

## 論文審査の結果の要旨

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

審査委員：（主査） 教授 榎 泰 典

（副査） 教授 澤 口 孝 志

客員教授 貝 沼 圭 二

北里大学教授 中 村 和 生

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。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、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。しかしながら、糖鎖構造と機能の関連性は、その構造類似分子の種類が多いことと存在量の少ないことから未解明の部分も多い。研究材料としてガングリオシドをより容易に入手かつ利用できるようにすることが、これらの関連性を解明する上で、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同様にシアル酸および 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、申請者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て、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解析を迅速に行うための簡便な試料調製法を確立した。本博士論文は序論及び結論を含めて全 5 章から構成されており、各章の概要は以下のとおりである。

### 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、本論文の目的が示されている。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記述した。また、使用された  $\alpha$ 2-3ST (#1~#3)、および  $\alpha$ 2-6ST (#4~#6) とその由来を説明している。

### 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<sub>4</sub>Cer) を受容体基質として用いた際の酵素反応の結果と、酵素学的諸性質の結果について述べている。酵素反応は、25  $\mu$ 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  $\mu$ 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、<sup>1</sup>H-NMR、およびメチル化分析 (GC/MS) を用いた。また、酵素合成物の定量は、Image J ソフトウェア (National Institutes of Health) を用いて解析した。

本酵素が *N*-アセチルラクトサミン構造を有する  $nLc_4Cer$  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、酵素合成物は、 $nLc_4Cer$  の糖鎖非還元末端のガラクトースにそれぞれ  $\alpha$ 2-3,  $\alpha$ 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。

酵素学的諸性質では、反応時間、温度、pH、および基質濃度依存性について検討した。即ち、反応時間依存性の検討では、全ての  $\alpha$ 2-3ST が反応時間 30 分で合成量が平衡に達した。一方、 $\alpha$ 2-6ST では平衡化は確認されず、180 分まで反応を行ったが、反応時間の延長とともに合成量が増加し続けた。温度および pH 依存性の検討では、 $\alpha$ 2-3ST は 37°C よりも低い温度条件で、 $\alpha$ 2-6ST は pH6.5 よりも高い pH の条件で、それぞれ合成量が増加する傾向を示した。さらに、それぞれの ST の  $K_m$  および  $V_{max}$  値をそれぞれ算出した結果、 $\alpha$ 2-3ST では #3 が、 $\alpha$ 2-6ST では #4 が最も効率よく  $nLc_4Cer$  に対して反応性を示した。

合成した NeuAc  $\alpha$ 2-3 $nLc_4Cer$  (#3 酵素合成物)、NeuAc  $\alpha$ 2-6 $nLc_4Cer$  (#4 酵素合成物) の生理活性を検討するために、リポゾームを用いたインフルエンザ A ウイルス (H3N2) との結合実験を行い、いずれもウイルスと結合性を有す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、 $nLc_4Cer$  以外の様々な系列のスフィンゴ糖脂質を基質に用いて検討を行っている。酵素反応、および酵素合成物の確認は前章と同様の条件、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では本酵素が、長鎖型のネオラクト系スフィンゴ糖脂質である *i*-, *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 ( $Lc_4Cer$ ) に対して反応性を示した。同様に、 $\alpha$ 2-3ST,  $\alpha$ 2-6ST 酵素反応物において合成物が確認され、それぞれ  $\alpha$ 2-3,  $\alpha$ 2-6 結合で NeuAc が結合したガングリオシドが合成された。

ガングリオ系ガングリオシドの合成では、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) に反応性を示した。GA1 では  $\alpha$ 2-3ST,  $\alpha$ 2-6ST それぞれの酵素において、GA2 では  $\alpha$ 2-6ST 酵素において合成が確認された。GA2 から得られた  $\alpha$ 2-6ST 酵素合成物に対して、糖鎖構造を解析した結果、天然には稀な新規のガングリオシド (NeuAc  $\alpha$ 2-6GA2) であることを明らかにした。

新規のガングリオシドである NeuAc  $\alpha$ 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  $\alpha$ 2-3 $nLc_4Cer$  および NeuAc  $\alpha$ 2-6 $nLc_4Cer$  と同様に、インフルエンザ A ウイルスに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手段となる。前章までの結果から、海洋性細菌由来 ST がガングリオシド合成に有用であったことから、本章では動物細胞における海洋性細菌由来 ST の発現系の構築について述べている。また、海洋性細菌由来 ST を発現した細胞株では、導入した ST だけでなく、内在性の糖転移酵素の影響により、ガングリオシドがさらに複雑化することが予測されたことから、導入細胞のガングリオシド解析を迅速かつ簡便に行うための新たな試料調製法について述べている。

動物細胞における発現系の構築において海洋性細菌由来 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。また、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において、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、確立した手法を組織由来の総糖脂質に応用することで、特定の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、本手法が迅速にガングリオシドを MS 分析するための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、海洋性細菌由来の ST が様々なスフィンゴ糖脂質に対して反応性を有することを明らかにした。併せて、本酵素が新規のガングリオシド合成にも適用でき、ガングリオシド合成ツールとしての有用性を確立した。また、動物細胞における発現系の構築とガングリオシド分析のための簡便な試料調製の確立を行い、今後の研究の方向性について述べている。

以上のように申請者は海洋性細菌由来の ST のユニークな性質を用いて試薬として十分に使用可能な数十 mM のスケールで簡便に酵素合成できる系を確立した。更に合成したガングリオシドは生体由来のものと差はなく、A 型インフルエンザウィルスと同等に結合することが示された。このことは海洋性細菌由来の糖転移酵素は ST を初めとして種々の有用な糖脂質ライブラリーを作成できる可能性を示唆している。動物細胞への発現解析はまだ不完全であるが、発現の確立を見据えた取り組みとして発現細胞でのガングリオシド分析のための簡便な試料調製法の工夫も行なっている。

これらの業績は糖鎖化学分野の発展のみならず、広く医学的応用の可能性を含んでいて今後の発展が十分に期待できる。

このことは、本論文の申請者が自立して研究活動を行い、または高度な専門業務に従事するに必要な能力及びその基礎となる豊かな学識を有している事を示すものである。

よって本論文は、博士（工学）の学位を授与されるに値するものと認められる。

以 上

平成26年2月13日