋性細菌由来 ST の触媒部位とゴルジ局在シグナルを用いて動物細胞で発現させるための遺伝子を構築した。構築した発現系を機能させるための工夫と現在までに得られている結果を述べ、今後の研究の方向性について示した。

【ガングリオシドを迅速に分析するための簡便な試料調製法の確立】TLC で分離したガングリオシドを有機溶媒で抽出した際に共抽出される固着剤などの夾雑物の MS 分析における影響を改善するため、1,2-ジクロロエタン (DCE) を用いた簡便な試料調製法を確立した。さらに、確立した手法を用いることで、組織由来の総糖脂質からもガングリオシドを迅速に MS 分析できることを明らかにし、本手法が有用な試料調製法となることを示した。

第 5 章 総括

本博士論文研究により、海洋性細菌由来 ST がガングリオシドを合成するための有用なツールとなることを明らかにした。また、動物細胞における海洋性細菌由来 ST の発現系構築と迅速なガングリオシド分析のための簡便な試料調製法の確立を行い、今後の研究の方向性を示した。