

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

平成 26 年 1 月

日本大学大学院理工学研究科博士後期課程

物質応用化学専攻

上 宮 悠

目次

第1章 序論	1
1.1 ガングリオシドとシアル酸	1
1.2 シアル酸転移酵素	2
1.3 細菌由来シアル酸転移酵素	3
1.4 本研究の目的, および本博士論文の構成	4
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	8
2.1 概要	8
2.2 材料と方法	8
2.3 結果	12
2.4 考察	15
2.5 結論	16
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	24
3.1 概要	24
3.2 材料と方法	24
3.3 結果	26
3.4 考察	30
3.5 結論	31

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.....	41
4.1 概要.....	41
4.2 材料と方法.....	42
4.3 結果.....	45
4.4 考察.....	48
4.5 結論.....	49
第5章 総括.....	57
参考文献.....	61
謝辞.....	69

第1章 序論

1.1 ガングリオシドとシアル酸

ガングリオシドはシアル酸 (Sia) 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る(1). スフィンゴ糖脂質は、疎水性のセラミド部分と親水性の糖鎖部分から構成される両親媒性物質であり (図 1.1), 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. 哺乳動物のセラミドは、一般に炭素数 18 (C18) のスフィンゴシンと呼ばれる長鎖アミノアルコールと C14~26 の脂肪酸から構成されており, 組織や細胞によってそれらの組成分布は異なっている. 一方, 糖鎖はグルコース (Glc) やガラクトース (Gal) などの糖が, α -および β -グリコシド結合で連なった複雑なヘテロ重合体であり, 構成糖や結合様式といった基本糖鎖構造の違いによっていくつかの系列に分類されている. 糖鎖を構成する代表的な糖とその構造を表 1.1 に示す.

シアル酸は α -ケト酸を持つ 9 炭糖の総称であり, 現在までに構造の異なる 50 種類以上のシアル酸が報告されている(2). 哺乳類において見出される代表的なシアル酸は, *N*-アセチルノイラミン酸 (NeuAc) や *N*-グリコリルノイラミン酸 (NeuGc) であり (表 1.1), これらは主に糖鎖の非還元末端に以下に示す結合様式で存在している. すなわち, (I) Gal に α 2-3 結合でシアル酸が結合した「Sia α 2-3Gal」, (II) Gal に α 2-6 結合でシアル酸が結合した「Sia α 2-6Gal」, (III) *N*-アセチルガラクトサミン (GalNAc) に α 2-6 結合でシアル酸が結合した「Sia α 2-6GalNAc」, (IV) シアル酸に α 2-8 結合でさらにシアル酸が結合した「Sia α 2-8Sia」である.

細胞表面においてこれらシアル酸を有する糖鎖は, 細胞間の認識, 細胞の増殖や分化の調節, 細胞のガン化, 神経突起伸長やシナプスの形成, 炎症反応や免疫応答, 細菌やウイルスの感染といった生物学的現象において重要な役割を果たしている(3-8).

インフルエンザウイルスの感染は, シアル酸を有する糖鎖が関与する生物学的現象として, 広く理解されている現象の一つである. インフルエンザ A 型および B 型ウイルスは, ウイルス表層のヘマグルチニン (HA) と宿主細胞表面のシアル酸との結合を介して感染する(9). この時, ウイルスの HA は宿主細胞表面のシアル酸だけでなく, シアル酸の結合様式や分子種の違いを区別して認識することが知られている(9-11). 例えば, トリインフルエンザウイルスやウマインフルエンザウイルスの HA は Sia α 2-3Gal 構造を特異的に認識するが, ヒトインフルエンザウイルスの HA は Sia α 2-6Gal 構造を特異的に認識することが知られている(9). また, ウイルスの HA はシアリルラクト系 I 型糖鎖 (Sia α 2-3/6Gal β 1-3GlcNAc β 1-) およびシアリルラクト系 II 型糖鎖 (Sia α 2-3/6Gal β 1-4GlcNAc β 1-) といった特定の糖鎖構造

に対して、より強い反応性を示すことも明らかとなっている(11). このようなことから、近年ではインフルエンザウイルスの感染阻害を目的として、ウイルスの HA とより強く反応性を示す合成糖鎖ポリマーの調製も試みられており、一定の感染阻害効果が報告されている(12-14).

シアル酸を有する糖鎖と生物学的現象の関連性を示すもう一つの例として、腫瘍抗原として見出されるガングリオシドについて言及する. 近年、いくつかの腫瘍細胞において特定のガングリオシドが特異的に増加している事実が、様々な研究から明らかになっている(3-5). 例えば、悪性腫瘍の一つであるメラノーマは、健常な細胞と比較して、細胞表面に GD3 や GD2 と呼ばれるガングリオシドがより多く存在することが知られている(15-17). 加えて、ガン細胞表面のシアル酸量の増減が、細胞の浸潤能や転移能に大きく影響を与えているという研究結果も報告されていることから、これらのガングリオシドを特異的に認識するモノクローナル抗体 (mAb) を作製し、腫瘍の診断や治療に応用する抗体医薬も盛んに研究されている(18,19).

以上のように、ガングリオシドやシアル酸を有する糖鎖は、細胞の生物学的現象と密接に関与していることが様々な研究から報告されている. しかしながら、これ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非常に多いことやその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く、ガングリオシドやシアル酸を有する糖鎖を安定的に供給することが重要な課題の一つと考えられている.

1.2 シアル酸転移酵素

生体内において糖鎖へのシアル酸付加、および結合様式の多様性を生み出す役割を担っているのは、シアル酸転移酵素 (ST) と呼ばれる糖転移酵素である. 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 NeuAc を転移させる触媒能を有している(20). 哺乳動物においてはヒト、マウスなどの組織、細胞からすでに 20 種類以上の ST 遺伝子が発見・クローニングされ、これらはシアル酸の転移様式から 4 つのファミリーに分類されている(20-27). すなわち、(i) シアル酸を α 2-3 結合で糖鎖の Gal に転移させる「ST3Gal ファミリー」、(ii) シアル酸を α 2-6 結合で糖鎖の Gal に転移させる「ST6Gal ファミリー」、(iii) シアル酸を α 2-6 結合で糖鎖の GalNAc に転移させる「ST6GalNAc ファミリー」、そして (iv) シアル酸を α 2-8 結合で糖鎖のシアル酸にさらに転移させる「ST8Sia ファミリー」である. 動物由来の ST は、生体内では膜結合型タンパク質として存在し、主にトランスゴルジおよびトランスゴルジネ

ットワークに局在している(28,29). 一般に、動物由来の ST は受容体基質特異性が非常に厳密であり、シアル酸を有する糖鎖の多様性は、前述した各種の ST が遺伝子レベルで細かく発現調節を受けながら生合成に関与することで生み出されている. 事実、前述したメラノーマ細胞では、GD3 や GD2 といったガングリオシドの合成に関わる ST 遺伝子の発現レベルが著しく増加していることがすでに明らかとなっている(17). そのため、近年では遺伝子導入法を用いて特定の ST 遺伝子を過剰に発現した細胞株を樹立することで、特定のガングリオシドと生物学的現象の関連性を解明しようとする取り組みも広く行われている.

1.3 細菌由来シアル酸転移酵素

シアル酸転移活性を有するタンパク質 (細菌由来 ST) は、*Campylobacter jejuni* や *Neisseria meningitidis* といったグラム陰性細菌からも見出されている(30-33). 一般に、グラム陰性細菌はその細胞壁外膜にリポ多糖を有しており、シアル酸を有するリポ多糖とガングリオシド糖鎖の分子相同性が、自己免疫疾患を引き起こす引き金とも考えられている(34). ギランバレー・シンドロームは *C. jejuni* の感染を介して引き起こされる自己免疫疾患の一つであり、非自己として認識したシアル酸を有するリポ多糖に対する抗体が、自己のガングリオシドに対しても反応してしまうことで、運動神経や中枢神経に障害をもたらすことが明らかになっている(34,35).

これまでの研究で、*C. jejuni* の類縁菌である *Photobacterium* 属、*Vibrio* 属といった日本海近海に分布するいくつかの海洋性のグラム陰性細菌も、同様に細菌由来 ST 遺伝子を有している事実が明らかとなっている (図 1.2) (36). 組換え酵素として大腸菌で大量に発現させたこれら海洋性細菌由来の ST 群は、オリゴ糖を受容体基質として用いた先行研究の結果から、Gal に α 2-3 結合で NeuAc を転移する α 2-3ST と Gal に α 2-6 結合で NeuAc を転移する α 2-6ST に分類できることが明らかになっている(37). 併せて、これらの研究結果から、海洋性細菌由来 ST が動物由来 ST よりも幅広い受容体基質特異性を有している事実も示されている. 例えば、*Photobacterium damsela* JT0160 株由来の α 2-6ST は、受容体基質としてラクトース (Gal β 1-4Glc) や *N*-アセチルラクトサミン (Gal β 1-4GlcNAc) に対して NeuAc を転移できること、さらには 3'-シアリルラクトース (NeuAc α 2-3Gal β 1-4Glc) や 2'-フコシルラクトース (Fuc α 1-2Gal β 1-4Glc) といったより複雑な糖鎖も、受容体基質として認識できることが明らかになっている(37-39).

以上のように、海洋性細菌由来 ST は従来の哺乳動物由来 ST と異なった性質を有しており、シアル酸を有する様々な糖鎖を合成する有用なツールとなりうることが期待される.

1.4 本研究の目的, および本博士論文の構成

上記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 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検討, および (II) ガングリオシドを過剰に発現した細胞株の樹立を目標とした本酵素遺伝子の動物細胞における発現系の構築を行った.

本研究では, α 2-3ST と α 2-6ST をそれぞれ 3 種類ずつ, 計 6 種類の海洋性細菌由来 ST をそれぞれ用いて研究を行った. 尚, 本研究では便宜上, α 2-3ST である *P. sp.* JT-ISH-224 株由来 ST, *P. phosphoreum* JT-ISH-467 株由来 ST, *V. sp.* JT-FAJ-16 株由来 ST をそれぞれ #1, #2, #3 と記述し, α 2-6ST である *P. sp.* JT-ISH-224 株由来 ST, *P. leiognathi* JT-SHIZ-145 株由来 ST, *P. damsela* JT0160 株由来 ST をそれぞれ #4, #5, #6 と記述することとした. また, 本研究で用いたスフィンゴ糖脂質, およびガングリオシドの構造を表 1.2, 1.3 にそれぞれ示した.

本博士論文では, 第 2 章としてネオラクト系スフィンゴ糖脂質である nLc₄Cer を受容体基質として用いた際のガングリオシド合成, および酵素学的諸性質の検討結果を報告した. 第 3 章では, 様々なガングリオシド合成として, 長鎖型のネオラクト系スフィンゴ糖脂質やラクト系スフィンゴ糖脂質, およびアシアロガングリオ系スフィンゴ糖脂質を受容体基質に用いた際の合成結果について報告した. 第 4 章では, 本酵素遺伝子の動物細胞における発現系の構築と, それら細胞のガングリオシド分析をより迅速に行うための新たな試料調製法について述べた.

表 1.1 糖鎖を構成する代表的な糖

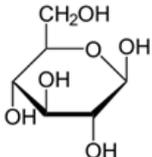
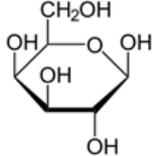
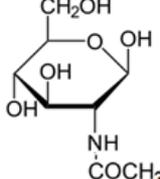
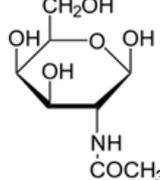
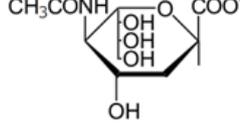
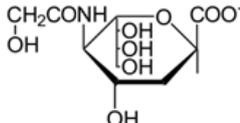
糖	略号	構造
グルコース	Glc	
ガラクトース	Gal	
<i>N</i> -アセチルグルコサミン	GlcNAc	
<i>N</i> -アセチルガラクトサミン	GalNAc	
<i>N</i> -アセチルノイラミン酸	NeuAc	
<i>N</i> -グリコリルノイラミン酸	NeuGc	

表 1.2 本研究で受容体基質に用いたスフィンゴ糖脂質の構造

スフィンゴ糖脂質	構造
nLc4Cer	Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-1'Cer
i-GSL	Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-1'Cer
I-GSL	Gal β 1-4GlcNAc β 1-6 Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-1'Cer Gal β 1-4GlcNAc β 1-3
Lc ₄ Cer	Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-1'Cer
GA1	Gal β 1-4GalNAc β 1-4Gal β 1-4Glc β 1-1'Cer
GA2	GalNAc β 1-4Gal β 1-4Glc β 1-1'Cer

表 1.3 本研究で用いたガングリオシドの構造

ガングリオシド	構造
NeuAc α 2-3nLc4Cer	NeuAc α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-1'Cer
NeuAc α 2-6nLc4Cer	NeuAc α 2-6Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-1'Cer
NeuAc α 2-3 i-GSL(S-i)	NeuAc α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-1'Cer
NeuAc α 2-3 I-GSL(S-I)	NeuAc α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-6 Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-1'Cer NeuAc α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3
GM1a	Gal β 1-4GalNAc β 1-4Gal β 1-4Glc β 1-1'Cer NeuAc α 2-3 [↓]
GM1b	NeuAc α 2-3Gal β 1-4GalNAc β 1-4Gal β 1-4Glc β 1-1'Cer
GM2	GalNAc β 1-4Gal β 1-4Glc β 1-1'Cer NeuAc α 2-3 [↓]
GM3	NeuAc α 2-3Gal β 1-4Glc β 1-1'Cer
GD1a	Gal β 1-4GalNAc β 1-4Gal β 1-4Glc β 1-1'Cer NeuAc α 2-8NeuAc α 2-3 [↓]

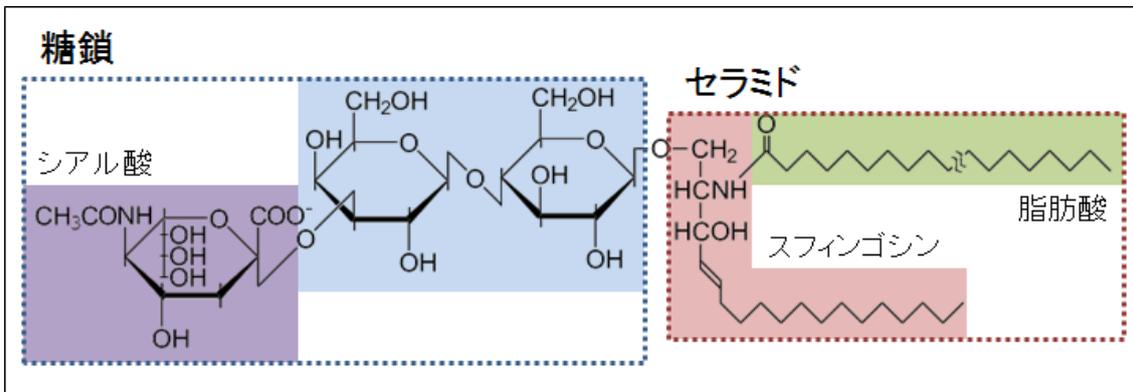


図 1.1 ガングリオシドの構造

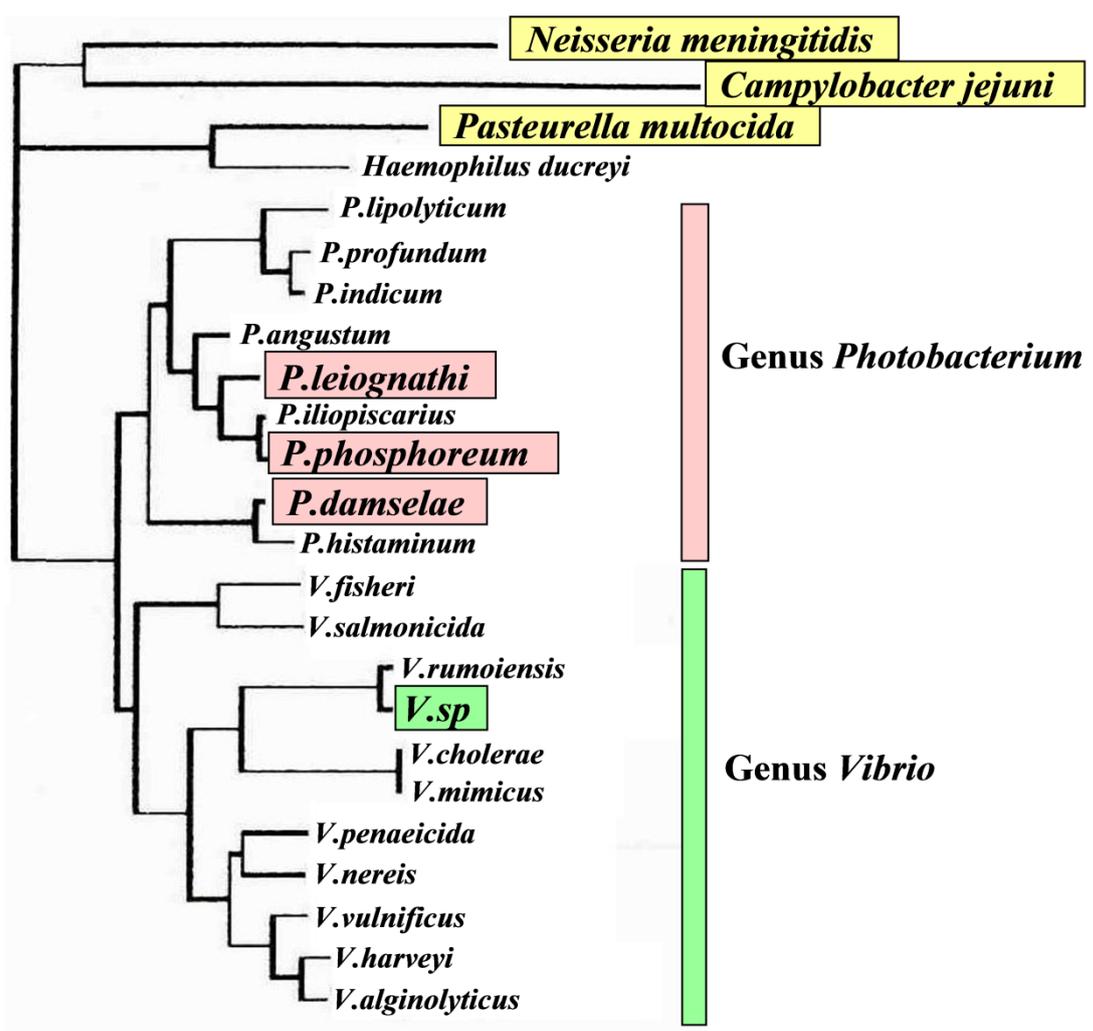


図 1.2 ST 遺伝子を有する海洋性細菌の系統樹

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

2.1 概要

海洋性細菌由来 ST のスフィンゴ糖脂質への反応性を明らかにすることを目的として、生体試料の中でも比較的入手が容易な血液，すなわち赤血球膜上に多く存在し，糖鎖に *N*-アセチルラクトサミン構造を有する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) を受容体基質に用いて研究を行った。 nLc_4Cer の糖鎖末端 Gal にシアル酸が付加したガングリオシドである NeuAc- nLc_4Cer は，インフルエンザウイルスの受容体として機能する有用なガングリオシドの一つである。

結果として， $\alpha 2$ -3ST (#1~3)，および $\alpha 2$ -6ST (#4~6) 全ての酵素反応物において合成物が確認され，各種の機器分析の結果から， $\alpha 2$ -3ST 合成物は nLc_4Cer の糖鎖末端 Gal に $\alpha 2$ -3 結合で NeuAc が結合したガングリオシド (NeuAc $\alpha 2$ -3 nLc_4Cer) であること，また $\alpha 2$ -6ST 合成物は nLc_4Cer の糖鎖末端 Gal に $\alpha 2$ -6 結合で NeuAc が結合したガングリオシド (NeuAc $\alpha 2$ -6 nLc_4Cer) であることをそれぞれ明らかにした。また， nLc_4Cer を受容体基質として用いて，本酵素の酵素学的諸性質の検討を行ったところ，本酵素の至適反応条件が推測でき，より効率的にガングリオシドを合成するための条件の提案を行うことができた。さらに，合成したガングリオシドが天然のガングリオシドと同様の生理活性を有しているかどうかを検討するために，インフルエンザ A ウイルスとの結合実験を行ったところ，合成したガングリオシドはウイルスに対して結合性を示した。このことから，本酵素によって合成したガングリオシドが，天然のガングリオシドと同様の生理活性を有していることが示された(40)。本章ではこれらの結果について記述する。

2.2 材料と方法

2.2.1 材料

nLc_4Cer は当研究室でウシ赤血球膜より調製した。また，NeuAc $\alpha 2$ -3 nLc_4Cer はヒト赤血球膜より，NeuAc $\alpha 2$ -6 nLc_4Cer はヒト胎便よりそれぞれ当研究室で調製されたものを用いた(41)。抗 NeuAc $\alpha 2$ -3 nLc_4Cer モノクローナル抗体 (mAb) である SPS-20 (IgM) は渡来らによって樹立されたものを用いた(42)。CMP-NeuAc は Sigma Ltd. (St. Louis, Mo, USA) より購入したものを用いた。 $\alpha 2$ -3ST である #1 (*P. sp.* JT-ISH-224 株由来 ST)，#2 (*P. phosphoreum* JT-ISH-467 株由来 ST)，#3 (*V. sp.* JT-FAJ-16 株由来 ST)，および $\alpha 2$ -6ST である #4 (*P. sp.* JT-ISH-224 株由来 ST)，#5 (*P. leiognathi* JT-SHIZ-145 株由来 ST)，#6 (*P. damsela* JT0160 株由来 ST) は，

日本たばこ産業株式会社 (JT) 糖鎖ビジネスユニットから提供されたものを用いた。

2.2.2 酵素反応

クロロホルム/メタノール=2:1 (C/M=2:1, v/v) に溶解した 25 μg 分の nLc₄Cer をガラスチューブに移し、風乾した。ここに、333 mM のカコジ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%Triton-X100, 酵素 (0.1 U, 2 μL) からなる 30 μL の反応液を調製し、37°Cで3時間反応を行った。なお、1分間に 1 μmol の NeuAc をラクトースに転移する活性を 1 ユニット (U) とした(37)。反応後、500 μL の純水 (DW) を加え、反応を停止させ、酵素反応溶液とした。

2.2.3 脱塩および脂質画分の回収

酵素反応溶液の脱塩および脂質画分の回収操作は C18 逆相カラムを用いて行った。注射筒の先端に取り付けた Sep-Pak C18 逆相カラム (Waters, Ltd., USA) に酵素反応物を供した後、塩および未反応の CMP-NeuAc を除くために、2 mL の DW を加えてカラムを洗浄した。その後、カラムに 1 mL のメタノールおよび 1mL の C/M=2:1 を加え、脂質画分を溶出させて試験管に回収した。回収した脂質画分を風乾し、酵素反応物とした。

2.2.4 TLC および TLC/免疫染色

本研究では、高性能薄層クロマトグラフィ (HPTLC) ガラスプレートシリカゲル 60 (Merck, Germany) を用いた。予め 80°Cで 30 分間活性化した HPTLC プレートに、C/M=2:1 で溶解した酵素反応物 (5/25 μL) および nLc₄Cer (1 μg), NeuAc α 2-3/6nLc₄Cer (1 μg) を供し、C/M/0.2% 塩化カルシウム水溶液 (60:35:8) にて展開を行った。HPTLC で分離したスフィンゴ糖脂質は、オルシノール硫酸法で発色させ、検出した。また、オルシノール硫酸法で発色させた HPTLC の画像データをスキャナで取り込み、Image J ソフトウェア (National Institutes of Health, USA) で解析することで、酵素合成物の定量を行った。TLC/免疫染色は前述した TLC と同様の方法で展開されたプレートを使用した。HPTLC プレートを 0.02%ポリイソブチルメタクリレート (東京化成工業株式会社) /ヘキサン溶液に 1 分間浸した後に風乾させ、1%ウシ血清アルブミン/リン酸緩衝液 (1%BSA/PBS) を用いて室温で 30 分間インキュベートし、ブロッキング操作を行った。その後、ブロッキング溶液を除くために PBS/0.05%Tween 20 (和光純薬株式会社) で 5 回洗浄操作を行った後、NeuAc α 2-3Gal 糖鎖に対して特異的に

結合する SPS-20 mAb と共に 4°C で一晩反応させた。反応後、PBS/0.05% Tween 20 で洗浄操作を行い、未反応の mAb を除去した後、ヤギ由来のペルオキシダーゼ標識された抗マウス IgM 抗体 (Cappel Laboratories, Inc., USA) を室温で 2 時間反応させた。再度、PBS/0.05% Tween 20 による洗浄操作を行い、未反応の抗マウス IgM 抗体を除去した後、コニカイムノステイン HRP-1000 キット (コニカ株式会社) を用いて抗原抗体反応を可視化し、酵素合成物に対する反応性を確認した。

2.2.5 2 次イオン質量分析法 (SIMS, Secondary Ion Mass Spectrometry), プロトン核磁気共鳴 (¹H-NMR, Nuclear Magnetic Resonance), およびメチル化分析

Taki らの方法(43,44)に従って、HPTLC 上の酵素合成物およびスフィンゴ糖脂質をポリフッ化ビニリデン膜 (PVDF, Polyvinylidene difluoride) (アトー株式会社) に転写した後、それらを SIMS によって分析した。酵素反応物を TLC によって展開し、プリムリン試薬を HPTLC に噴霧後、365 nm の紫外線下で酵素合成物およびスフィンゴ糖脂質を可視化した。この時、鉛筆を用いて検出されたバンドをマークした。その後、HPTLC プレートをイソプロパノール/メタノール/0.2% 塩化カルシウム水溶液 (40:20:7, v/v/v) の中に 20 秒間浸した。ガラスプレートの上に HPTLC プレートを置き、PVDF 膜、ガラスフィルターと重ねた後、180°C のアイロンで 30 秒間ブロットイングを行い、PVDF 膜に転写した。PVDF 膜を水で洗浄後、バンド部分を切り出し、マトリックスとしてトリエタノールアミンを塗布し、プローブチップ上にセットして SIMS による分析を行った。測定は負イオンモードで行った。¹H-NMR は、0.4 mL のジメチルスルホキシド-d₆ (DMSO, Dimethylsulfoxide-d₆) /2% 重水 (D₂O) に溶解した酵素合成物を ¹H-NMR (JNM-ECA500) (日本電子株式会社) を用いて、500 MHz, 25°C の条件で分析した。酵素合成物および受容体基質である nLc₄Cer は、陰イオン交換カラムクロマトグラフィ (DEAE-Sephadex, 酢酸型) (GE-ヘルスケアジャパン株式会社) を用いて酵素反応物よりそれぞれ単離し、試料とした。メチル化分析においても、同様の方法で単離した酵素合成物および nLc₄Cer を試料とした。Ciucanu らの方法(45,46)で酵素合成物を部分メチル化アルジトールアセテート誘導体として調製し、ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC/MS, Gass chromatography mass spectrometry) に供することでメチル化分析を行った。

2.2.6 酵素学的諸性質の検討

ST の酵素学的諸性質の検討として、反応時間、温度、pH、および基質濃度依存性についてそれぞれ酵素条件を変えて ST 活性を測定した。反応時間依存性に関しては、上述した酵

素反応条件にて、反応時間を 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60 (α 2-6ST に関しては加えて 120, 180 分) 分として、それぞれ酵素反応を行った。温度依存性に関しては、上述した酵素反応条件にて、反応温度を 30, 35, 37°C としてそれぞれ酵素反応を行った。pH 依存性に関しては、上述した酵素反応条件に加え、333 mM カコジル酸ナトリウム緩衝液 (pH6.5) の代わりに 333 mM カコジル酸ナトリウム緩衝液 (pH5.0, 7.5) をそれぞれ用いて酵素反応を行った。基質濃度依存性に関しては、上述した酵素反応条件にて、受容体基質である nLc₄Cer の濃度を 0.17, 0.33, 0.50, 0.67, 0.83, 2, 3, 6 μ g/ μ L としてそれぞれ酵素反応を行った。加えて、Lineweaver-Burk のプロットを誘導し、グラフより各酵素の K_m と V_{max} 値をそれぞれ算出した。

2.2.7 インフルエンザ A ウイルス結合実験

本研究では、Sia α 2-3, Sia α 2-6 それぞれに結合性を示すインフルエンザ A ウイルス {A/panama/2007/99 (H3N2)} を用いて、イヌ腎臓上皮細胞由来の細胞株である MDCK 細胞 (Madine-Darby canine kidney) に対する 50%感染量 (TCID₅₀, Median tissue culture infectious) を測定する方法(47)で、ウイルスの細胞に対する感染力を求めた。リポソームは渡来らの方法(48)を参考に、ジミリストイルホスファチジルコリン、コレステロール、ジパルミトイルホスファチジン酸、ガングリオシドが、それぞれ 0.5:0.5:0.05:0.05 (μ mol) の比で調製された脂質混合液から作製されたものを使用した。天然、および合成したガングリオシドを含むリポソームを、ガングリオシド量が 0, 50, 100, 150 μ g となるようにそれぞれ調製し、TCID₅₀ となるように希釈された 100 μ L のウイルス溶液と共に 37°C で 1 時間インキュベートした。インキュベート後、ウイルスの結合したリポソームを除去するために、16000 \times g で 20 分間冷却遠心分離 (4°C) を行い、上清をウイルス溶液とした。このウイルス溶液の感染力を、MDCK 細胞における TCID₅₀ を測定する方法で求めた。ウイルスの MDCK 細胞への感染は、24 穴プレートに単層に培養された MDCK に対して、様々に希釈したウイルス溶液を加え、37°C で 1 時間インキュベートすることで行った。インキュベート後、MDCK 細胞を培地で洗浄してウイルスを除き、さらに 37°C で 3 日間、細胞培養を行った。最終的に、ウイルス感染による MDCK 細胞の細胞変性数を数え、TCID₅₀ となるウイルス溶液の希釈度を求めた。

2.3 結果

2.3.1 海洋性細菌由来 ST によるネオラクト系ガングリオシドの合成

2.3.1.1 酵素反応および TLC による酵素合成物の確認

海洋性細菌由来 ST は、 α 2-3ST として#1 (*P. sp.* JT-ISH-224 株由来 ST), #2 (*P. phosphoreum* JT-ISH-467 株由来 ST), #3 (*V. sp.* JT-FAJ-16 株由来 ST), α 2-6ST として#4 (*P. sp.* JT-ISH-224 株由来 ST), #5 (*P. leiognathi* JT-SHIZ-145 株由来 ST), #6 (*P. damsela* JT0160 株由来 ST) をそれぞれ用いた。受容体基質として、当研究室でウシ赤血球膜より抽出、精製した nLc₄Cer を用いた。酵素反応は上述した条件で行い、酵素反応物は TLC によって分析し、酵素合成物の有無を確認した。結果として、全ての α 2-3ST 酵素反応物、並びに α 2-6ST 酵素反応物において、酵素合成物と思われるバンドが検出された (図 2.1A)。また、これらのバンドは、酵素反応物と合わせて展開した標品の NeuAc α 2-3nLc₄Cer, および NeuAc α 2-6nLc₄Cer よりもやや高い位置にそれぞれ検出された。

2.3.1.2 TLC/免疫染色による酵素合成物の糖鎖構造の予測

渡来らによって樹立された NeuAc α 2-3nLc₄Cer に特異的に結合する SPS-20 mAb (42) を用いて TLC/免疫染色を行った。結果として、SPS-20 は NeuAc α 2-3nLc₄Cer, および α 2-3ST 酵素合成物に対して反応性を示した (図 2.1B)。このことから α 2-3ST 酵素合成物が、nLc₄Cer の糖鎖末端 Gal に α 2-3 結合で NeuAc が結合したガングリオシドであると考えられた。

2.3.1.3 SIMS

TLC 上で分離された受容体基質, α 2-3ST 酵素合成物, α 2-6ST 酵素合成物に対し, それぞれ SIMS 分析を行った。それぞれの分析結果を図 2.2 に示した。尚, α 2-3ST 酵素合成物として#3 酵素反応物を, α 2-6ST 酵素合成物として#4 酵素反応物をそれぞれ用いた。受容体基質である nLc₄Cer のスペクトルにおいては, 脂肪酸組成の異なる主要な分子量関連イオンとして m/z 1309, および 1337 [M-H]⁻ がそれぞれ検出され, また, グリコシド結合が逐次開裂したセラミドを含むイオンとして, m/z 1147, および 1175 [M-H-Gal]⁻, m/z 944, および 972 [M-H-Gal-GlcNAc]⁻ などがそれぞれ検出された (図 2.2A)。一方, 酵素合成物のスペクトルにおいては, 脂肪酸組成の異なる主要な分子量関連イオンとして m/z 1600, および 1628 [M-H]⁻ が, またシアル酸が脱離したイオンと考えられる, m/z 1309, よび 1337 [M-H-NeuAc]⁻ がそれぞれで検出された (図 2.2B, C)。同様の結果が, 各 α 2-3ST 酵素合成物 (#1, 2), および α 2-6ST 酵素合成物 (#5, 6) それぞれにおいても得られたことから, ST によって受容体基

質である nLc₄Cer に NeuAc が転移されたことが示唆された。

2.3.1.4 ¹H-NMR

nLc₄Cer を受容体基質とし、 α 2-3ST として#3 を、 α 2-6ST として#4 をそれぞれ用い、酵素反応を行った。受容体基質およびそれぞれの酵素合成物は C18 逆相カラムによる脱塩、陰イオン交換カラムクロマトグラフィによる操作によって単離し、¹H-NMR 測定を行った (図 2.3)。 α 2-3ST 酵素合成物のアノメリックプロトン領域の解析では、4.18 ppm ($J=8.0$ Hz) (IV), 4.24 ppm ($J=7.4$ Hz) (III), 4.28 ppm ($J=6.7$ Hz) (I), 4.79 ppm ($J=8.0$ Hz) (II) の 4 つのシグナルが得られ、文献との比較によってそれぞれ、 β -Glc (I), β -Gal (II), β -Gal (III), β -GlcNAc (IV) のシグナルと同値であった (図 2.3B)。同様に、 α 2-6ST 酵素合成物のアノメリックプロトン領域の解析においても 4 つのシグナルが得られ、それぞれ β -Glc (I), β -Gal (II), β -Gal (III), β -GlcNAc (IV) のシグナルであると考えられた (図 2.3C)。さらに、NeuAc の 3 位のエクアトリアルシグナルとして、 α 2-3ST 酵素合成物では 2.73 ppm, α 2-6ST 酵素合成物では 2.59 ppm のシグナルが得られ、文献値との比較から、それぞれ Gal の 3/6 位にシアル酸が付加していることが明らかとなった (図 2.3B, C)。また、1.8~1.9 ppm に検出された NeuAc および GlcNAc 由来の *N*-アセチルのシグナル強度の比較から、これらが 1:1 の分子比で存在していた (図 2.3B, C)。

2.3.1.5 メチル化分析

受容体基質およびそれぞれの酵素合成物は、前述の方法にて大量に合成、回収したものをを用いた。GC/MSを用いたメチル化分析の結果を表2.1に示した。 α 2-3ST酵素合成物の分析においては、2,3,6-tri-*O*-methyl-1,4,5-tri-*O*-acetylglucitol (-4Glc1-), 2,4,6-tri-*O*-methyl-1,3,5-tri-*O*-acetylgalactitol (-3Gal1-), 3,6-di-*O*-methyl-1,4,5-tri-*O*-acetyl-2-deoxy-2-*N*-methylacetoamidoglucitol (-4GlcNAc1-)のピークがそれぞれ、1.00:1.78:0.81のモル比で得られた。一方、 α 2-6ST酵素合成物の分析においては2,3,6-tri-*O*-methyl-1,4,5-tri-*O*-acetylglucitol (-4Glc1-), 2,4,6-tri-*O*-methyl-1,3,5-tri-*O*-acetylgalactitol (-3Gal1-), 2,3,4-tri-*O*-methyl-1,5,6-tri-*O*-acetylgalactitol (-6Gal1-), 3,6-di-*O*-methyl-1,4,5-tri-*O*-acetyl-2-deoxy-2-*N*-methylacetoamidoglucitol (-4GlcNAc1-)のピークがそれぞれ、1.00:1.08:0.81:0.75のモル比で得られた。以上の結果から、 α 2-3ST酵素合成物がNeuAc α 2-3nLc₄Cer, α 2-6ST酵素合成物がNeuAc α 2-6nLc₄Cerといったガングリオシドであることが示された。

2.3.2 酵素学的諸性質の検討

2.3.2.1 時間, 温度, pH プロファイル

海洋性細菌由来 ST#1~6 における, 酵素学的諸性質について, nLc₄Cer を受容体基質に用いて検討した. 酵素合成物の定量は, 上述した Image J ソフトウェアを用い, 同 TLC プレート上の濃度既知の標品との比較によって算出した. 結果として, α2-3ST である#1~3 の酵素反応物は, 反応時間の延長とともに酵素合成物量は増加し, 反応時間 30 分以降平衡に達した (図 2.4A). それとは対照的に, α2-6ST である#4~6 の酵素反応物は, 反応時間の延長とともに酵素合成物量も増加し, 30 分以降, 180 分まで検討を行ったが, 平衡化は見られず増加し続けた (図 2.4B). ただし, #5, 6 の合成物に関しては, 反応時間の延長において顕著な増加は観察されなかった. 温度および pH 依存性の検討を行ったところ, α2-3, α2-6ST ともに合成量に大きな差は見られなかった (図 2.5). しかしながら, α2-3ST である#2, 3 酵素反応物において, 37°C よりも低い温度条件で酵素合成物量のわずかな増加が観察されたこと, また, 全ての α2-3ST 酵素反応物において, pH7.5 よりも低い pH 条件で酵素合成物量の増加が観察されたことは, 既報のオリゴ糖を受容体基質に用いた際の結果と類似していた(36, 38, 39). それとは対照的に, α2-6ST である#4~6 酵素反応物においては, 37°C, pH8 という条件で酵素合成物量の増加が観察され, 既報の結果とも一部, 一致していた(49). このことから, α2-3ST は 30°C, pH6.5, α2-6ST は 37°C, pH7.5 付近で高い活性を示す傾向にあることが明らかとなった.

2.3.2.2 反応速度論パラメータ

海洋性細菌由来 ST のメカニズムをさらに検討するために, Lineweaver-Burk のプロットを誘導し, 個々の K_m および V_{max} 値をそれぞれ算出した. それらの結果を表 2.2 に示した. α2-3ST である#1~3 における K_m 値は, 0.430 から 0.940 mM であり, #1 が最も低い K_m 値を有していた. V_{max} 値に関しては, #1 が最も低い値を, #3 が最も高い値を示し, V_{max}/K_m 値においては#3 が最も優れた数値を示した. 一方, α2-6ST である#4~6 においては, #4 が最も低い K_m 値, および最も高い V_{max} 値を示した. 以上の結果から, nLc₄Cer を受容体基質に用いたガングリオシド合成において, α2-3ST としては#3 が, α2-6ST では#4 が最も適した酵素であることを明らかにした. 加えて, 次項の生理活性の検討を行うにあたり, #3, および#4 を用いて大量の酵素反応を行うことで, 数十 mM レベルでのガングリオシド合成も達成した.

2.3.3 インフルエンザ A ウイルス結合実験

海洋性細菌由来 ST によって合成されたガングリオシドが、天然のガングリオシドと同様の生理活性を有しているかどうかを確認するために、ガングリオシドとインフルエンザ A ウイルス (H3N2) の結合実験を行った。その後、インフルエンザ A ウイルスを MDCK 細胞に感染させ、TCID₅₀ を測定することで、ウイルスのガングリオシドに対する結合力を判断した。本研究では、海洋性細菌由来 ST によって合成されたガングリオシドである NeuAcα2-3nLc₄Cer (#3 酵素合成物)、NeuAcα2-6nLc₄Cer (#4 酵素合成物) をそれぞれ用いた。合わせて、天然のガングリオシドである NeuAcα2-3nLc₄Cer, NeuAcα2-6nLc₄Cer, および受容体基質として用いた nLc₄Cer をそれぞれ比較対象として用いた。結果として、天然のガングリオシドである NeuAcα2-3nLc₄Cer, NeuAcα2-6nLc₄Cer は、予想通りインフルエンザ A ウイルスとよく結合し、ガングリオシドの量依存的に TCID₅₀ を減少させた (図 2.6A)。その一方で、受容体基質である nLc₄Cer に関しては、量依存的な TCID₅₀ の減少は観察されなかった。また、合成したガングリオシドである NeuAcα2-3nLc₄Cer, NeuAcα2-6nLc₄Cer も、天然のガングリオシドと同様に、インフルエンザ A ウイルスに対して結合性を示し、量依存的に TCID₅₀ を減少させた (図 2.6B)。これらの結果は、合成したガングリオシドが、天然のガングリオシドと同様にインフルエンザ A ウイルスとの高い結合性を有していることを示している。

2.4 考察

本研究で用いた全ての海洋性細菌由来の ST が、ネオラクト系スフィンゴ糖脂質である nLc₄Cer を受容体基質として認識し、その糖鎖末端 Gal に NeuAc を転移できることが明らかとなった。ネオラクト系スフィンゴ糖脂質の構造的特徴として、糖鎖構造に II 型の N-アセチルラクトサミンを有する点が挙げられるが、本酵素がこの N-アセチルラクトサミン構造を受容体基質として認識している可能性は、すでにオリゴ糖として II 型の N-アセチルラクトサミンを受容体基質に用いた際の先行研究からも強く示唆されていた(37, 29, 37-39)。予想通り、本酵素が nLc₄Cer のようなより長い糖鎖を有するスフィンゴ糖脂質の N-アセチルラクトサミンに対しても反応性を示したことは、本酵素が受容体基質を認識する際、GlcNAc より還元末端側の糖鎖構造を認識していないと推測することができる。

また、図 2.1 の TLC 分析において、標品と酵素合成物の R_f 値が異なっている点については検討を行っていないが、可能性の一つとして、酵素反応物の TLC 分析において、除去しきれなかった界面活性剤の存在が、試料の展開に影響を与えていることが考えられる。事

実、図 2.2A では、 $\alpha 2$ -3ST 酵素反応物のレーンにおいて、界面活性剤と思われるバンドがブリン試薬にて検出されていた。

受容体基質に nLc_4Cer を用いて時間依存性を検討したところ、 $\alpha 2$ -3ST で反応時間 30 分以上、合成量の平衡化が観察された。この点については、原因の一つとしてシアリダーゼ活性の影響が考えられる。シアリダーゼとは糖鎖構造から NeuAc を脱離させる触媒能を有する酵素のことであるが、#1 や #2 といった海洋性細菌由来 ST の一部は、シアル酸転移活性と合わせてシアリダーゼ活性を有していることがすでに明らかになっている(50)。このことから、酵素反応溶液における一定量のガングリオシドの蓄積が、本酵素が有するシアリダーゼ活性を高めている可能性も考えられる。

ガングリオシドとインフルエンザ A ウイルスの結合実験の結果では、合成したガングリオシドである NeuAc $\alpha 2$ -3nLc $_4$ Cer において、天然のガングリオシドよりも低い結合性が示された。この点については、精製度の低さが原因であったと考えられる。本実験では、電子天秤により秤量したガングリオシドを用いて行ったが、特に、 $\alpha 2$ -3ST 酵素合成物は $\alpha 2$ -6ST 酵素合成物よりも一回の反応で得られる合成量が少ないことから、必要量の合成物を確保する際に多量の酵素反応物が必要であった。このことにより、必然的に酵素反応物に含まれる界面活性剤や塩などの試薬量も増加し、それらが一度の精製操作では完全に除去できなかったものと推察される。しかしながら、量依存的にウイルスの TCID $_{50}$ を減少させたこと、NeuAc $\alpha 2$ -6nLc $_4$ Cer においては合成、天然どちらも同程度の結合性を示したことなどを鑑みるに、天然と合成物の生理活性に、大きな違いはないと考えている。

2.5 結論

海洋性細菌由来 ST がネオラクト系スフィンゴ糖脂質である nLc_4Cer に対し反応性を示し、糖鎖末端 Gal にシアル酸を転移できることを明らかにした。併せて、 $\alpha 2$ -3ST、および $\alpha 2$ -6ST を使い分けることで、NeuAc $\alpha 2$ -3nLc $_4$ Cer、NeuAc $\alpha 2$ -6nLc $_4$ Cer といったガングリオシドを合成することも明らかにした。また、酵素学的諸性質の検討から、 $\alpha 2$ -3ST としては #3 が、 $\alpha 2$ -6ST では #4 がそれぞれ NeuAc $\alpha 2$ -3nLc $_4$ Cer、NeuAc $\alpha 2$ -6nLc $_4$ Cer といったガングリオシドを合成する際に、最も適した酵素であるということを明らかとした。さらに、合成したガングリオシドが天然のガングリオシドと同様にインフルエンザ A ウイルスに結合性を示したことから、本酵素によって合成したガングリオシドの糖鎖が、天然の糖鎖と同等の生理活性を有していることを示した。

表 2.1 メチル化分析による酵素合成物の糖組成

構造	モル比	
	#3酵素合成物	#4酵素合成物
2,3,6-tri- <i>O</i> -methyl-1,4,5-tri- <i>O</i> -acetylglucitol (-4Glc1-)	1.00	1.00
2,4,6-tri- <i>O</i> -methyl-1,3,5-tri- <i>O</i> -acetylgalactitol (-3Gal1-)	1.78	1.08
3,6-di- <i>O</i> -methyl-1,4,5-tri- <i>O</i> -acetyl-2-deoxy-2- <i>N</i> -methylacetoamidoglucitol (-4GlcNAc1-)	0.81	0.81
2,3,4-tri- <i>O</i> -methyl-1,5,6-tri- <i>O</i> -acetylgalactitol (-6Gal1-)	—	0.75

表 2.2 反応速度論パラメータ

Enzyme	K_m (mM)	V_{max}	V_{max}/K_m
#1	0.430	2.334	5.428
#2	0.944	5.049	5.349
#3	0.870	6.247	7.180
#4	0.252	1.416	5.619
#5	0.353	0.683	1.935
#6	1.153	0.626	0.543

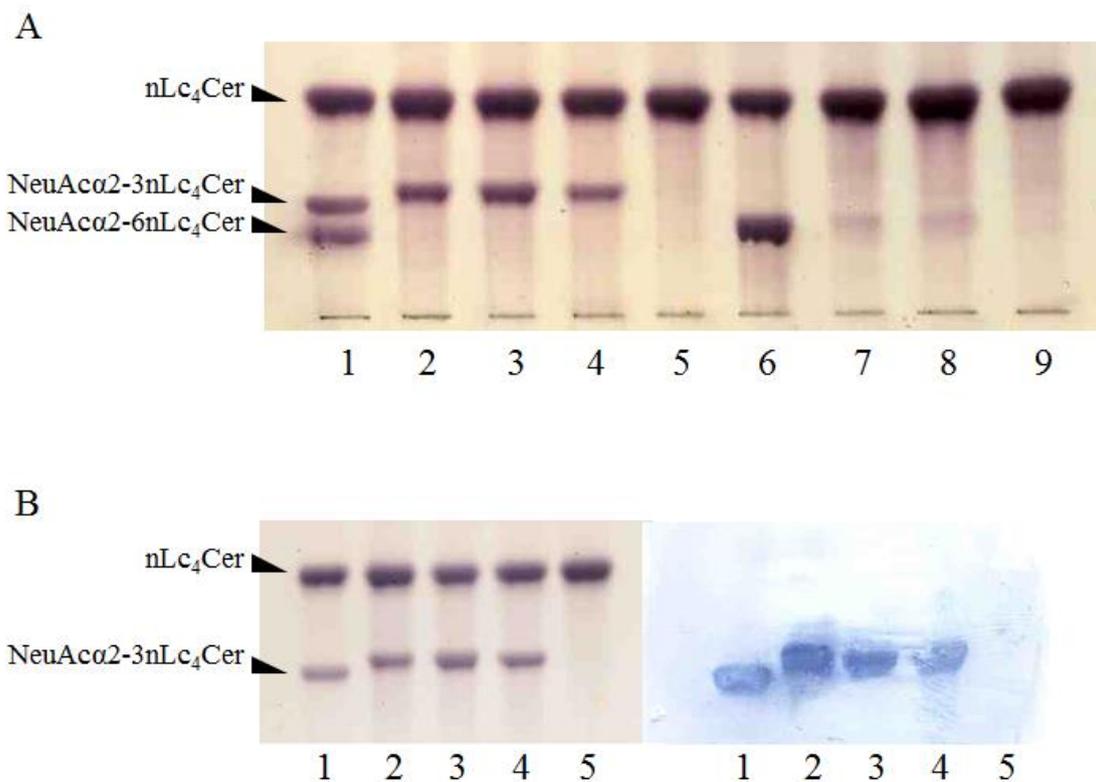


図 2.1 TLC 分析による, nLc₄Cer 酵素反応物における合成物の確認

37°Cで3時間反応を行った後, 酵素反応物から回収した脂質画分の 1/5 量をそれぞれ TLC に供した. (A) TLC 分析の結果. レーン 1, 上からそれぞれ標品の nLc₄Cer, NeuAcα2-3nLc₄Cer, NeuAcα2-6nLc₄Cer; レーン 2, #1 酵素反応物; レーン 3, #2 酵素反応物; レーン 4, #3 酵素反応物; レーン 5, 酵素を加えず反応させたもの; レーン 6, #4 酵素反応物; レーン 7, #5 酵素反応物; レーン 8, #6 酵素反応物; レーン 9, 酵素を加えず反応させたもの. (B) TLC/免疫染色の結果. レーン 1, 上からスタンダードの nLc₄Cer, および NeuAcα2-3nLc₄Cer; レーン 2, #1 酵素反応物; レーン 3, #2 酵素反応物; レーン 4, #3 酵素反応物; レーン 5, 酵素を加えず反応させたもの. 左はオルシノール試薬, 右は SPS-20 抗体を用いた免疫染色の結果.

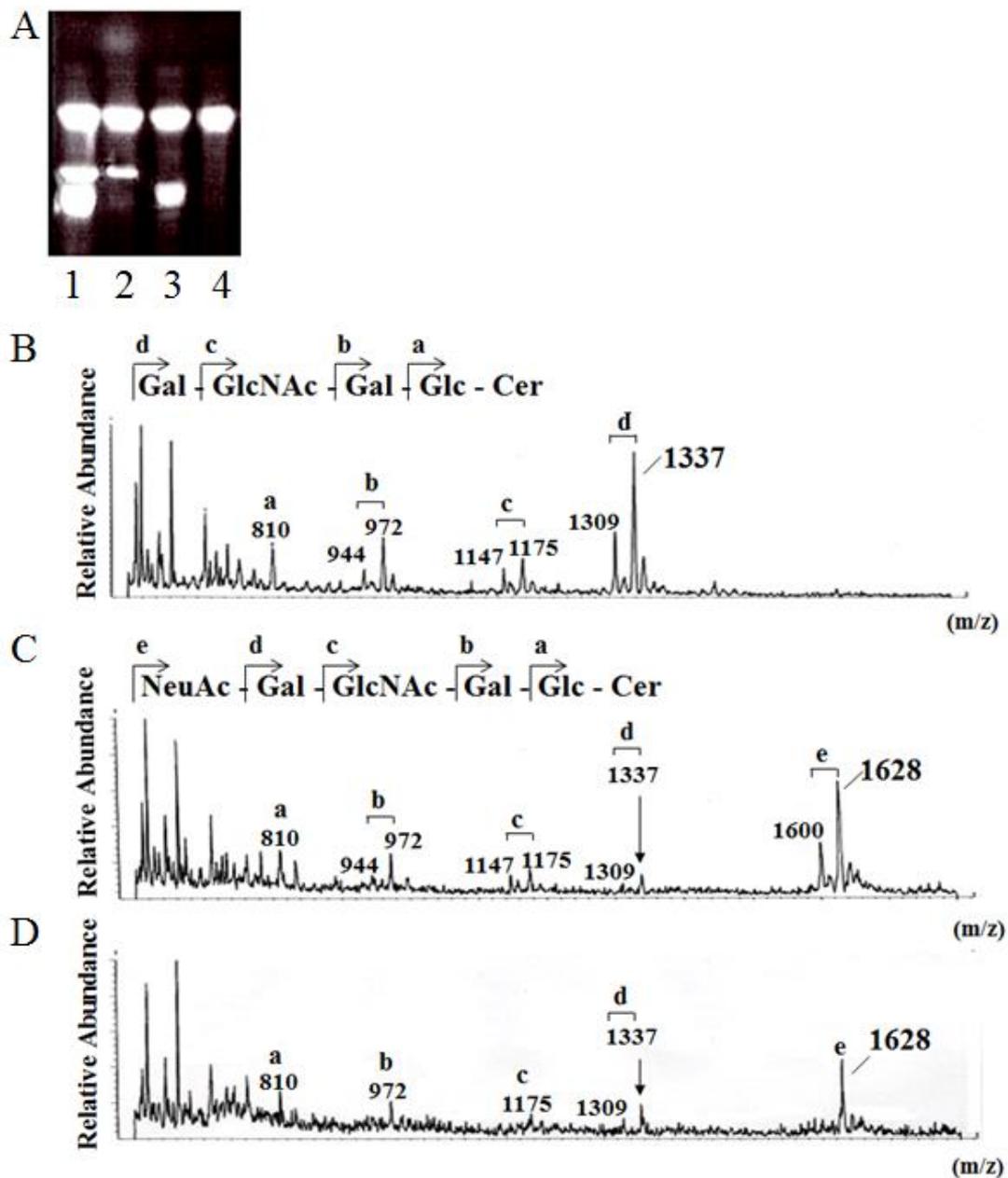


図 2.2 TLC-ブロッキング/SIMS による酵素合成物の分析

(A) プリムリン試薬による酵素合成物の PVDF 膜への転写の確認。レーン 1, スタンドの nLc₄Cer, NeuAc₂-3nLc₄Cer, NeuAc₂-6nLc₄Cer; レーン 2, #3 酵素反応物; レーン 3, #4 酵素反応物; レーン 4, 酵素を加えず反応させたもの。(B) 受容体基質である nLc₄Cer の MS スペクトル。(C) #3 酵素合成物の MS スペクトル。(D) #4 酵素合成物の MS スペクトル。

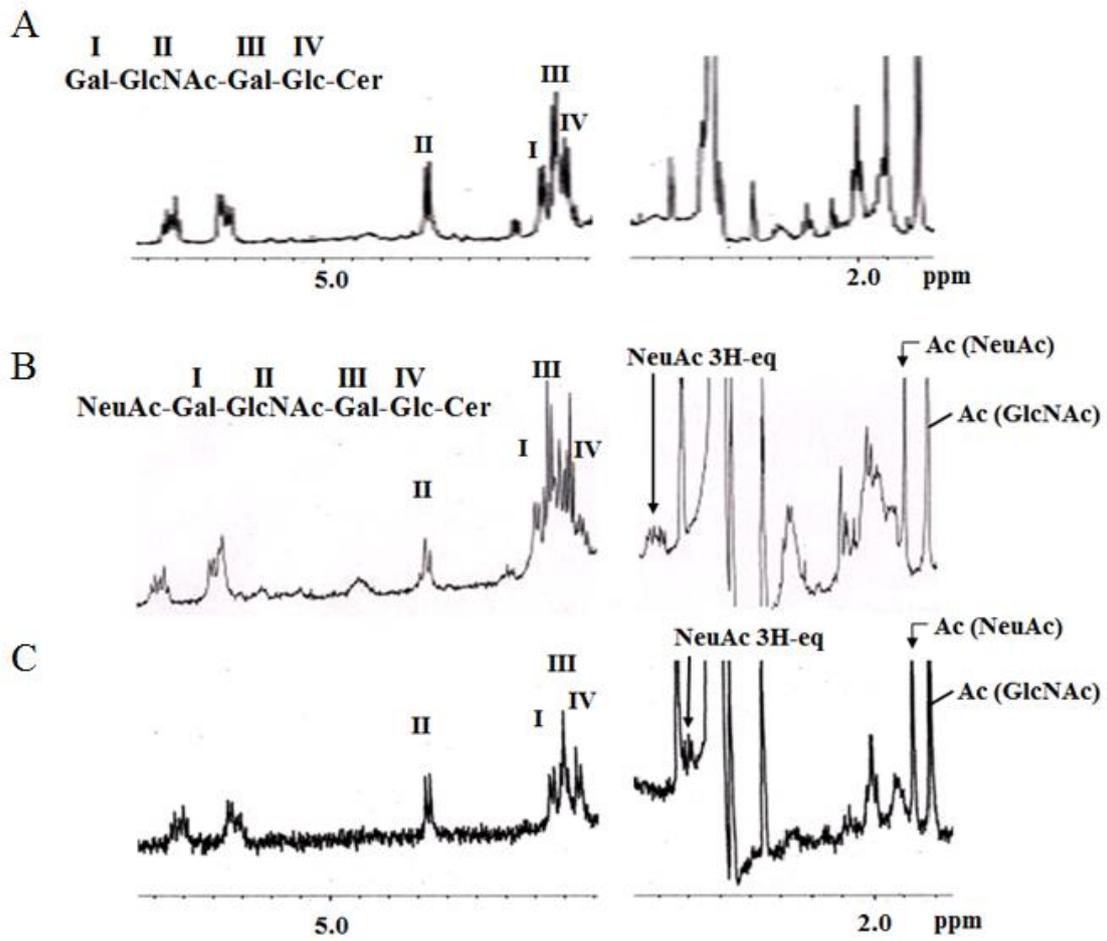


図 2.3 $^1\text{H-NMR}$ による酵素合成物の分析

nLc₄Cer および#3, #4 酵素合成物を C18 逆相カラム, イオン交換カラムクロマトグラフィを用いて精製し, 2% D_2O を含む DMSO-d_6 で置換しサンプルとした. (A) 受容体基質である nLc₄Cer の結果. (B) #3 酵素合成物の結果. (C) #4 酵素合成物の結果.

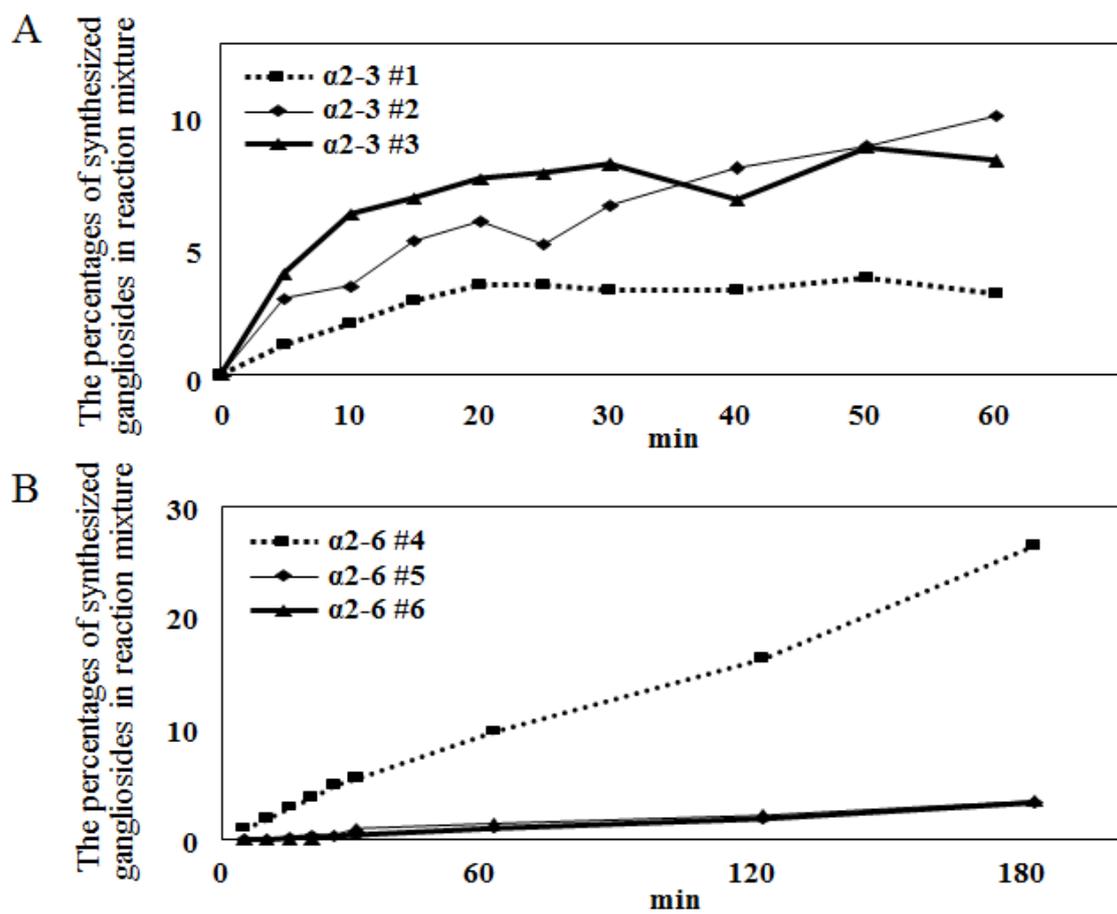


図 2.4 反応時間プロファイル

(A) $\alpha 2$ -3ST である#1~3 における時間依存性の結果. (B) $\alpha 2$ -6ST である#4~6 における時間依存性の結果.

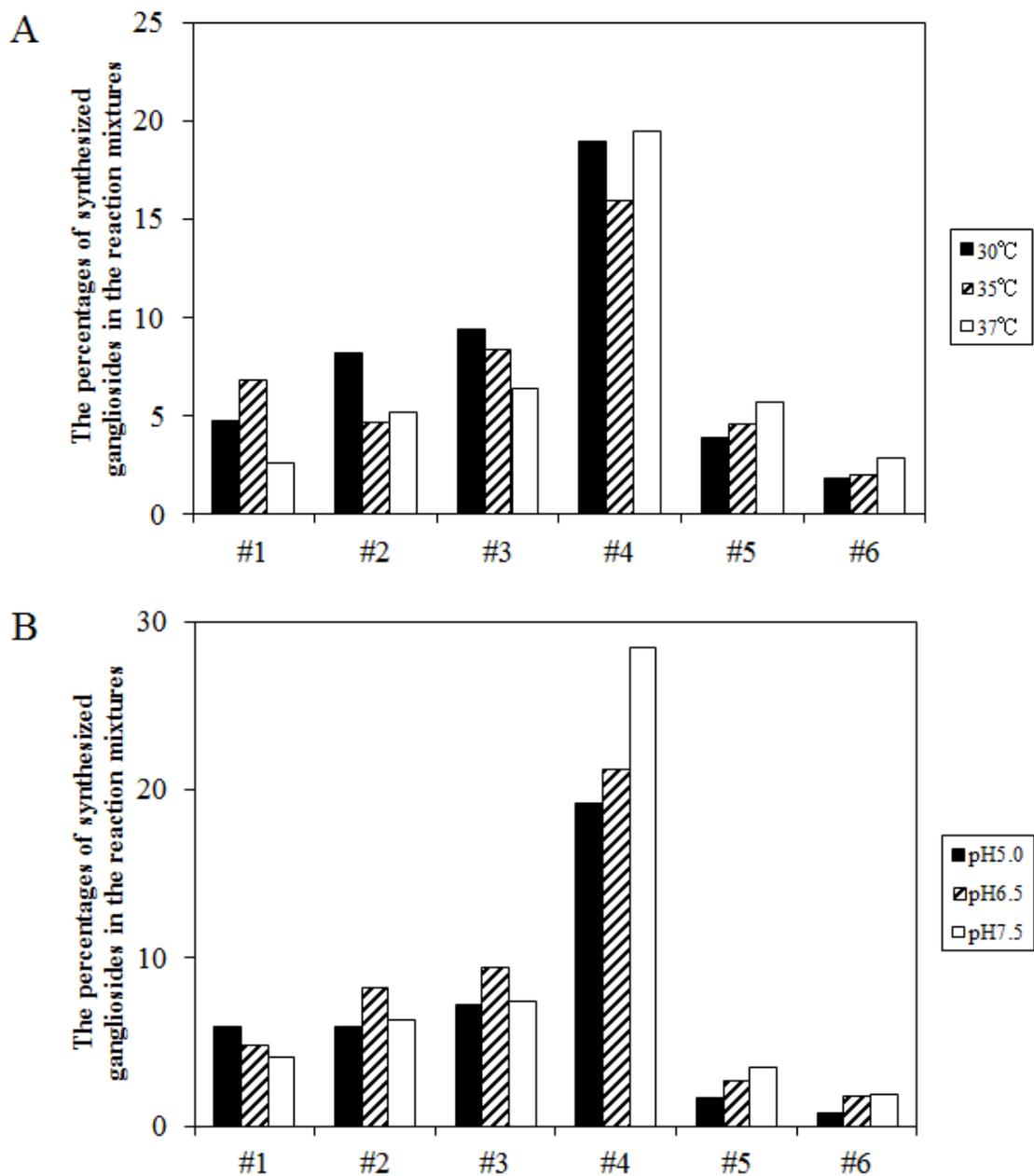


図 2.5 温度および pH プロファイル

(A) 温度依存性の結果. 左から 30°C, 35°C, 37°C の条件で反応させた際の結果を示している. (B) pH 依存性の結果. 左から, pH5.0, pH6.5, pH7.5 の条件で反応させた際の結果を示している.

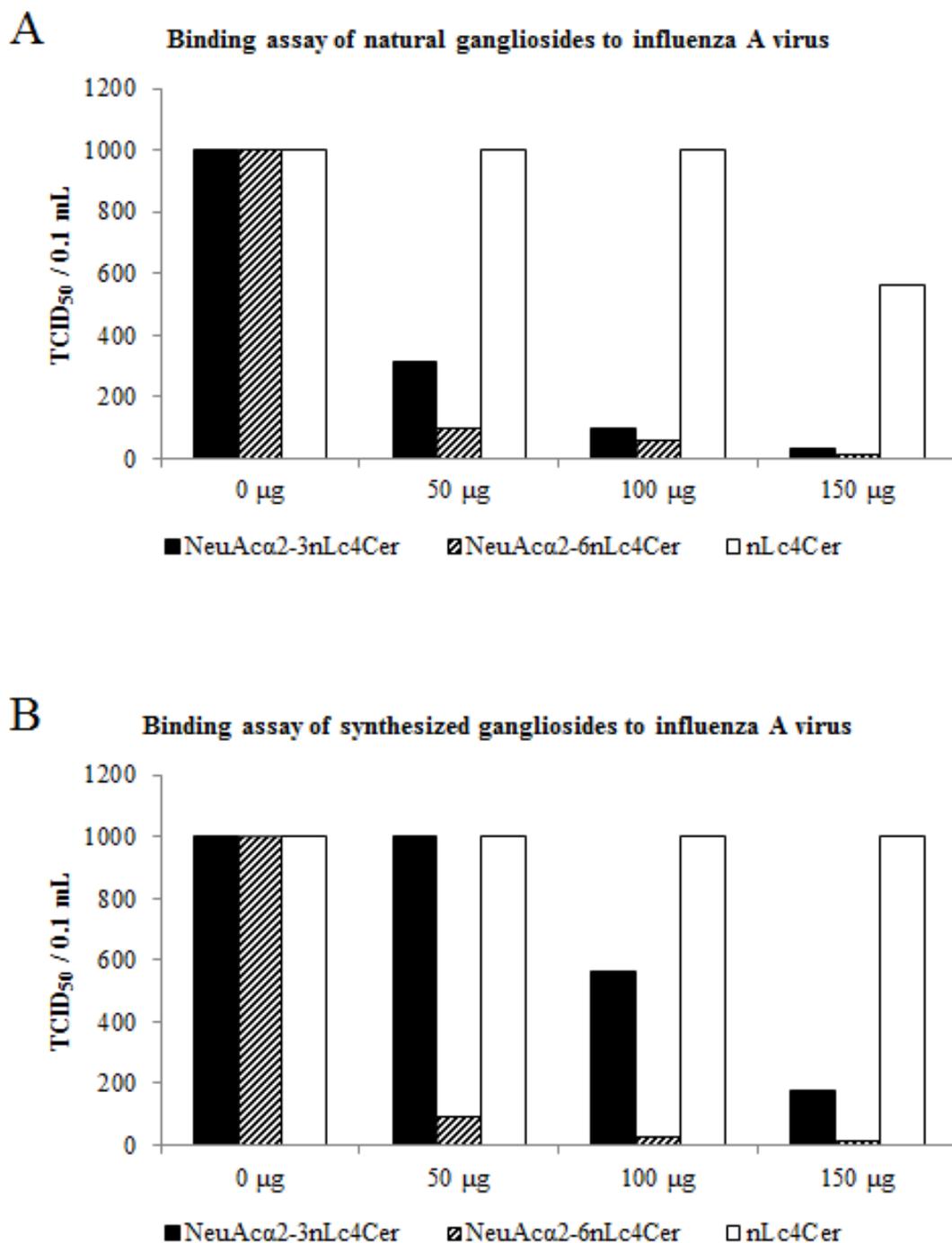


図 2.6 インフルエンザ A ウイルス結合実験

gangliosideを含むリポソームと、TCID₅₀を示すウイルス量に調製したインフルエンザ A ウイルス {A/panama/2007/99 (H3N2)} を 37°C で 1 時間インキュベートした後、MDCK 細胞に再度感染させることで TCID₅₀ の変化量を確認した。(A) 天然の ganglioside とインフルエンザ A ウイルスの結合実験の結果。(B) 合成した ganglioside とインフルエンザ A ウイルスの結合実験の結果。

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

3.1 概要

海洋性細菌由来STのスフィンゴ糖脂質に対する受容体基質特異性を明らかにすることを目的とし、様々な系列のスフィンゴ糖脂質を受容体基質に用いて研究を行った。まず、nLc₄Cerと同様にII型のN-アセチルラクトサミン (Galβ1-4GlcNAc) 構造を糖鎖末端に有しているその他のネオラクト系スフィンゴ糖脂質に対する本酵素の反応性を確認したところ、生合成経路において nLc₄Cer よりも下流に位置する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-GSL), およびイソネオラクトオクタオシルセラミド (I-GSL) を受容体基質に用いた際に、α2-3ST, および α2-6ST それぞれの ST 酵素反応物において合成物が得られることが明らかとなった。加えて、I型のN-アセチルラクトサミン (Galβ1-3GlcNAc) 構造を糖鎖末端に有する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) を受容体基質として用いて酵素反応を行った際にも、α2-3ST, α2-6ST それぞれの酵素反応物において合成物が確認された。また、ガングリオシドの中でもとりわけ生物学的現象との関連性が多く報告されているガングリオ系ガングリオシドのアシアロ (脱シアル化) 型であるガングリオテトラオシルセラミド (GA1) やガングリオトリオシルセラミド (GA2) を受容体基質として用いた際にも、酵素合成物が得られることが明らかとなった。GA1 を受容体基質として用いた際には α2-3ST, および α2-6ST それぞれの酵素反応物において、GA2 を受容体基質として用いた際には α2-6ST 酵素反応物において、合成物が確認された(51)。尚、GA1 および GA2 を受容体基質として用いた際の α2-6ST 酵素合成物は、ともに天然には存在が確認されていないガングリオシドである。本章では、これらの合成結果について報告するとともに、結果から予測される本酵素のスフィンゴ糖脂質に対する受容体基質特異性についての考察を述べる。併せて、合成された新規のガングリオシドの生理活性を検討する目的で行ったインフルエンザ A ウイルスの結合実験の結果についても報告する。

3.2 材料と方法

3.2.1 材料

i-スフィンゴ糖脂質およびI-スフィンゴ糖脂質は、当研究室でウシ赤血球膜より調製された NeuAcα2-3nLc₆Cer (S-i) および NeuAcα2-3nL₈Cer (S-I) を *Clostridium perfringens* 由来のシアリダーゼ (SIGMA Ltd., St. Louis, Mo, USA) 処理することによって調製した。GM3, NeuAcα2-3nLc₄Cer, NeuGca2-3i-GSL (S-i), NeuGca2-3I-GSL (S-I) は日本赤十字センター

の協力のもとヒト赤血球膜より精製されたものを, GM2, GM1a, GD1a, GD1b はウシ脳から精製されたものをそれぞれ用いた(52). また GA1 は GM1a を酢酸処理したものを使用した(53). GA2 に関しては元日本大学医学部准教授の大和田操先生より供与して頂いた. 抗 NeuAca2-3nLc₄Cer mAb である SPS-20(IgM) は渡来らによって樹立されたものを用いた(42). 抗 NeuAca2-6nLc₄Cer mAb である MFH-1 (IgM) は当研究室で樹立したもの(54)を, 抗 GM1b mAb である GG51 (IgG) は, 東京医学総合研究所の小倉潔博士より供与して頂いたもの(55)をそれぞれ用いた.

3.2.2 酵素反応および酵素反応溶液からの脂質画分の回収

酵素反応は, これまでと同様に, C/M=2:1 に溶解した 25 µg 分の各スフィンゴ糖脂質をガラスチューブに移し, 風乾した後, 2.2.2 に示した酵素反応液を用いて, 30°C で 3 時間反応させた. 酵素反応後, 500 µL の純水 (DW) を加えることで反応を停止させ, 酵素反応溶液とした. 酵素反応溶液は, 2.2.3 に示した方法で脱塩および脂質画分の回収を行い, 酵素反応物とした.

3.2.3 TLC および TLC/免疫染色

酵素反応物の TLC は, これまで同様に HPTLC プレートを用い, 2.2.4 に示した手順で行った. 尚, 本研究では, 展開溶媒として C/M/0.2%塩化カルシウム水溶液 (60:35:8), および C/M/0.2%塩化カルシウム水溶液 (55:45:10) を用いて展開を行った. TLC/免疫染色についても, 2.2.4 に示した手順で行った. 尚, 抗 GM1b mAb である GG51 (IgG) を用いた TLC/免疫染色においては, ヤギ由来のペルオキシダーゼ標識された抗マウス IgG 抗体 (Cappel Laboratories, Inc., USA) を用いて行った.

3.2.4 SIMS, マトリックス支援レーザー脱離イオン化/飛行時間型質量分析計 (MALDI-TOF/MS), およびメチル化分析

SIMS による酵素合成物の分析は, 2.2.5 に示した方法で行った. MALDI-TOF/MS 分析は, autoflex TOF/TOF (Bruker Daltonics, MA) を用いて行った. MALDI-TOF MS スペクトルの補正は, 1 pmol µL⁻¹ に調製した Bradykinin ([M+H]⁺, 757.40) とヒト adrenocorticotrophic hormone (ACTH, fragments 18-39) ([M+H]⁺, 2465.20) を用いて行った. マトリックス溶液は水で 10 mg mL⁻¹ に調製した 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB) を用いた. スフィンゴ糖脂質は C/M=2:1 で 100 pmolµL⁻¹ に調製し, マトリックス溶液と 1:1 で混合した後にターゲットプレート

に供し、冷風を吹き付けて結晶化させた。メチル化分析は 2.2.5 に示した方法で行った。

3.2.5 インフルエンザ A ウイルス結合実験

ガングリオシドとインフルエンザ A ウイルスの結合実験は、2.2.7 に示した方法で行った。

3.3 結果

3.3.1 海洋性細菌由来 ST による長鎖型ネオラクト系ガングリオシドの合成

3.3.1.1 酵素反応および TLC による酵素合成物の確認

前章において、 α 2-3ST では#3 (*V. sp.* JT-FAJ-16 株由来 ST) が、 α 2-6ST では#4 (*P. sp.* JT-ISH-224 株由来 ST) が、nLc₄Cer に対して最も高い V_{max}/K_m 値をそれぞれ示すことが明らかとなったことから、本項では α 2-3ST として#3 を、 α 2-6ST として#4 を用いて研究を行った。N-アセチルラクトサミン構造を糖鎖末端に有しているその他のネオラクト系スフィンゴ糖脂質に対する本酵素の反応性を確認するために、i-GSL、I-GSL を受容体基質に用いて酵素反応を行った。結果として、 α 2-3ST、 α 2-6ST は、i-GSL、I-GSL それぞれに対しても反応性を示し、TLC 上で酵素合成物が確認された (図 3.1A, B)。図 3.1A は i-GSL を受容体基質として用いた際の TLC 分析の結果を表している。 α 2-3ST によって合成された酵素合成物は、TLC 上で S-i と近い位置にバンドが確認された一方で、 α 2-6ST によって合成された i-GSL における酵素合成物は、TLC 上で S-i と S-I の間にバンドが確認された。図 3.1B は I-GSL を受容体基質として用いた際の TLC 分析の結果を表している。I-GSL を受容体基質に用いた際の酵素反応物に関しては、TLC 上でそれぞれ 2 つの酵素合成物と思われるバンドが検出された (図 3.1B の矢印)。 α 2-3ST 酵素反応物において確認された 2 つのバンドのうち、下のバンドが S-I と近い R_f 値を示したことから、上のバンドは NeuAc が 1 分子付加したモノシアログングリオシドであることが予測された。一方、 α 2-6ST 酵素反応物においては、これまで同様、 α 2-3ST 酵素合成物よりもさらに低い位置にそれぞれ合成物が見られた。

また、海洋性細菌由来 ST が、Gal と GlcNAc が β 1-4 結合した II 型の N-アセチルラクトサミン (Gal β 1-4GlcNAc) だけでなく、Gal と GlcNAc が β 1-3 結合した I 型の N-アセチルラクトサミン (Gal β 1-3GlcNAc) に対しても NeuAc を転移できるどうかを確認するために、ラクト系スフィンゴ糖脂質である Lc₄Cer を受容体基質に用いて酵素反応を行ったところ、 α 2-3、 α 2-6ST 酵素反応物の両方で酵素合成物が確認された (図 3.1C)。

これらの酵素合成物の糖鎖構造を同定するために、SPS-20 および MFH-1 をそれぞれ用いて TLC/免疫染色を行ったところ、これらの抗体は i-GSL を受容体基質として用いた際の

α 2-3, α 2-6ST 酵素合成物に対してそれぞれ反応性を示した (図 3.1D, E). SPS-20 はこれまで報告されている通り, スタンダードとして展開した TLC 上の NeuAc α 2-3nLc₄Cer だけでなく, S-i にも反応性を示した. 合わせて, α 2-3ST 酵素合成物に対しても反応性を示したことから, TLC 上で確認された合成物が S-i と同じ糖鎖構造を有していることが示唆された (図 3.1D). MFH-1 は NeuAc α 2-6nLc₄Cer に対して反応性を示す抗体であるが, スタンダードとして展開した NeuAc α 2-6nLc₄Cer だけでなく, α 2-6ST 酵素合成物に対しても反応性を示した (図 3.1E). このことから, TLC 上で確認された合成物が, i-GSL の糖鎖末端 Gal に α 2-6 結合で NeuAc が結合したガングリオシドであることが示唆された.

3.3.1.2 MALDI-TOF MS

i-GSL を受容体基質として用いた際に得られた α 2-3, α 2-6ST 酵素合成物に対し, MALDI-TOF/MS による分析を行った (図 3.2). 受容体基質である i-GSL は陽イオンモードで, また α 2-3ST, α 2-6ST 酵素合成物は負イオンモードでそれぞれ測定を行った. 結果として, i-GSL のスペクトルにおいては, 脂肪酸組成の異なる主要な分子量関連イオンとして m/z 1726, および 1698 $[M+Na]^+$ の 2 つが検出された (図 3.2A). α 2-3ST, α 2-6ST 酵素合成物のスペクトルにおいては, 脂肪酸組成の異なる主要な分子量関連イオンとして m/z 1993, 1965 $[M-H]^-$ の 2 つがそれぞれ検出されたことから, これら酵素合成物が, i-GSL に NeuAc が 1 分子付加した構造を有していることが示唆された (図 3.2B, C). i-GSL および Lc₄Cer を受容体基質として用いた際に得られた酵素合成物に関しては, 受容体基質量の不足により詳細な化学的同定は不可能であった.

3.3.2 海洋性細菌由来 ST によるガングリオ系ガングリオシドの合成

3.3.2.1 酵素反応および TLC による酵素合成物の確認

海洋性細菌由来 ST が, N-アセチルラクタサミン構造以外の糖鎖に対しても NeuAc を転移できるかどうかを検討するために, 様々なスフィンゴ糖脂質を受容体基質に用いて酵素反応を行ったところ, アシアロガングリオ系スフィンゴ糖脂質である GA1 および GA2 酵素反応物において, 酵素合成物と思われるバンドが TLC 上で新たに確認された. GA1 および GA2 酵素反応物の TLC 分析の結果を図 3.3 に示した. GA1 を受容体基質に用いた際の TLC 分析では, 全ての α 2-3ST (#1~3), α 2-6ST (#4~6) 酵素反応物において合成物が確認された (図 3.3A). TLC 分析において, α 2-3ST 酵素反応物において確認された合成物は, スタンダードとして展開した GM1a よりやや低い位置にバンドが確認された一方で, α 2-6ST 酵

素反応物において確認された合成物はそれよりもさらに低い位置にバンドが確認された。GA2 を受容体基質に用いた際の TLC 分析では、 $\alpha 2$ -6ST (#4~6) 酵素反応物においてのみ、合成物が確認された (図 3.3B)。これらの合成物は、TLC 分析においてスタンダードとして展開した GM2 よりもさらに低い位置にバンドが確認された。このことから、 $\alpha 2$ -3ST によって得られた GA1 酵素合成物は $\alpha 2$ -3 結合で NeuAc が結合したガングリオシド (S2-3GA1)、 $\alpha 2$ -6ST によって得られた GA1 および GA2 酵素合成物は $\alpha 2$ -6 結合で NeuAc が結合したガングリオシド (S2-6GA1, S2-6GA2) であることが示唆された。尚、 $\alpha 2$ -6ST 反応物において確認されたこれらの合成物は、天然には存在が確認されていないガングリオシドである。

3.3.2.2 SIMS

GA1 および GA2 を受容体基質に用いて酵素反応を行った際に得られた合成物の糖鎖構造を推測するために、TLC ブロッキングによる SIMS 分析を行った。本分析においては、 $\alpha 2$ -3ST 酵素合成物として#3 由来のものを、 $\alpha 2$ -6ST 酵素合成物として#4 由来のものをそれぞれ TLC で展開し、PVDF 膜に転写した。GA1 酵素反応物における SIMS 分析の結果を図 3.4 に示した。受容体基質である GA1 の MS スペクトルにおいては、主要な分子量関連イオンとして m/z 1253.8, および 1281.7 [M-H] の 2 つが、またグリコシド結合が逐次開裂したセラミドを含むイオンとして、 m/z 1091.8, および 1119.6 [M-H-Gal], m/z 888.5, および 916.4 [M-H-Gal-GalNAc] がそれぞれ検出された (図 3.4A)。一方、 $\alpha 2$ -3, $\alpha 2$ -6ST 酵素合成物の MS スペクトルにおいては、主要な分子量関連イオンとして m/z 1545.7, および 1573.7 [M-H] の 2 つが、またシアル酸が脱離した派生イオンと考えられる m/z 1253.8, および 1281.7 [M-H-NeuAc] がそれぞれで検出された (図 3.4B, C)。このことから、これらの合成物が、GA1 に 1 分子の NeuAc が付加したガングリオシドであることが示唆された。

同様に、GA2 酵素反応物に対しても SIMS による分析を行ったところ (図 3.5)、受容体基質である GA2 の MS スペクトルにおいて、主要な分子量関連イオンとして m/z 1065.6, 1093.5, 1121.7, および 1175.8 [M-H] の 4 つが検出された一方で、 $\alpha 2$ -6ST 酵素合成物の MS スペクトルにおいては、 m/z 1385.5, 1413.7, および 1467.8 [M-H] といった 1 分子の NeuAc 相当の質量数増加が確認された。このことから、この合成物もまた、NeuAc が 1 分子付加したガングリオシドであることが示唆された。

3.3.2.3 TLC/免疫染色

GM1b に特異的に結合する GG51 mAb を用いて、GA1 を受容体基質に用いた際に確認さ

れた α 2-3ST 酵素合成物に対し、TLC/免疫染色を行った。結果として、GG51 はスタンダードとして展開した GM1b だけでなく、 α 2-3ST 酵素反応物に対しても同様の反応性を示した (図 3.6)。このことから、GA1 を受容体基質に用いた際に確認された α 2-3ST 酵素合成物が GM1b と同じ糖鎖構造、すなわち GA1 の糖鎖末端に α 2-3 結合で NeuAc が結合した糖鎖構造を有していることが示唆された。

3.3.2.4 メチル化分析

GA2酵素合成物の糖鎖構造を明らかにするために、GC/MSを用いてメチル化分析を行った。その結果を図3.7に示した。部分メチル化アルジトールアセテート誘導体化 (PMAA) したGA2, GM2, および α 2-6ST酵素合成物のトータルイオンクロマトグラム (TIC) を図3.7 A~Cに示した。受容体基質であるGA2のTICでは、2,3,6-tri- *O* -methyl-1,4,5-tri- *O* -acetylglucitol (-4Glc1-) , 2,3,6-tri- *O* -methyl-1,4,5-tri- *O* -acetylgalactitol (-4Gal1-) , 3,4,6-tri- *O* -methyl-1,5-di- *O* -acetyl-2-deoxy-2- *N* -methylacetoamidogalactitol (terminal GalNAc) のピークがおよそ等モル比で検出された (図3.7A)。また、スタンダードのGM2のTICでは、2,3,6-tri- *O* -methyl-1,4,5-tri- *O* -acetylglucitol (-4Glc1-) , 2,6-tri- *O* -methyl-1,3,4,5-tri- *O* -acetylgalactitol (-3.4Gal1-) , 3,4,6-tri- *O* -methyl-1,5-tri- *O* -acetyl-2-deoxy-2- *N* -methylacetoamidogalactitol (terminal GalNAc) といったピークが検出された (図3.7B)。これらの結果とは対照的に、 α 2-6ST酵素合成物のTICにおいては、2,6-tri- *O* -methyl-1,3,4,5-tri- *O* -acetylglucitol (-4Glc1-) , 2,3,6-tri- *O* -methyl-1,4,5-tri- *O* -acetylgalactitol (-4Gal1-) , そして19.2分に新たなピークが検出された (図3.7C)。このピークのMSスペクトルにおいて、ヘキソサミン誘導体に特異的に検出されるm/z 116のフラグメントイオンが検出されたことから (図3.7D) , このピークがGalNAcに関連するピークであることが予測された。また、GA2, GM2, および α 2-6ST酵素合成物のTICの比較から、 α 2-6ST酵素合成物が、GalNAcにNeuAcを有したガングリオシド (NeuAc α 2-6GA2) であることを明らかとした。

3.3.2.5 インフルエンザ A ウイルス結合実験

本章で合成が確認された NeuAc α 2-6GA2 が有する生理活性を検討するために、リポソーム法を用いてインフルエンザ A ウイルスとの結合実験を行った (図 3.8)。比較対象としては天然のガングリオシドである NeuAc α 2-3nLc₄Cer, NeuAc α 2-6nLc₄Cer, および受容体基質である GA2 を用いた。結果として、NeuAc α 2-3nLc₄Cer, NeuAc α 2-6nLc₄Cer が量依存的にウイルスの TCID₅₀ を減少させた一方で、GA2 に関してはその傾向は見られなかった。興味深

いことに、NeuAc α 2-6GA2 は天然のガングリオシド同様にウイルスの TCID₅₀ を顕著に減少させた。このことから、合成した新規の NeuAc2-6GA2 がインフルエンザ A ウイルスと高い結合性を有していることを示した。

3.4 考察

海洋性細菌由来 ST は、*N*-アセチルラクトサミン構造を有する長鎖型ネオラクト系スフィンゴ糖脂質、およびラクト系スフィンゴ糖脂質を受容体基質に用いた際にも反応性を示し、酵素合成物が得られることが明らかとなった。これら合成物の化学的同定は、受容体基質量の不足から行うことはできなかったが、前章の結果、および *i*-GSL 酵素合成物における TLC/免疫染色や MALDI-TOF MS の結果から推測するのに、それぞれ糖鎖末端 Gal に 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が考えられる。

興味深いことに、*I*-GSL を受容体基質に用いた際には、TLC 上で 2 つの合成物と思われるバンドがそれぞれ検出された (図 3.1B)。このことは、本酵素が *I*-GSL の分岐した 2 つの *N*-アセチルラクトサミン糖鎖のどちらか一方、あるいはその両方に NeuAc を転移できることを示唆している。さらに、 α 2-6ST である #4 酵素反応物の TLC 分析においては、受容体基質量の著しい減少が観察されたことから、本酵素が *N*-アセチルラクトサミン構造に対して高い反応性を有していることが考えられる (図 3.1B, レーン 4)。

海洋性細菌由来 ST は、*N*-アセチルラクトサミン構造を有するネオラクト系、ラクト系スフィンゴ糖脂質だけでなく、アシアロガングリオ系スフィンゴ糖脂質に対しても NeuAc を転移できることが明らかとなった。本酵素の幅広い受容体基質特異性は、オリゴ糖を用いたこれまでの研究によっても示されていたが、Gal β 1-4GalNAc 構造に対して NeuAc を転移できるという事実は、本研究によって初めて明らかになったことである。また、興味深い点として、 α 2-6ST によって合成された NeuAc α 2-6GA1 および NeuAc α 2-6GA2 が、天然には存在が確認されていないガングリオシドであるという点が挙げられる。NeuAc α 2-6GA2 を用いたインフルエンザ A ウイルスの結合実験の結果では、このガングリオシドがウイルスのヘマグルチニンと結合性を有することも示されたことから、ガングリオシド合成ツールとして、有用な生理活性を有する非天然系ガングリオシドの合成にも本酵素を応用できることが期待される。以上のことから、海洋性細菌由来 ST は、ガングリオシド合成ツールとしての有用性を十分に持ち合わせていると考えられる。

3.5 結論

海洋性細菌由来 ST は、*N*-アセチルラクトサミン構造を有するネオラクト系スフィンゴ糖脂質やラクト系スフィンゴ糖脂質だけでなく、Gal β 1-4GalNAc 構造や GalNAc を有するアシアロガングリオ系スフィンゴ糖脂質に対しても NeuAc を転移できる事実を明らかにした。加えて、海洋性細菌由来 α 2-6ST が天然には存在しないガングリオシドを合成できることが示唆されたことから、本酵素のガングリオシド合成ツールとしての有用性をさらに示すことができたと考えている。

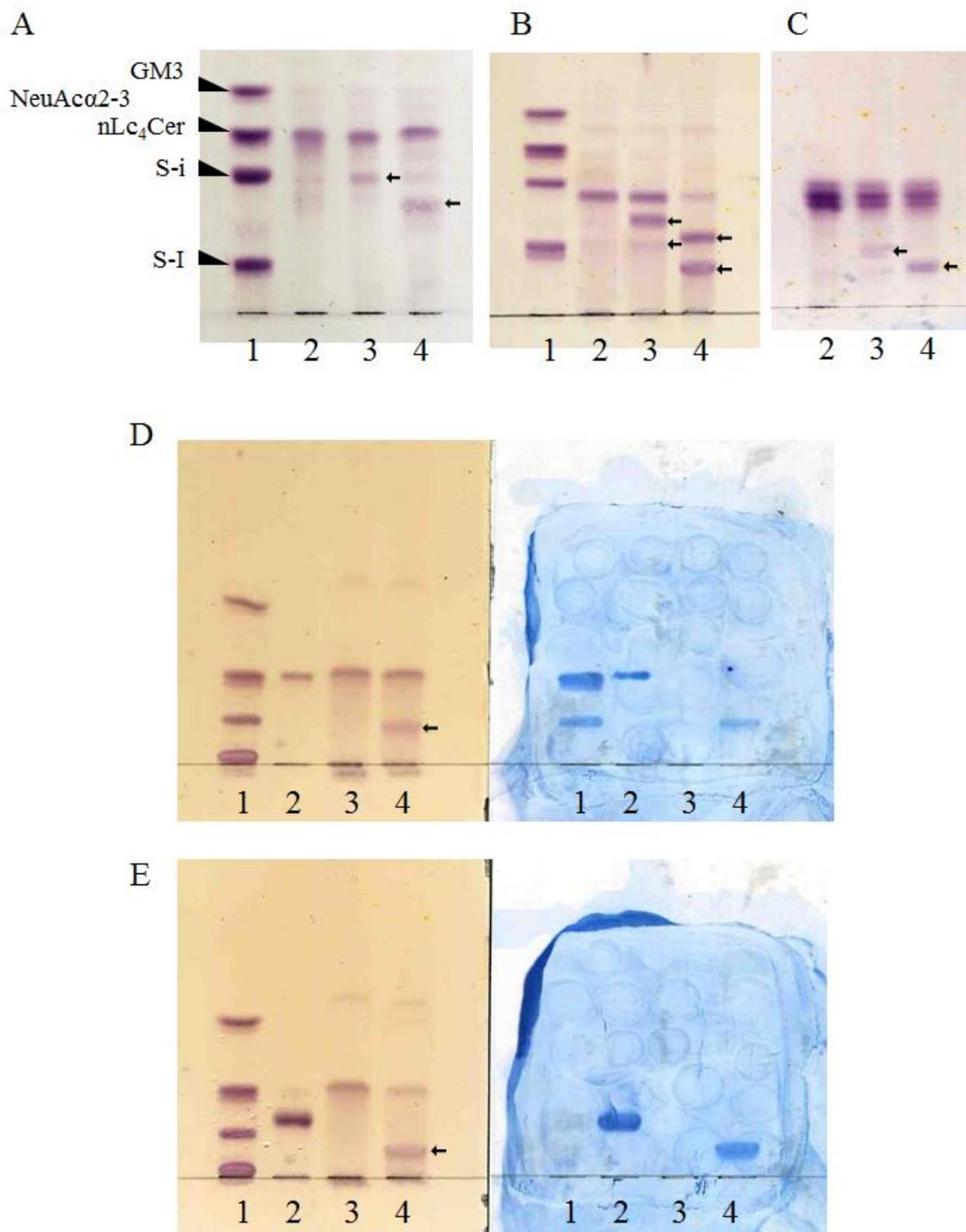


図 3.1 TLC 分析による，長鎖型ネオラクト系およびラクト系スフィンゴ糖脂質酵素合成物の確認

(A) i-スフィンゴ糖脂質酵素反応物，(B) I-スフィンゴ糖脂質酵素反応物，(C) Lc₄Cer 酵素反応物それぞれの TLC 分析の結果．レーン 1，標品の GM3，NeuAc α 2-3nLc₄Cer，S-i，S-I；レーン 2，酵素を加えず反応させたもの；レーン 3， α 2-3ST である#3 酵素反応物；レーン 4， α 2-6ST である#4 酵素反応物．酵素反応物から回収した脂質画分の 1/5 量を供し，展開溶媒は AB では C/M/0.2%塩化カルシウム水溶液 (55:45:10) を，C では C/M/0.2%塩化カルシウム水溶液 (60:35:8) をそれぞれ使用した．

(D) SPS-20 抗体による，i-スフィンゴ糖脂質を受容体基質に用いた際の#3 酵素反応物に対する TLC/免疫染色の結果．レーン 1，標品の GM3，NeuAc α 2-3nLc₄Cer，S-i，S-I；レーン 2，標品の NeuAc α 2-3nLc₄Cer；レーン 3，酵素を加えず反応させたもの；レーン 4，#3 酵素反応物．左はオルシノール試薬，右は免疫染色の結果．展開溶媒は C/M/0.2%塩化カルシウム水溶液 (60:35:8) を使用した．

(E) MFH-1 抗体による，i-スフィンゴ糖脂質を受容体基質に用いた際の#4 酵素反応物に対する TLC/免疫染色の結果．レーン 1，標品の GM3，NeuAc α 2-3nLc₄Cer，S-i，S-I；レーン 2，標品の NeuAc α 2-6nLc₄Cer；レーン 3，酵素を加えず反応させたもの；レーン 4，#4 酵素反応物．左はオルシノール試薬，右は免疫染色の結果．展開溶媒は C/M/0.2%塩化カルシウム水溶液 (60:35:8) を使用した．

矢印は酵素合成物のバンドを示している．

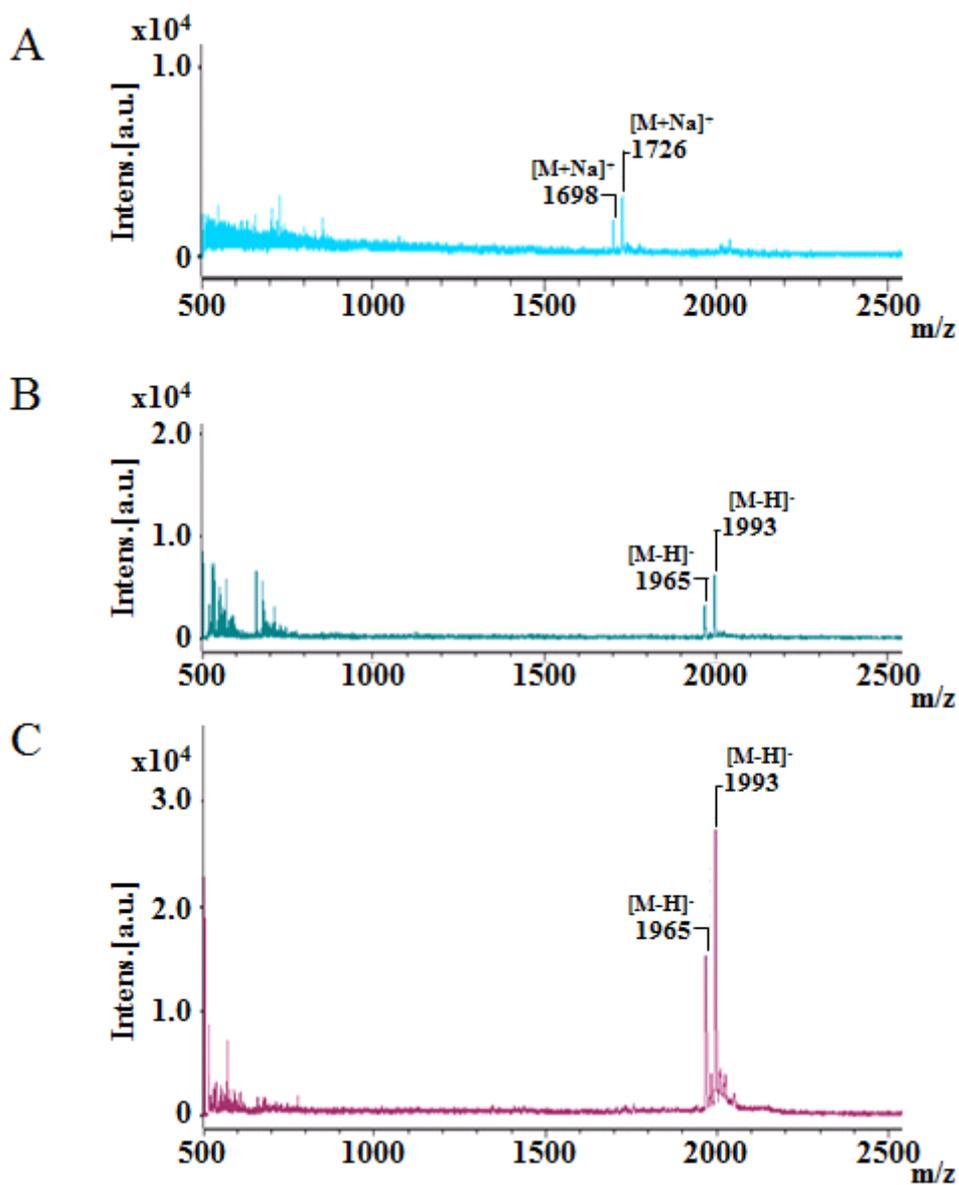


図 3.2 MALDI-TOF MS による i-スフィンゴ糖脂質酵素合成物の分析

(A) 受容体基質に用いた i-スフィンゴ糖脂質の MS スペクトル. (B) i-スフィンゴ糖脂質#3 酵素合成物の MS スペクトル. (C) i-スフィンゴ糖脂質#4 酵素合成物の MS スペクトル.

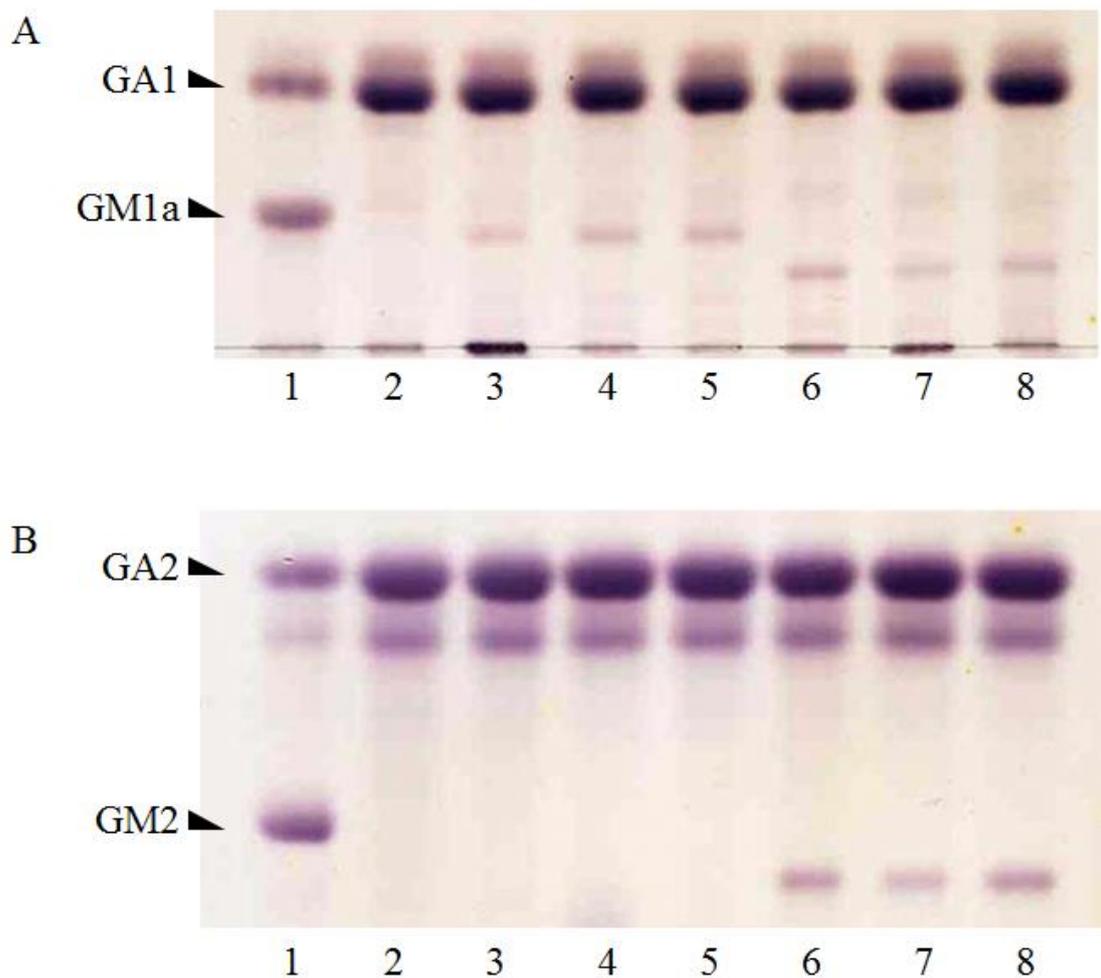


図 3.3 TLC 分析による, GA1 および GA2 酵素合成物の確認

(A) GA1 酵素反応物の結果. (B) GA2 酵素反応物の結果. レーン 1, スタンダードのガングリオシドおよび基質; レーン 2, 酵素を加えず反応させたもの; レーン 3, $\alpha 2$ -3ST である#1 酵素反応物; レーン 4, $\alpha 2$ -3ST である#2 酵素反応物; レーン 5, $\alpha 2$ -3ST である#3 酵素反応物; レーン 6, $\alpha 2$ -6ST である#4 酵素反応物; レーン 7, $\alpha 2$ -6ST である#5 酵素反応物, レーン 8, $\alpha 2$ -6ST である#6 酵素反応物

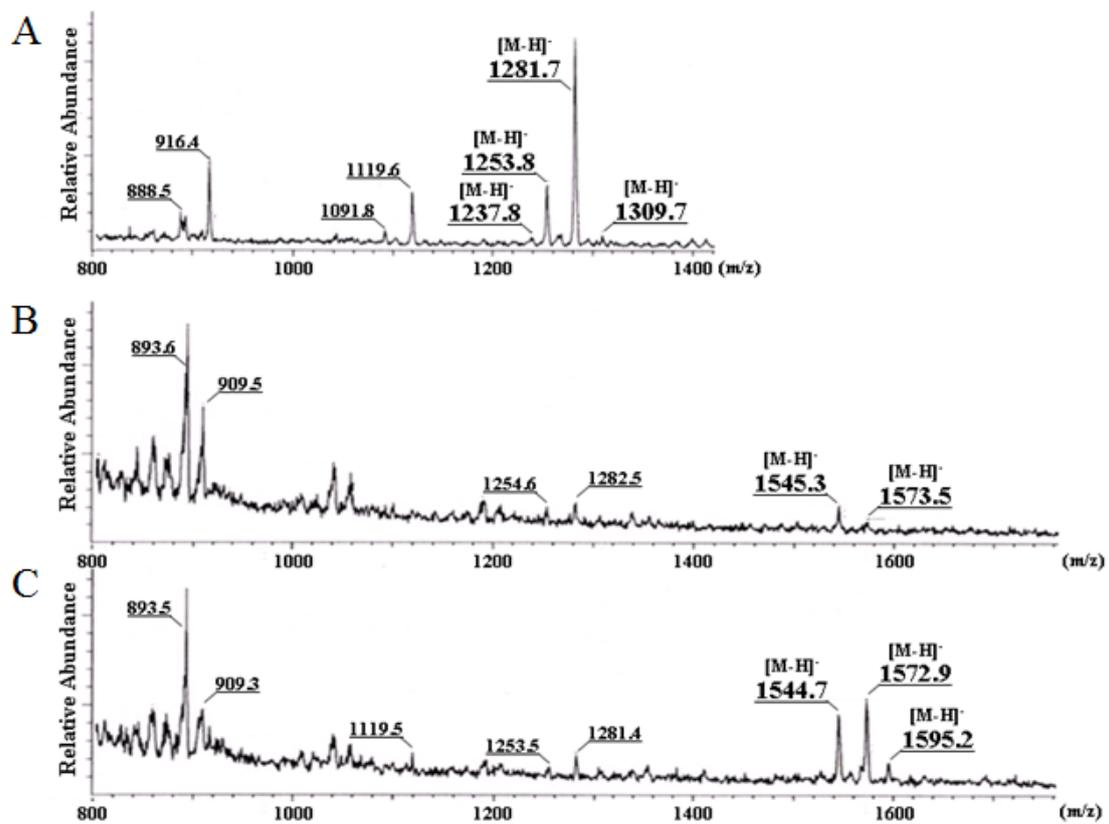


図 3.4 TLC-プロットによる SIMS による GA1 酵素合成物の分析

(A) 受容体基質に用いた GA1 の MS スペクトル. (B) GA1#3 酵素合成物の MS スペクトル. (C) GA1#4 酵素合成物の MS スペクトル.

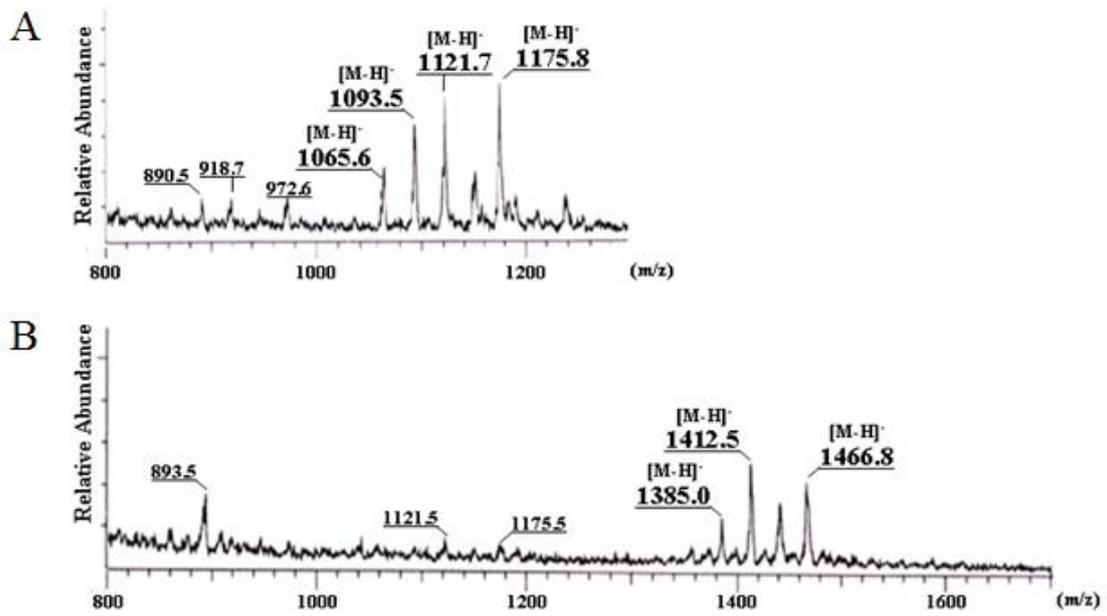


図 3.5 TLC-プロットに SIMS による GA2 酵素合成物の分析

(A) 受容体基質に用いた GA2 の MS スペクトル. (B) GA2#4 酵素合成物の MS スペクトル.

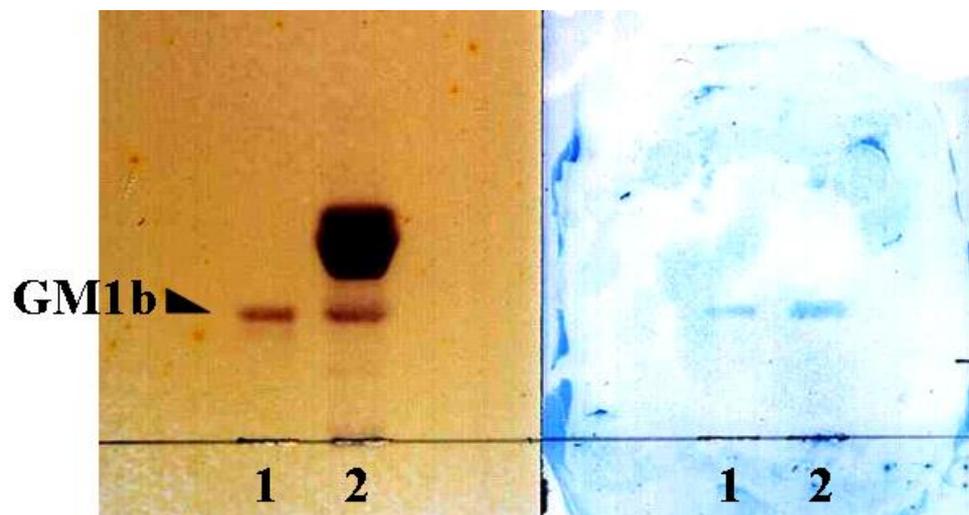


図 3.6 TLC/免疫染色による GA1#3 酵素合成物の同定

左はオルシノール発色の結果. 右側は GG51 抗体による GA1#3 酵素合成物の TLC 免疫染色の結果. レーン 1, スタンダードの GM1b ; レーン 2, GA1#3 酵素反応物.

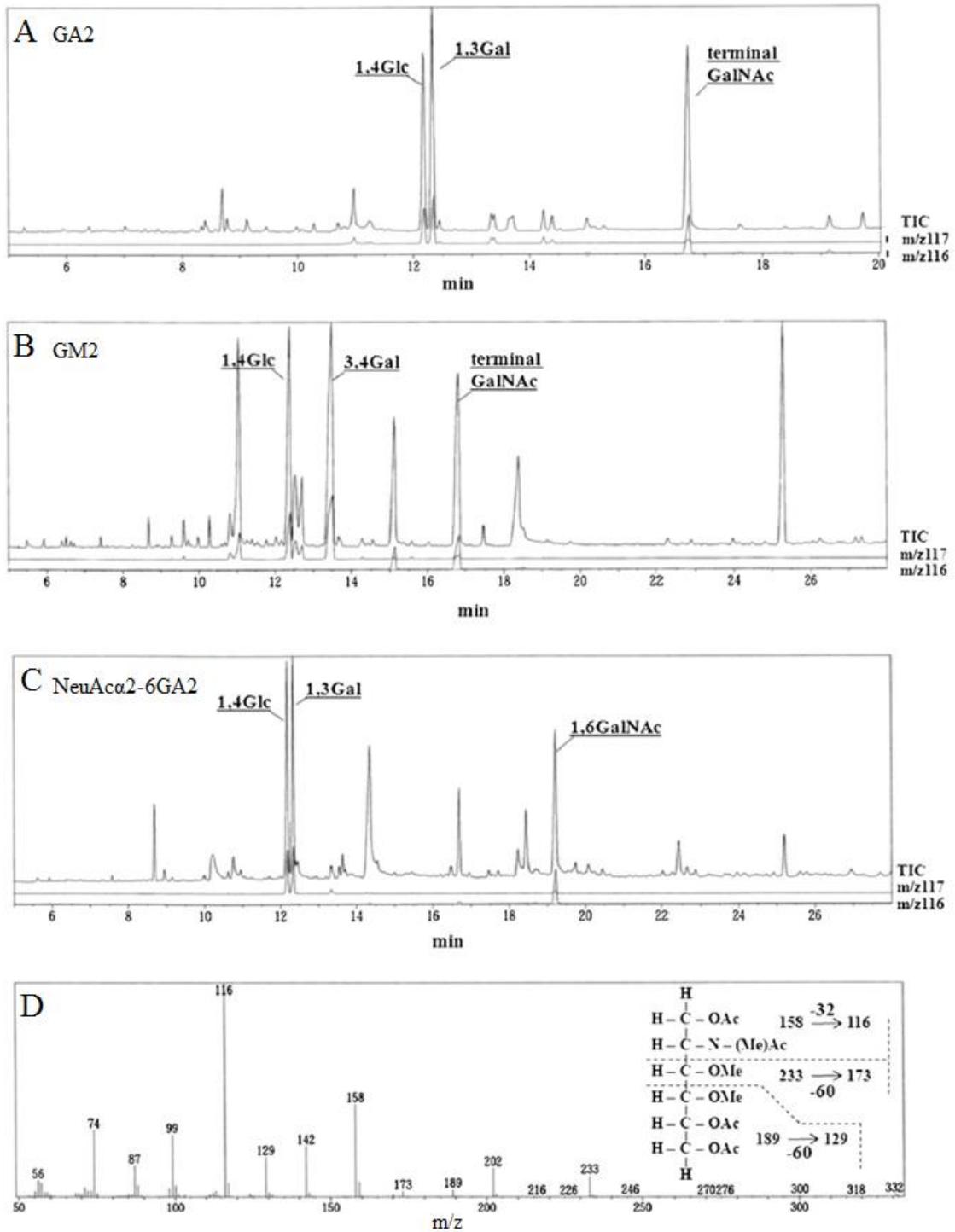


図 3.7 GC/MS による GA2#4 酵素合成物の PMAA の分析

(A) 受容体基質として用いた GA2 の TIC. (B) スタンダードの GM2 の TIC. (C) GA2#4 酵素合成物の TIC. (D) GA2#4 酵素合成物の TIC において検出された 19.2 分のピークの MS スペクトルとそのフラグメント解析.

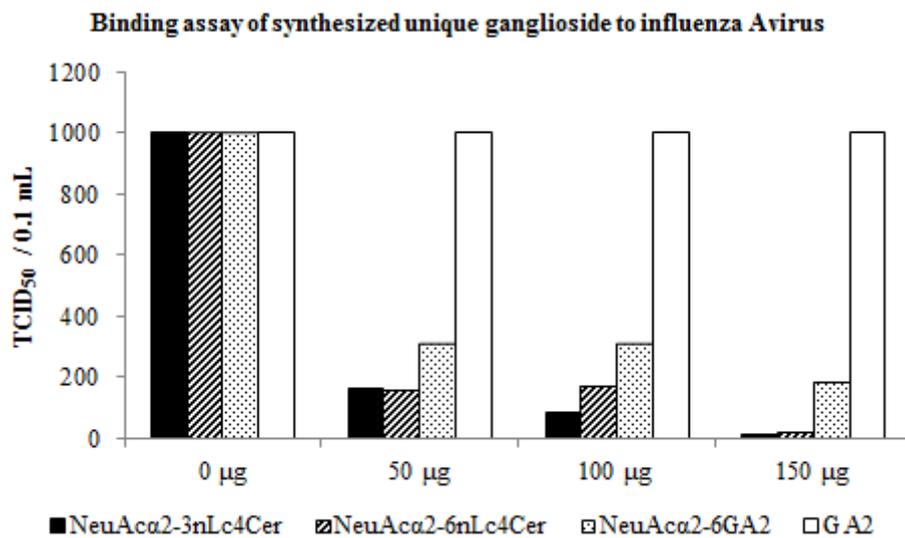


図 3.8 インフルエンザ A ウイルス結合実験

ガングリオシドを含むリポソームとインフルエンザ A ウイルスとの結合実験の結果.
 NeuAcα2-3nLc₄Cer および NeuAcα2-6nLc₄Cer は天然のガングリオシドを, NeuAcα2-6GA2 は
 #4 酵素反応物から精製したものをそれぞれ用いた.

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

4.1 概要

ガングリオシドやシアル酸を有する糖鎖を過剰に発現した細胞株を樹立することは, シアル酸と生物学的現象における新たな知見を得るための有効な手段の一つである. これまでの研究結果により, 海洋性細菌由来 ST が様々な糖鎖構造を有するスフィンゴ糖脂質に対して, 幅広い受容体基質特異性を示すことが明らかとなった. そこで本章では, ガングリオシド研究における海洋性細菌由来 ST の有用性を更に示すため, 動物細胞で海洋性細菌由来 ST を発現, 機能させる系を確立し, ガングリオシドやシアル酸を有する糖鎖を過剰に発現した細胞株を樹立することを目標として研究を行った. また, 樹立した細胞におけるガングリオシドの発現は, 導入した ST だけでなく, 様々な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, 合わせてガングリオシド分析を迅速かつ簡便に行うための, 新たな試料調製法の確立も行った. それぞれの研究の概要について以下に述べる.

4.1.1 動物細胞における海洋性細菌由来 ST 発現系の構築

P. damsela JT0160 株由来の $\alpha 2$ -6ST は, 1996 年に山本らによって初めて海洋性細菌から見出された ST であり, これまでに受容体基質特異性やアミノ酸配列といった酵素の特徴が, 多くの研究から明らかとなっている酵素の一つである (36-39,50). そこで第 4 章では *P. damsela* JT0160 株由来の ST に着目し, 動物細胞における本酵素の発現系の構築を行った. 一般に, 動物細胞で ST はトランスゴルジ, およびトランスゴルジネットワークに局在することから, 海洋性細菌由来 ST 遺伝子の上流にブタ由来の $\alpha 1$ -3 ガラクトース転移酵素 ($\alpha 1,3$ GalT) のトランスメンブレン (TM) 領域遺伝子を連結し, 動物細胞内に正しい局在で発現させることを戦略の一つとした. また, 宿主細胞としては, 外来遺伝子の高い発現と維持が可能であることで知られるチャイニーズハムスター卵巣由来の細胞株 (CHO-K1, Chinese hamster Ovary) に着目し, *P. damsela* JT0160 株由来 ST の発現系の構築を目標とした.

本章では現在までに得られている結果について, 4.3.1 項にまとめた.

4.1.2 ガングリオシド分析のための簡便な試料調製法の確立

細胞や組織におけるガングリオシドの発現変化を解析するためには, それらをより迅速かつ簡便に分析する手法の確立が不可欠である. ガングリオシドを含むスフィンゴ糖脂質の分析は, TLC, GC/MS, NMR, MS などの分析法が従来から広く使用されているが (56-59),

その中でも様々な分子種が混在する試料を簡便に分離できる TLC と検出感度に優れる MS を組み合わせた TLC-MS 分析は、細胞や組織抽出物などから特定のガングリオシドを迅速に分析できる有力な手法の一つとして確立されつつある(44,60-63)。しかしながら、これらの分析法は、測定のための特別な機器を必要とすることや、試料が固定相に存在することからその汎用性が限られる、という問題点が存在した。そこで本章では、より簡便かつ迅速に、生体試料から特定のガングリオシドを分析するための新たな手法の確立を行った。

TLC で分離されたガングリオシドを、担体ごとかきとり有機溶媒で抽出する手法は、煩雑な精製操作や特別な機器を必要とせずにガングリオシドを簡便に単離できることから古くから用いられてきた手法である。その際、担体由来の固着剤などの夾雑物が、MS 分析を著しく妨害することが知られている。これらの問題を解決するために、先行研究で行われていた 1,2-ジクロロエタン (DCE) を用いた複合糖質精製法に着目した(64)。ガングリオシドはその糖鎖上に複数のヒドロキシ基を有することから、ガラスチューブ内に乾固させることで、ガラス表面上のヒドロキシ基と水素結合を形成する。これらの結合は、糖質以外の夾雑物とガラス表面上の結合力よりも強固であると考えられたことから、ガングリオシドと界面活性剤を乾固し、様々な有機溶媒による洗浄を試みたところ、DCE を用いた際に効率的に界面活性剤のみを除去することが可能となった(64)。

そこで本研究では、TLC 上のガングリオシドを迅速に MS に供するための簡便な試料調製法の確立を目標として、DCE 洗浄が TLC 由来の夾雑物を除去する際にも有効であるかどうかを検討した。本研究では MS の中でも検出感度の優れる MALDI-TOF MS を用いて夾雑物の影響を確認した。結果として、DCE はガングリオシドから TLC 由来の夾雑物を効率的に除去できることが明らかとなった(65)。本章ではこれらの結果を 4.3.2 項にまとめた。

4.2 材料と方法

4.2.1 材料

ウシ脳由来の GM3 は Hytest Ltd. (Finland) より購入したものをを用いた。GM1a は当研究室でウシ脳から調製した。ブタ脳は東京芝浦臓器株式会社より購入した。Ham F12 培地は日本製薬株式会社より、D-MEM 培地 (Dulbecco's modified eagle's medium) は SIGMA Ltd (St. Louis, Mo, USA) よりそれぞれ購入した。24 穴 プレート、48 穴プレートはコーニングより、96 穴プレートはサーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社より、16 cm ディッシュ、10 cm ディッシュは TPP (Switzerland) よりそれぞれ購入した。ビオチン標識されたレクチンは、 α 2-3 結合で糖鎖に付加した NeuAc に対して特異的に結合するニホンニワト

コ由来 SSA (株式会社 J-オイルミルズ), α 2-6 結合で糖鎖に付加した NeuAc に対して特異的に結合するイヌエンジュ由来 MAM (株式会社 J-オイルミルズ) をそれぞれ用いた。

4.2.2 TM-ST 遺伝子の作製

ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR, polymerase chain reaction) は i-Cycler (Bio RAD, USA) を用いて行った。TM 遺伝子は 5'-GCCACCATGAATGTCAAAGGAAGAGTG-3' および 5'-AGGTGCAACAACAGTAGGATTAACCAGTCCAC-3', ST 遺伝子は 5'-GACTGGTTTAATCCTACTGTTGTTGCACCTACG-3' および 5'-CATGATCAGCCCAGAACAGAACAGA-3' をそれぞれプライマーとして用いて増幅した。尚, 下線部はプライマーによって新たに付加した塩基配列である。いずれの PCR も, 94°C1 分, 57°C1 分, 72°C2 分を 35 サイクル, 予備伸長として 72°C4 分の条件で行った。TM 遺伝子と ST 遺伝子は, 1.5%アガロース電気泳動によって増幅を確認し, QIAEXE II Gel Extraction Kit (QIAGEN, Netherlands) を用いてゲルより抽出し, 精製した。TM-ST 遺伝子は, 増幅した TM 遺伝子および ST 遺伝子を鋳型にして, 5'-GCCACCATGAATGTCAAAGGAAGAGTG-3' および 5'-CATGATCAGCCCAGAACAGAACAGA-3' をプライマーとして用いた Over-lap PCR によって作製した。Over-lap PCR は 94°C1 分, 57°C1 分, 72°C2 分を 35 サイクル, 予備伸長として 72°C4 分の条件で行った。増幅した TM-ST 遺伝子は Dual Prompter TA Cloning Kit (Invitrogen, USA) を用いて TA クローニングを行い pCR II プラスミドベクターに挿入し, TOP10F' competent cells (Invitrogen, USA) を用いて形質転換を行った。TM-ST 遺伝子が挿入された pCR II ベクターを有する大腸菌のコロニーをピックし, QIAGEN Plasmid Midi Kit (QIAGEN, Netherlands) を用いてプラスミドを抽出し, シークエンス解析によって正しい遺伝子配列を有する TM-ST 遺伝子を得た。正しい遺伝子配列の TM-ST 遺伝子を有する pCR II プラスミドベクターを, 制限酵素である Kpn I, Xba I で酵素処理した。同様に, 動物細胞用の発現ベクターである p3xFLAG-CMV-14 (SIGMA Ltd., St. Louis, Mo, USA) も Kpn I, Xba I で酵素処理した。両者をそれぞれ QIAEXE II Gel Extraction Kit を用いて精製した後, Dual Prompter TA Cloning Kit を用いて連結し, 発現系の構築とした。

4.2.3 CHO 細胞への ST 遺伝子の導入

構築した ST 遺伝子は Lipofectamine LTX and PLUS reagent (Invitrogen, USA) を用いて CHO-K1 に遺伝子導入した。遺伝子導入前日に, 当日 50~60%コンフルエントとなるように CHO-K1 細胞を 24 穴 プレートに播種した。マニュアルに従って Lipofectamine LTX and

PLUS reagent を用いて ST 遺伝子を CHO-K1 細胞に遺伝子導入した。導入後は培地にジェネティシン (Life technologies, USA) を加えて培養を行い、正しく遺伝子導入された細胞株を限界希釈法によって得た。

4.2.4 細胞のレクチン染色による細胞表面シアル酸量の比較

カルチャースライド (Corning, USA) に翌日 80~90%コンフルエントとなるように細胞を播種した。当日、培地を除いて PBS で洗浄した後、3%パラホルムアルデヒド/PBS 溶液を加え、20 分間細胞の固定を行った。固定後、3%パラホルムアルデヒド/PBS 溶液を除いて PBS で洗浄し、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に調製したレクチンを加えて 4°C で 1 時間反応させた。その後、過剰なレクチンを PBS で除き、Phycoerythrin (PE) 標識したストレプトアビジン (R&D systems, USA) を加えて 4°C で 30 分間反応させた。過剰なストレプトアビジンを PBS で除いた後、蛍光顕微鏡にて観察した。

4.2.5 細胞からの粗脂質の抽出

細胞数を計測後、細胞を遠沈管に写し 1000 rpm で 5 分間遠心分離を行い、上清を除いた。下層に C/M (2:1) を加え、5 分間の超音波処理および 1 時間の振とうを行い、粗脂質を溶出した。その後、3000 rpm で 10 分間遠心分離を行い、上清を回収した。次に下層に C/M/水 (10:20:8) を加え、同様の操作で粗脂質を溶出し、上清を回収した。これら上清を合わせ、細胞の粗脂質とした。

4.2.6 SDS-PAGE/Western blotting

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE, Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide-gel electrophoresis) 用の試料は、細胞を試料調製液 {トリス-HCl バッファー, 1%SDS, 10% ショ糖, 50 mM ジチオスレイトール (DTT), ブロモフェノールブルー (BPB)} と混ぜた後に 5 分間煮沸し、10000 回転で 15 分間冷却遠心分離を行うことで得られた上清を使用した。サンプルは 12%ポリアクリルアミドゲルによって分離し、PVDF 膜に転写した。次に PVDF 膜を 1%BSA/PBS で 30 分間ブロッキングを行った後、PBS で 1000 倍希釈した抗 FLAG 抗体 (SIGMA Ltd., St. Louis, Mo, USA), あるいは 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に調製したレクチンで一晩反応を行った。反応後、PBS で洗浄を行い、1000 倍希釈した Horse radish peroxidase (HRP) 標識された抗マウス IgG 抗体, あるいは 1000 倍希釈した HRP 標識アビジンを 3 時間反応させた後、発色液を用いて発色させた。

4.2.7 TLC 分析および HPTLC プレートからのガングリオシド抽出

C/M=2:1 に溶解したスフィンゴ糖脂質は、予め 80°C で 30 分間活性化した HPTLC プレートに供し、C/M/0.2% 塩化カルシウム水溶液 (50:40:10, v/v/v) で展開した。展開後、スフィンゴ糖脂質はオルシノール試薬で発色させ、検出した。HPTLC プレートからのガングリオシド抽出は、TLC で展開後、プリムリン試薬を噴霧し、365 nm の紫外線下で可視化したバンドを担体ごとにかきとり、1 mL の C/M/水 (10:10:3, v/v/v) で 30 分間ソニケーションする操作を 2 回繰り返す方法で行った。その後、1500 × g で 20 分間遠心分離を行い、上清を新しいガラスチューブに回収し、エアフローを用いて風乾させた。風乾後、夾雑物を除くために、1 mL の 1,2-ジクロロエタン (DCE) で 3 回、洗浄操作を行った。

4.2.8 MALDI-TOF MS

MALDI-TOF MS 分析は 337 nm 窒素レーザーを装備した Voyager RP-PRO MS (PerSeptive Biosystems, MA) を用いて行った。MALDI-TOF MS スペクトルの補正は、1 pmol μL^{-1} に調製した Bradykinin ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 757.40) とヒト adrenocorticotrophic hormone (ACTH, fragments 18-39) ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 2465.20) を用いて行った。マトリックス溶液は水で 10 mg mL^{-1} に調製した 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB) を用いた。スフィンゴ糖脂質は C/M=2:1 で 100 pmol μL^{-1} に調製し、マトリックス溶液と 1:1 で混合した後にターゲットプレートに供し、冷風を用いて結晶化させた。

4.3 結果

4.3.1 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 を動物細胞で機能させるために、トランスゴルジでの局在を誘導するシグナルペプチドとして、ブタ由来 $\alpha 1,3$ GalT の TM 領域遺伝子を ST 遺伝子上流に構築した。 $\alpha 1,3$ GalT の TM 領域遺伝子は、小川、渡部らによって下流の酵素遺伝子をトランスゴルジに発現誘導できることが示されている(66,67)。構築した TM-ST 遺伝子は、動物細胞用の発現ベクターである p3xFLAG-CMV-14 に挿入した(図 4.1)。構築した発現ベクターを CHO 細胞にリポフェクション法を用いて遺伝子導入し、限界希釈を行うことで、ST 遺伝子導細胞由来のクローンを 26 株得た。また、TM-ST 遺伝子を挿入していないベクター (Mock) も合わせて遺伝子導入し、限界希釈法にて Mock 細胞由来のクローンを 13 株樹立した。細胞内で TM-ST が正しくタンパク質として発現しているかを確認するために、抗 FLAG 抗体を用いた SDS-PAGE/Western blotting を行ったところ、1F4 および 1F6 クローンで、TM-ST

と思われる 49 kDa 付近に陽性のバンドが検出された (図 4.2). そこで, 1F4 クローンおよび Mock 細胞の C2 クローンに対して, MAM および SSA レクチンを用いた細胞表面のシアル酸量の比較を行ったが, 細胞表面のシアル酸量の増加を確認することはできなかった (図 4.3). また, ST 遺伝子導入細胞株から抽出した粗脂質, および糖タンパク質を TLC, および SSA レクチンを用いた SDS-PAGE/Western blotting で分析したところ (図 4.4), 糖タンパク質において Mock 細胞株よりも多くの SSA 陽性バンドが検出された (図 4.4B).

4.3.2 ガングリオシド分析のための簡便な試料調製法の確立

4.3.2.1 TLC 由来夾雑物の MALDI-TOF MS 分析における影響の確認

TLC 抽出において混入する担体由来の夾雑物の MALDI-TOF MS 分析における影響を確認するために, 一般的なモノシアロガングリオシドであり, 単純な糖鎖構造を有する GM3 および GM1a ガングリオシドを TLC から抽出し, 質量分析に供した. また, MALDI-TOF MS 分析は, 夾雑物の影響をより受けやすい陽イオンモードで測定を行った. TLC に供する前のガングリオシドと TLC 抽出後のガングリオシドにおける MALDI-TOF MS の測定結果を図 4.5 に示した. TLC に供する前の GM3 のスペクトルにおいては, 分子量関連イオンとして m/z 1204.4, および 1232.6 $[M+Na]^+$ の 2 つが, シアル酸が脱離した派生イオンとして m/z 912.1, および 940.1 $[M+Na-NeuAc]^+$ の 2 つが, シアル酸およびヘキソースが脱離した派生イオンとして m/z 778.4 $[M+Na-NeuAc-Hex]^+$ が, それぞれ検出された (図 4.5A). また, TLC に供する前の GM1a のスペクトルにおいては, 分子関連イオンとして m/z 1568.7, および 1596.5 $[M+Na]^+$ の 2 つが, 派生イオンとしてシアル酸が脱離した m/z 1277.5, 1305.5 $[M+Na-NeuAc]^+$, シアル酸およびヘキソースが脱離した m/z 912.0, および 940.0 $[M+Na-NeuAc-Hex]^+$ がそれぞれ検出された (図 4.5B). 一方, TLC 抽出を行った GM3 および GM1a ガングリオシドのスペクトルにおいては, TLC 由来夾雑物と思われる 248 ダルトン間隔の主要ピークが検出され, ガングリオシド由来のピークはほとんど検出されなかった (図 4.5C, D). 加えて, TLC 由来夾雑物として検出されたそれぞれの主要ピークに付随する形で, 44 ダルトン間隔のピークが検出された. これらの TLC 由来夾雑物を除くために, TLC 抽出を行ったガングリオシドをイアトロビーズカラムクロマトグラフィに供した. カラムクロマトグラフィに供したサンプルの MS スペクトルにおいて, TLC 由来夾雑物は完全に除かれ, ガングリオシド由来のピークがそれぞれ検出された (図 4.5E, F). 以上の結果から, TLC 由来の夾雑物が MS 分析を阻害するということが, また, これらが合成ポリマーのような高分子化合物であることを確認した.

4.3.2.2 DCE 洗浄による TLC 由来夾雑物の除去

DCE 洗浄における TLC 由来夾雑物の除去効果を確認するために、TLC から抽出した GM3 および GM1a ガングリオシドをガラスチューブに風乾し、DCE 洗浄を行った。洗浄後、MALDI-TOF MS を用いて TLC 由来夾雑物の除去効果を確認した (図 4.6)。結果として、DCE 洗浄を行ったガングリオシドの MS スペクトルにおいては、わずかに TLC 由来夾雑物のピークが検出されたものの、ガングリオシド由来の分子量関連イオンがそれぞれ検出された (図 4.6A, B)。DCE 洗浄を行った GM3 の MS スペクトルにおいては、分子量関連イオンとして m/z 1225.3, および 1253.9 $[M+2Na-H]^+$ の 2 つが、シアル酸が脱離した派生イオンとして m/z 912.3, および 940.3 $[M+Na-NeuAc]^+$ の 2 つがそれぞれ検出された (図 4.6A)。同様に、DCE 洗浄を行った GM1a の MS スペクトルにおいては、分子量関連イオンとして m/z 1592.2, および 1620.3 $[M+2Na-H]^+$ の 2 つが、シアル酸が脱離した派生イオンとして m/z 1277.7, および 1305.5 $[M+Na-NeuAc]^+$ の 2 つがそれぞれ検出された (図 4.6B)。また、DCE 洗浄を行った後の洗浄液に関して MALDI-TOF MS による分析を行ったところ、ガングリオシド由来のピークは見られず、TLC 由来夾雑物のピークが検出された (図 4.6C, D)。さらに、DCE 洗浄によるガングリオシドのロスがないかを確認するために、様々な量に調製した GM3 (0.5, 1.0, 2.0, および 4.0 μg) をガラスチューブに風乾し、DCE 洗浄前後におけるガングリオシド量の比較を行った。結果として、DCE 洗浄前後において、ガングリオシド量に大きな変化は見られなかった (図 4.6E)。同様に、TLC から抽出した GM3 から TLC 由来夾雑物を除去するために、イアトロビーズカラムクロマトグラフィを用いた方法におけるガングリオシドのロスを確認したところ、全ての GM3 において、ガングリオシドのロスが確認された (図 4.6F) これらの結果から、DCE 洗浄は TLC 由来夾雑物を効果的に除去できるだけでなく、イアトロビーズカラムクロマトグラフィでは試料損失が懸念されるごく微量なガングリオシドに対しても応用できると考えられた。

4.3.2.3 DCE 洗浄法を用いた粗脂質中のガングリオシド分析

DCE 洗浄法が、様々な分子種が混在するサンプルにおけるガングリオシド分析に有用であることを示すため、ブタ脳から調製した粗脂質に含まれるガングリオシドに対して、TLC 抽出を行った。本研究では、ブタ脳に含まれる主要なガングリオシドである GM1a および GD1a をターゲットとし、TLC 抽出および DCE 洗浄を行った。ブタ脳から調製した粗脂質の TLC 分析、および DCE 洗浄後の MALDI-TOF MS による分析の結果を図 4.7 に示した。結果として、GM1a の MS スペクトルにおいては分子量関連イオンとして m/z 1592.0, およ

び 1620.2 $[M+2Na-H]^+$ の 2 つが, GD1a の MS スペクトルにおいては分子量関連イオンとして m/z 1902.0, および 1630.8 $[M+3Na-2H]^+$ の 2 つがそれぞれ検出された (図 4.7B, C).

以上のことから, 本手法が, TLC で分離したガングリオシドを迅速に MS に供するための, 有効な方法となることを明らかにした.

4.4 考察

本研究によって, DCE 洗浄が TLC から抽出したガングリオシドを MS 分析に供した際に問題となる TLC 由来夾雑物の影響を顕著に改善できることを明らかとした. カラムクロマトグラフィを用いた従来の方法は, 高効率で夾雑物を除くことができる反面, 煩雑で時間のかかる操作が必要であり, 試料をロスする危険性も含んでいる. TLC 抽出および DCE 洗浄を適用した GM3 および GM1a の MS スペクトルでは, 夾雑物由来のピークがわずかに検出されたものの, ガングリオシドの分子量関連イオンが良好に検出されたことから, DCE 洗浄によって夾雑物の大部分が除去できることが示された (図 4.2A, B). 加えて, 図 4.2C, D で示されたように, DCE 洗浄がカラムクロマトグラフィ法では試料のロスが生じてしまう微量なガングリオシドに対しても高い回収率でガングリオシドを保持できることを明らかとしたことから, TLC 抽出および DCE 洗浄を組み合わせた本手法が, TLC で分離されたガングリオシドを迅速に MS に供するための新たな試料調製法として利用できると考えられる. 本研究によって確立された方法は, 糖脂質の分析において広く用いられている TLC から, 特別な機器を用いることなく簡便にガングリオシドを単離できることから, MALDI-TOF MS だけでなく, 高速原子衝突質量分析 (FAB-MS, Fast Atom Bombardment MS) や SIMS といった他の MS においても広く流用できる手法である. 今後, 海洋性細菌由来 ST を過剰に発現した細胞株を樹立した暁には, 本手法を用いて迅速にガングリオシド分析が行われることを期待している. また, 本手法は細胞や組織由来の試料だけでなく酵素反応物においても応用できると考えられることから, 海洋性細菌由来 ST によるガングリオシド合成と本手法による迅速な MS 分析を組み合わせた複合的なツールとしても提案できるものと考えている.

本章では *P. damsela* JT0160 株由来の α 2-6ST を動物細胞で発現させるための遺伝子構築を行った. 抗 FLAG 抗体を用いた SDS-PAGE/Westernblotting によって本酵素がタンパク質として動物細胞内で発現していることが示唆されたが, 細胞内で本酵素が機能し, 細胞表面の糖鎖構造を変化させていることを示すデータは現在のところ得られていない. ST 遺伝子導入細胞である 1F4 株, および Mock 遺伝子導入株細胞である C2 株から抽出したタンパク

質を SDS-PAGE, および NeuAca2-6 糖鎖に特異的に結合する SSA レクチンを用いた Westernblotting にてそれぞれ分析したところ, 1F4 株において SSA レクチン陽性バンドの増加が見られた. 今後はこれらの糖鎖が遺伝子導入して発現した本酵素によるものであるかを確認する必要があると考えている. また 1F4 株, および C2 株から抽出した粗脂質をそれぞれ TLC 分析によって比較したが, 差は観察されなかった. 野生株の CHO-K1 細胞表面に存在するガングリオシドの分子種は, その約 90% が GM3 であることがすでに明らかとなっていることから, 仮に遺伝子導入した本酵素が細胞内で機能していたとしても, TLC 分析で比較することは難しいと考えられる(68). そのため, 今後は CHO-K1 細胞よりも複雑な分子種のガングリオシドを有する他の細胞株に対しても, 遺伝子導入実験を行っていく必要があると考えている.

MDCK 細胞はインフルエンザウイルスの感染力の評価や変異型の特定に広く用いられている細胞株の一つであるが, これらの細胞表面にはインフルエンザウイルスの HA と高い結合親和性を有する NeuAc-N-アセチルラクトサミン構造が存在することが示されている. 本酵素の受容体基質特異性を考慮すると, MDCK 細胞は次に検討する宿主細胞として有力な候補になると考えられる. 今後, 本酵素遺伝子を発現した MDCK 細胞が樹立されれば, 従来の細胞株よりも強力にインフルエンザウイルスを吸着する, 有用な宿主細胞株としての応用が期待される.

4.5 結論

TLC 上のガングリオシドを迅速に MS に供するための簡便な試料調製法として, TLC 抽出と DCE 洗浄を組み合わせた新たな手法を提案した. *P. damselae* JT0160 株由来の $\alpha 2$ -6ST を動物細胞で発現させるための発現系構築を行い, CHO-K1 細胞内でタンパク質として発現できることを明らかにした. 動物細胞内における本酵素の機能性は示すことはできていないが, 今後の研究の方向性に一つの道筋をつけることができたと考えている.

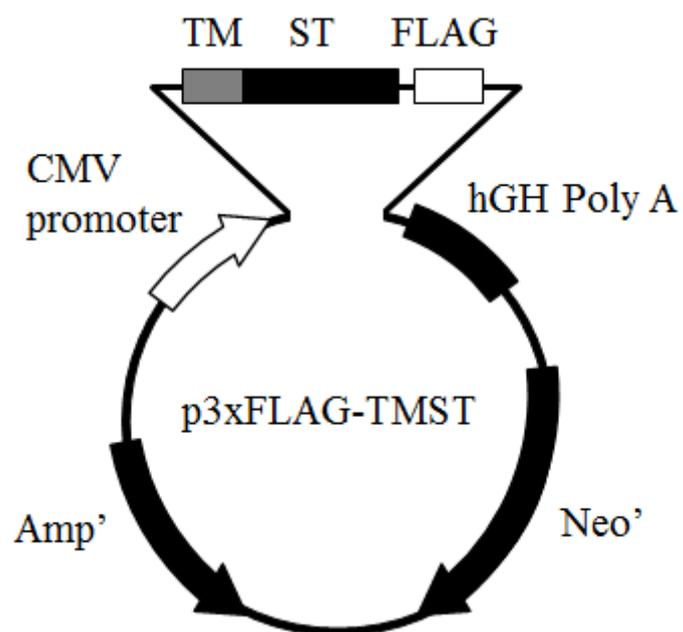


図 4.1 動物細胞発現のために構築した TM-ST 遺伝子

CMV promoter, サイトメガロウイルスプロモーター遺伝子; FLAG, 標識タンパク質遺伝子; hGH Poly A, ヒト成長ホルモン PolyA シグナル遺伝子; Neo^r, ネオマイシン耐性遺伝子; Amp^r, アンピシリン耐性遺伝子.

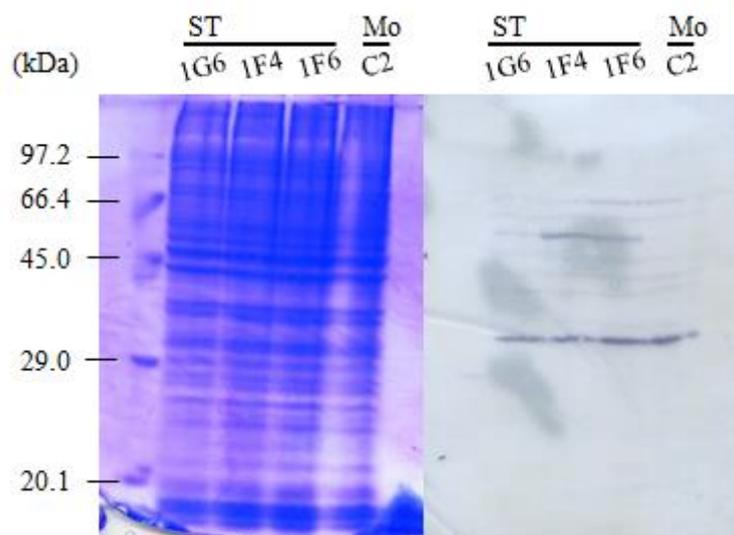


図 4.2 SDS-PAGE/Westernblotting による高 FLAG 発現細胞の確認

左は SDS-PAGE, 右は抗 FLAG 抗体を用いた Westernblotting の結果. ST, ST 遺伝子導入細胞株 ; Mo, Mock 遺伝子導入細胞株.

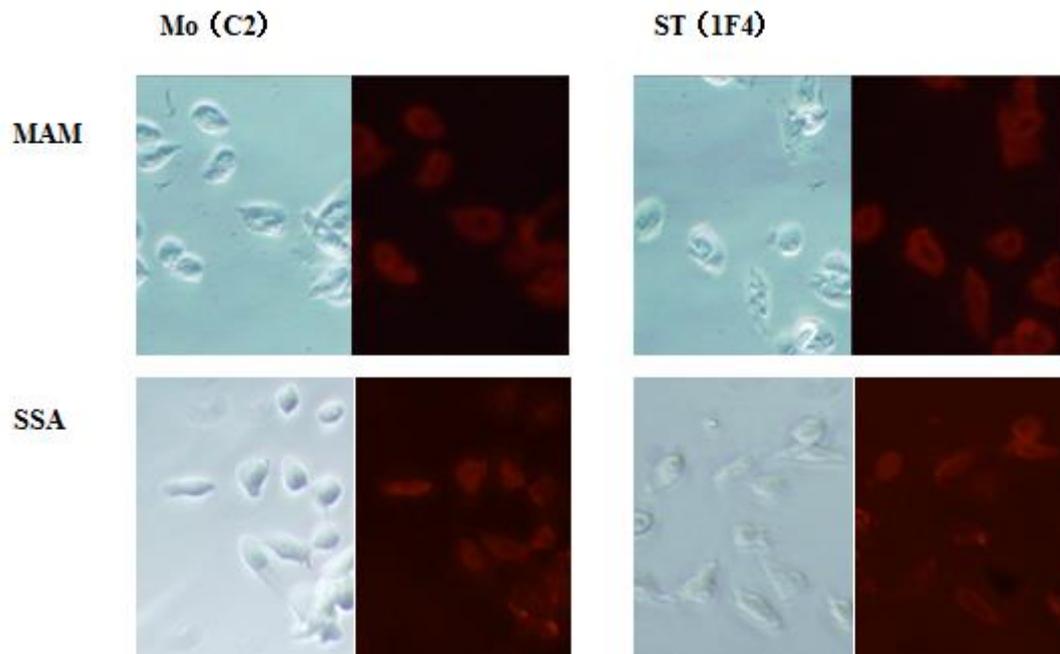


図 4.3 レクチンによる細胞表面糖鎖の確認

Mo, Mock 遺伝子導入細胞株 ; ST, ST 遺伝子導入細胞株. 左側は顕微鏡, 右側は蛍光顕微鏡による検出結果.

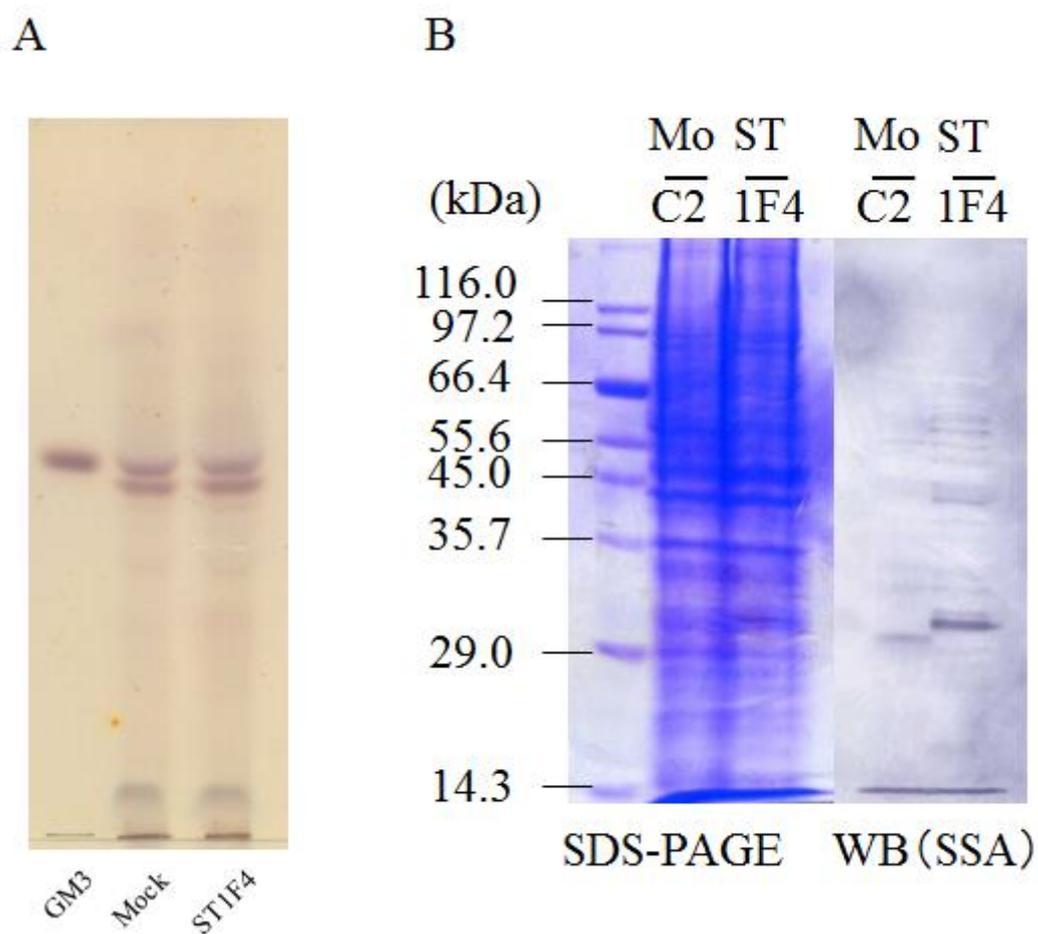


図 4.4 TLC 分析および SDS-PAGE/Western blotting による複合糖質の確認

ST, ST 遺伝子導入細胞株 ; Mock (Mo), Mock 遺伝子導入細胞株.

(A) TLC 分析による細胞の粗脂質の確認. (B) SSA レクチンを用いた SDS-PAGE/Western blotting (WB) による糖タンパク質の確認. 左は SDS-PAGE, 右は SSA レクチンを用いた Western blotting の結果.

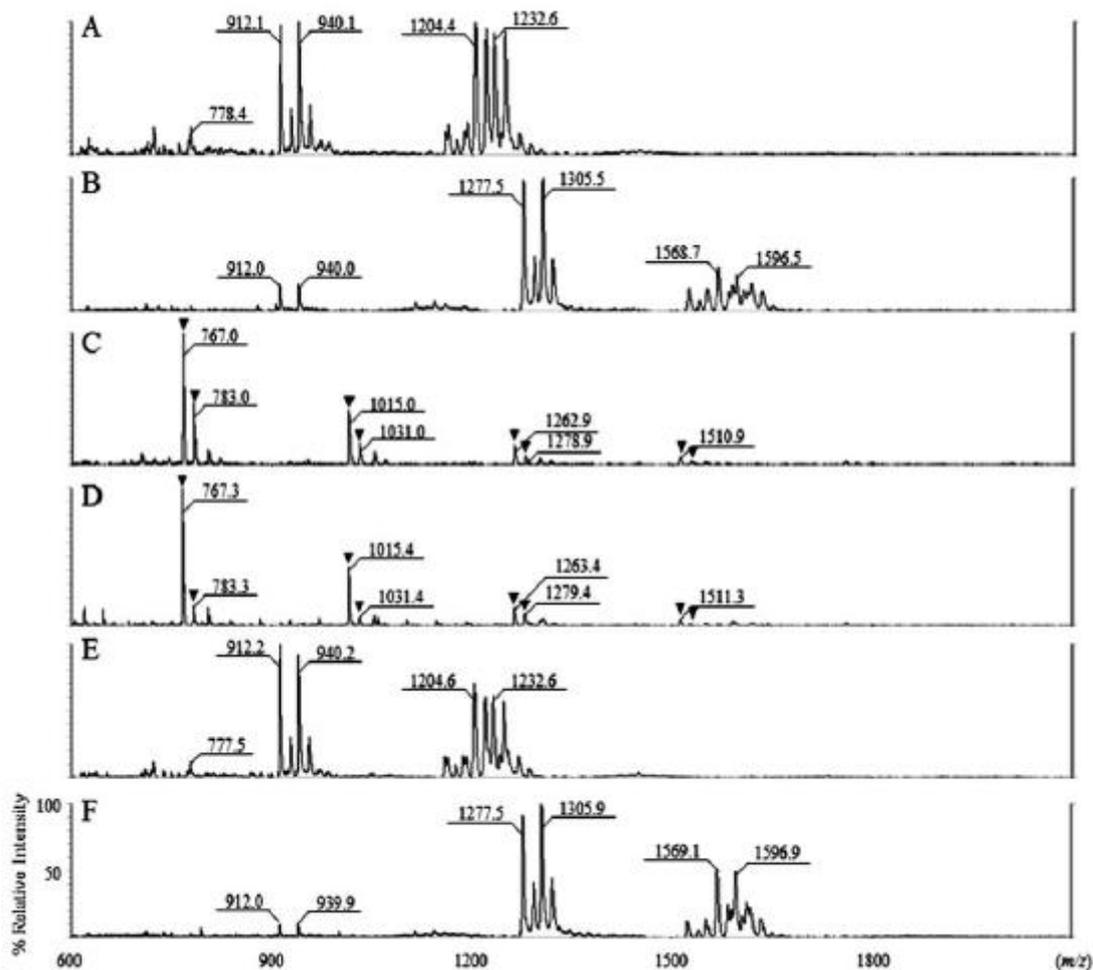


図 4.5 TLC 由来夾雑物の MALDI-TOF MS 分析における影響の確認

(A) GM3, (B) GM1a, (C) TLC から抽出した GM3, (D) TLC から抽出した GM1a, (E) イアトロビーズカラムクロマトグラフィで精製した GM3, (F) イアトロビーズカラムクロマトグラフィで精製した GM1a の MS スペクトル. ▼は TLC 由来夾雑物の主要ピークを示している.

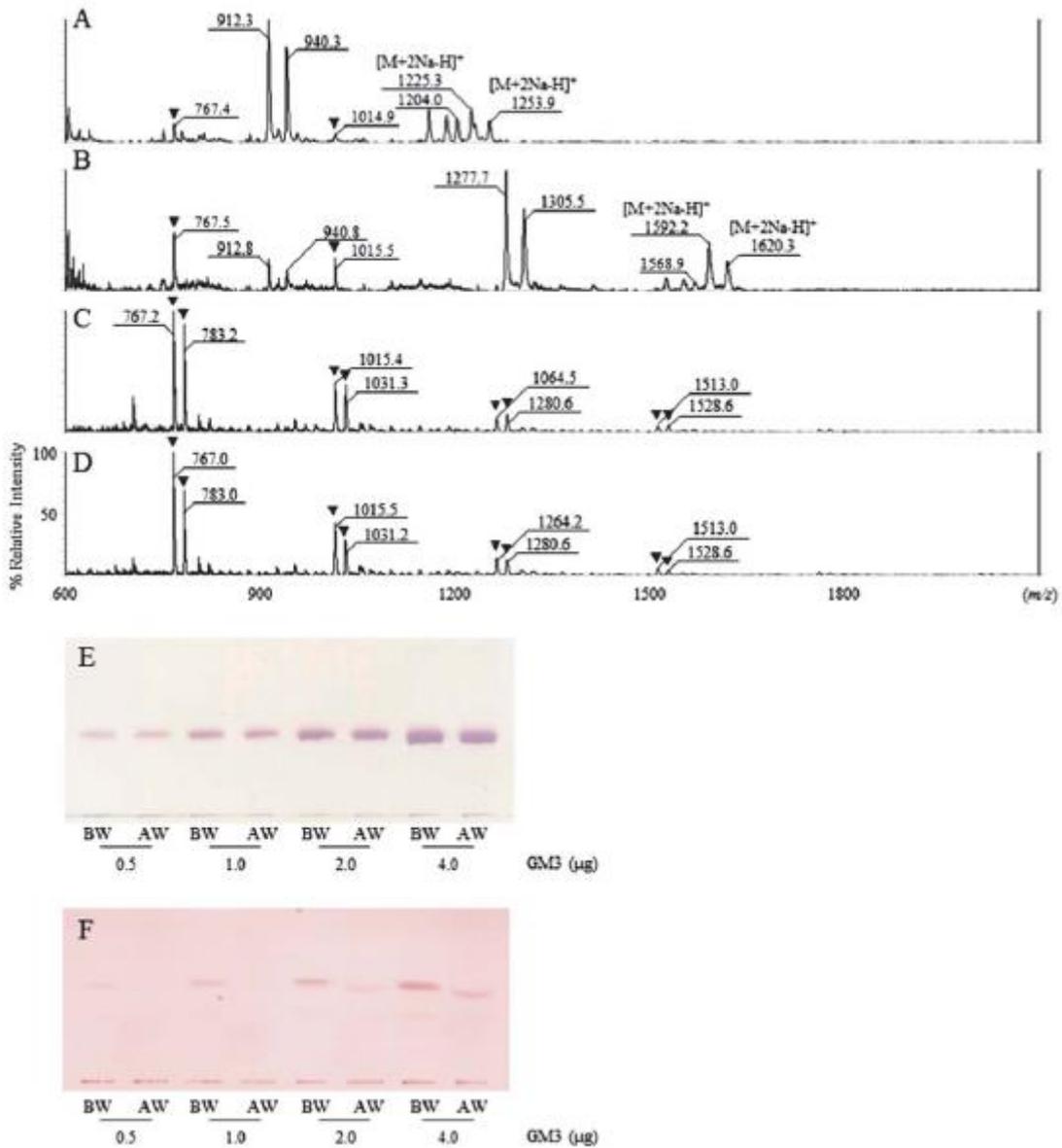


図 4.6 DCE 洗浄による TLC 由来夾雑物の除去

(A) DCE 洗浄後の GM3, (B) DCE 洗浄後の GM1a の MS スペクトル. (C) GM3, および (D) GM1a における DCE 洗浄画分の MS スペクトル. ▼は TLC 由来夾雑物の主要ピークを示している. (E) TLC 分析による DCE 洗浄前後の GM3 回収率の結果. BW, DCE 洗浄前; AW, DCE 洗浄後. (F) TLC 分析によるイアトロビーズカラムクロマトグラフィーの GM3 回収率の結果. AW, イアトロビーズカラムクロマトグラフィーに供する前; BW, イアトロビーズカラムクロマトグラフィーに供した後.

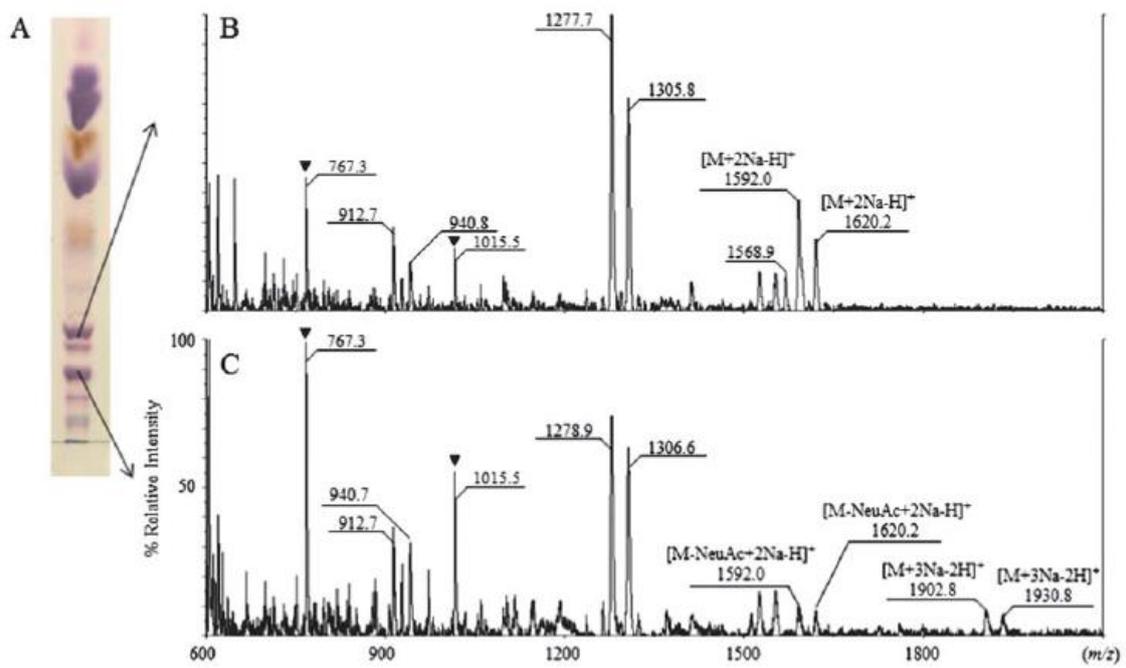


図 4.7 DCE 洗浄および MALDI-TOF MS による、ブタ脳から抽出した粗脂質からの ganglioside 分析

(A) ブタ脳から抽出した粗脂質の TLC 分析の結果. (B) TLC 抽出および DCE 洗浄後の GM1a, および (C) GD1a の MS スペクトル. ▼は TLC 由来夾雑物の主要ピークを示している.

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、様々な系列のスフィンゴ糖脂質を受容体基質として認識し、その糖鎖非還元末端にシアル酸を転移できることを明らかにした。

第2章では、ネオラクト系スフィンゴ糖脂質である nLc₄Cer を受容体基質に用いることで、 α 2-3ST である#1 (*P. sp.* JT-ISH-224 株由来 ST), #2 (*P. phosphoreum* JT-ISH-467 株由来 ST), および#3 (*V. sp.* JT-FAJ-16 株由来 ST) から NeuAca₂-3nLc₄Cer を合成できること、また α 2-6ST である#4 (*P. sp.* JT-ISH-224 株由来 ST), #5 (*P. leiognathi* JT-SHIZ-145 株由来 ST), および#6 (*P. damselae* JT0160 株由来 ST) から NeuAca₂-6nLc₄Cer を合成できることをそれぞれ示した。さらに、nLc₄Cer を受容体基質に用いて酵素学的諸性質の検討を行ったことで、 α 2-3ST では反応時間 30 分, 30°C, pH6.5 という条件、 α 2-6ST では反応時間 180 分以上, 37°C, pH7.5 という条件で、ガングリオシドの合成量がそれぞれ増加する傾向にあることを示すことができた。併せて、各酵素の V_{max} , および K_m 値を算出することで、 α 2-3ST では#3 が、 α 2-6ST では#4 がそれぞれ nLc₄Cer に対して最も高い反応性を示すことを明らかにした。これらの検討結果から、海洋性細菌由来 ST を用いてガングリオシドをより効率的に合成するための酵素反応条件を確立できたと考えている。

第3章では、長鎖型のネオラクト系スフィンゴ糖脂質である i-, I-GSL, およびラクト系スフィンゴ糖脂質である Lc₄Cer を受容体基質に用いることで、 α 2-3ST である#3, および α 2-6ST である#4 酵素反応物から合成物が得られることを明らかにした。さらに、ガングリオ系スフィンゴ糖脂質である GA1 や GA2 を受容体基質に用いることで、GA1 では α 2-3ST, α 2-6ST 酵素反応物ともに、GA2 では α 2-6ST 酵素反応物において、それぞれ合成物が得られることも明らかとした。得られた合成物の化学的同定は十分とは言えないものの、それぞれで得られた合成物は、受容体基質の糖鎖にシアル酸が付加したガングリオシドであると考えられた。中でも、ガングリオ系スフィンゴ糖脂質を受容体基質に用いた際に α 2-6ST によって得られた合成物は、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であると考えられた。このことは、海洋性細菌由来の ST が、既存のガングリオシドだけでなく、非天然系のガングリオシドも合成できる有用な酵素であることを示している。以上の結果から、海洋性細菌由来 ST がガングリオシド合成ツールとしての有用性を示すことができたと考えている。

第4章では、動物細胞における海洋性細菌由来 ST の発現系の構築と、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った。現在のところ、*P. damselae* JT0160 株由来の ST を遺伝子導入した動物細胞において、本酵素が機能していることを示す結果は得られて

いないが、本研究によって海洋性細菌由来 ST を過剰に発現した細胞株樹立することができた。また、TLC から抽出したガングリオシドに含まれる担体由来の夾雑物を、1,2-ジクロロエタン (DCE) が簡便に除去できることを示したことから、TLC 上のガングリオシドを迅速に MS 分析するための簡便な試料調製法として確立できた。併せて、ブタ脳から抽出した総糖脂質を分離した TLC から、特定のガングリオシドを MS 分析することが可能であったことから、今後、海洋性細菌由来 ST を発現した動物細胞株を樹立した際にも、迅速にガングリオシド分析が行えるものと考えている。また、本手法は細胞や組織由来のサンプルだけでなく酵素反応物においても応用できると考えられることから、海洋性細菌由来 ST によるガングリオシド合成と本手法による迅速な MS 分析を組み合わせた、複合的なツールとしても構築できるものと考えている。

糖鎖を合成する手法には、糖転移酵素を用いた酵素合成法他、化学合成法が知られている。化学合成法は一般に収率が高く、広い適用性を有している点で、生体高分子の合成にも用いられている方法であるが、糖鎖合成においてはその工程が煩雑となるという問題点がある。それは、糖が多数のヒドロキシル基を有していることから保護、脱保護といった多段階反応を要し、また α -、 β -配糖体結合という立体選択的な反応を要するからである。加えて、シアル酸を糖鎖に縮合させる場合には、非天然型である β -配糖体が精製しやすいことや、アノメリック位 (C-2) 近傍の立体障害性が大きいこと、縮合反応の際に 2,3-デヒドロ体が生成しやすいことなどの理由から、困難となることも知られている(69,70)。近年では、それらの問題を解決するためにシアル酸に置換基を導入したり、より選択性の優れた糖ドナーを利用したりする化学合成法が確立されつつあり、ガングリオ系ガングリオシドやネオラクト系ガングリオシドなど一部のガングリオシドの全合成も報告されている(70-74)。例えば、岐阜大の木曾らは、シアル酸のアセテート体から 96%の収率で合成したシアル酸ドナーを、Gal の 2-トリメチルシリルエチル (SE) グリコシドの 6-O-または 3-O-ベンゾイル (Bz) 体に縮合させることで、目的とする α -グリコシドのみが 52%および 70%といった高い収率で生成できることを明らかにしている。その後、得られた α -配糖体の 2,4 位ヒドロキシル基を Bz 基で保護したのち、SE グリコシドを 2 段階で SMe グリコシドへと変換し、それぞれ対応する NeuAc α 2-3Gal および NeuAc α 2-6Gal ドナーとして調製することで、最終的に NeuAc α 2-3nLc $_4$ Cer や NeuAc α 2-6nLc $_4$ Cer といったガングリオシドが合成できることを報告している(75)。現在では、シアル酸を 2 つ以上有する GalNAc-GD1a といった、より複雑な糖鎖構造を有するガングリオシドの化学合成も報告されているが(76)、前述した理由やガングリオシドの分子種が豊富であることから、全てのガングリオシドの化学合成

は未だ達成されていない。

一方、糖転移酵素を用いる酵素合成法は、反応が一段階かつ温和な条件下で完了し、酵素が高い選択性を有していることから、簡便に天然型の糖鎖を合成できるという利点がある。特に、糖鎖へのシアル酸付加という点においては、化学合成法と比較して、STを用いる酵素合成法は、短時間かつ効率的に目的の糖鎖にシアル酸を転移することが可能である。しかしながら、従来の動物由来のSTは、酵素の受容体基質特異性が厳密であることから、目的の糖鎖構造に合わせて用いる酵素を選択する必要がある。併せて、合成物を大量に得るためには、酵素自体を安定的に供給する必要があるが、動物由来の酵素は大腸菌 (*Escherichia coli*) を宿主としたタンパク質生産系を用いた大量調製法では、生体内と同等の活性を有した酵素を調製することは困難であることが知られている。

本博士論文研究により、海洋性細菌由来STを用いることで、様々なガングリオシドを合成できることを明らかにした。加えて、細菌由来の酵素は、大腸菌を宿主としたタンパク質生産系で、動物由来の酵素よりも安定した活性型酵素として大量調製が可能であることから、海洋性細菌由来のSTが、前述した課題を解決する有用な糖鎖合成ツールとなることが期待できる。併せて、近年では、固定化酵素として担体に生体触媒を固定し、基質を加えて連続的に反応させるバイオリクターが工業的に利用され始めていることから、海洋性細菌由来STを固定化酵素として応用することができれば、より大規模かつ持続的なガングリオシド供給も可能になると考えている。

近年、様々な細菌から新規の酵素が発見され、その特徴や有用性が報告されている。糖鎖研究の分野においては、STやガラクトース転移酵素を始めとする各種の糖転移酵素だけでなく、エンド- β -ガラクトシダーゼやエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼといった糖加水分解酵素などが多くの細菌から単離されている(30,32,77-83)。細菌由来の糖転移酵素の中でも、STはこれまでに多くの細菌から遺伝子がクローニングされており、その構造的特徴や機能が明らかになりつつある。例えば、*C. jejuni* 由来のST (CST-II) は α 2-3 および α 2-8ST 活性を有する二機能性酵素であることが知られているが、結晶構造解析から供与体基質との結合に2つのチロシン残基が重要であることが報告されている(84)。また、*Pasteurella multocida* 由来のST (Δ 24PmST1) は α 2-3 および α 2-6ST 活性、さらにはシアリダーゼ活性および切断したシアル酸を別の糖鎖に転移するトランスシアリダーゼ活性を有する多機能性酵素であり、部位特異的変異導入実験と結晶構造解析により、各機能に関与するアミノ酸残基が明らかになりつつある(85)。海洋性細菌由来のSTに関しても、これまでの研究で *P. sp.* JT-ISH-224 株、*P. phosphoreum* JT-ISH-467 株といったいくつかの海洋性細菌

菌由来 ST が、ST 活性だけでなくシアリダーゼ活性も有する二機能性酵素であることが明らかとなっており、*P. sp.* JT-ISH-224 株においては結晶構造解析の結果から、アスパラギン酸残基が塩基触媒として、ヒスチジン残基が酸触媒としてそれぞれ関与している可能性が示唆されている(86)。そのため、酵素の活性特性と活性中心を形成するアミノ酸の関連性をより詳細に解明することができれば、部位特異的な変異導入による、より高い触媒能、より幅広い受容体基質特異性を有した酵素を作り出すことができると考えている。

以上、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。今後、様々なガングリオシドを研究材料として安定的に供給するために、固定化酵素としての応用や酵素自体の改良を実現させることで、糖鎖と機能の関連性の解明に大きく寄与できるものと考えている。また、ガングリオシドを過剰に発現した細胞株の樹立を目標とした海洋性細菌由来 ST 発現系の構築、および TLC 上のガングリオシドを迅速に MS に供するための簡便な試料調製法の確立を行うことで、今後の研究の方向性を示すことができたと考えている。

参考文献

1. Svennerholm, L., Mandel, P., Dreyfus, H., and Urban, P. (1980) Structure and Functions of Gangliosides. *New York: Plenum*.
2. Varki, A. (1992) Diversity in the sialic acids. *Glycobiology* **2**, 25-40
3. Hakomori, S., and Kannagi, R. (1983) Glycosphingolipids as tumor-associated and differentiation markers. *J. Natl. Cancer Inst.* **71**, 231-251
4. Yogeewaran, G. (1983) Cell surface glycolipids and glycoproteins in malignant transformation. *Adv. Cancer Res.* **38**, 289-350
5. Hakomori, S. (1984) Tumor-associated carbohydrate antigens. *Annu. Rev. Immunol.* **2**, 103-126
6. Varki, A. (1993) Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology* **3**, 97-130
7. Gagneux, P., and Varki, A. (1999) Evolutionary considerations in relating oligosaccharide diversity to biological function. *Glycobiology* **9**, 747-755
8. Hakomori Si, S. I. (2002) The glycosynapse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 225-232
9. Connor, R. J., Kawaoka, Y., Webster, R. G., and Paulson, J. C. (1994) Receptor specificity in human, avian, and equine H2 and H3 influenza virus isolates. *Virology* **205**, 17-23
10. Suzuki, Y., Ito, T., Suzuki, T., Holland, R. E., Jr., Chambers, T. M., Kiso, M., Ishida, H., and Kawaoka, Y. (2000) Sialic acid species as a determinant of the host range of influenza A viruses. *J. Virol.* **74**, 11825-11831
11. Suzuki, Y., Nakao, T., Ito, T., Watanabe, N., Toda, Y., Guiyun, X., Suzuki, T., Kobayashi, T., Kimura, Y., Yamada, A., Sugawara, K., Nishimura, H., Kitame, F., Nakamura, K., Deya, E., Kiso, M., and Hasegawa, A. (1992) Structural determination of gangliosides that bind to influenza A, B, and C viruses by an improved binding assay: Strain-specific receptor epitopes in sialo-sugar chains. *Virology* **189**, 121-131
12. Gamian, A., Chomik, M., Laferriere, C. A., and Roy, R. (1991) Inhibition of influenza A virus hemagglutinin and induction of interferon by synthetic sialylated glycoconjugates. *Can. J. Microbiol.* **37**, 233-237
13. Sigal, G. B., Mammen, M., Dahmann, G., and Whitesides, G. M. (1996) Polyacrylamides Bearing Pendant α -Sialoside Groups Strongly Inhibit Agglutination of Erythrocytes by Influenza Virus: The Strong Inhibition Reflects Enhanced Binding through Cooperative

- Polyvalent Interactions. *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 3789-3800
14. Tsuchida, A., Kobayashi, K., Matsubara, N., Muramatsu, T., Suzuki, T., and Suzuki, Y. (1998) Simple synthesis of sialyllactose-carrying polystyrene and its binding with influenza virus. *Glycoconj. J.* **15**, 1047-1054
 15. Cheresh, D. A., Pierschbacher, M. D., Herzig, M. A., and Mujoo, K. (1986) Disialogangliosides GD2 and GD3 are involved in the attachment of human melanoma and neuroblastoma cells to extracellular matrix proteins. *J. Cell Biol.* **102**, 688-696
 16. Hersey, P., and Jamal, O. (1989) Expression of the gangliosides GD3 and GD2 on lymphocytes in tissue sections of melanoma. *Pathology* **21**, 51-58
 17. Shibuya, H., Hamamura, K., Hotta, H., Matsumoto, Y., Nishida, Y., Hattori, H., Furukawa, K., Ueda, M., and Furukawa, K. (2012) Enhancement of malignant properties of human osteosarcoma cells with disialyl gangliosides GD2/GD3. *Cancer Sci.* **103**, 1656-1664
 18. Fernandez, L. E., Alonso, D. F., Gomez, D. E., and Vazquez, A. M. (2003) Ganglioside-based vaccines and anti-idiotypic antibodies for active immunotherapy against cancer. *Expert Rev. Vaccines* **2**, 817-823
 19. Navid, F., Santana, V. M., and Barfield, R. C. (2010) Anti-GD2 antibody therapy for GD2-expressing tumors. *Curr. Cancer Drug Targets* **10**, 200-209
 20. Paulson, J. C. (1989) Glycoproteins: what are the sugar chains for? *Trends Biochem. Sci.* **14**, 272-276
 21. Chang, M. L., Eddy, R. L., Shows, T. B., and Lau, J. T. (1995) Three genes that encode human beta-galactoside alpha 2,3-sialyltransferases. Structural analysis and chromosomal mapping studies. *Glycobiology* **5**, 319-325
 22. Harduin-Lepers, A., Vallejo-Ruiz, V., Krzewinski-Recchi, M. A., Samyn-Petit, B., Julien, S., and Delannoy, P. (2001) The human sialyltransferase family. *Biochimie* **83**, 727-737
 23. Kurosawa, N., Kojima, N., Inoue, M., Hamamoto, T., and Tsuji, S. (1994) Cloning and expression of Gal beta 1,3GalNAc-specific GalNAc alpha 2,6-sialyltransferase. *J. Biol. Chem.* **269**, 19048-19053
 24. Lee, Y. C., Kurosawa, N., Hamamoto, T., Nakaoka, T., and Tsuji, S. (1993) Molecular cloning and expression of Gal beta 1,3GalNAc alpha 2,3-sialyltransferase from mouse brain. *Eur. J. Biochem.* **216**, 377-385
 25. Taniguchi, N., Honke, K., and Fukuda, M. (2002) Handbook of Glycosyltransferases and

Related Genes.

26. Tsuji, S. (1996) Molecular cloning and functional analysis of sialyltransferases. *J. Biochem.* **120**, 1-13
27. Weinstein, J., de Souza-e-Silva, U., and Paulson, J. C. (1982) Purification of a Gal beta 1 to 4GlcNAc alpha 2 to 6 sialyltransferase and a Gal beta 1 to 3(4)GlcNAc alpha 2 to 3 sialyltransferase to homogeneity from rat liver. *J. Biol. Chem.* **257**, 13835-13844
28. Gleeson, P. A., Teasdale, R. D., and Burke, J. (1994) Targeting of proteins to the Golgi apparatus. *Glycoconj. J.* **11**, 381-394
29. Rabouille, C., Hui, N., Hunte, F., Kieckbusch, R., Berger, E. G., Warren, G., and Nilsson, T. (1995) Mapping the distribution of Golgi enzymes involved in the construction of complex oligosaccharides. *J. Cell Sci.* **108 (Pt 4)**, 1617-1627
30. Gilbert, M., Brisson, J. R., Karwaski, M. F., Michniewicz, J., Cunningham, A. M., Wu, Y., Young, N. M., and Wakarchuk, W. W. (2000) Biosynthesis of ganglioside mimics in *Campylobacter jejuni* OH4384. Identification of the glycosyltransferase genes, enzymatic synthesis of model compounds, and characterization of nanomole amounts by 600-mhz (1)h and (13)c NMR analysis. *J. Biol. Chem.* **275**, 3896-3906
31. Gilbert, M., Karwaski, M. F., Bernatchez, S., Young, N. M., Taboada, E., Michniewicz, J., Cunningham, A. M., and Wakarchuk, W. W. (2002) The genetic bases for the variation in the lipo-oligosaccharide of the mucosal pathogen, *Campylobacter jejuni*. Biosynthesis of sialylated ganglioside mimics in the core oligosaccharide. *J. Biol. Chem.* **277**, 327-337
32. Gilbert, M., Watson, D. C., Cunningham, A. M., Jennings, M. P., Young, N. M., and Wakarchuk, W. W. (1996) Cloning of the lipooligosaccharide alpha-2,3-sialyltransferase from the bacterial pathogens *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Biol. Chem.* **271**, 28271-28276
33. Izumi, M., and Wong, C. (2001) Microbial sialyltransferases for carbohydrate synthesis. *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **13**, 345-360
34. Yuki, N. (2005) Carbohydrate mimicry: a new paradigm of autoimmune diseases. *Curr. Opin. Immunol.* **17**, 577-582
35. Yuki, N., Taki, T., Inagaki, F., Kasama, T., Takahashi, M., Saito, K., Handa, S., and Miyatake, T. (1993) A bacterium lipopolysaccharide that elicits Guillain-Barre syndrome has a GM1 ganglioside-like structure. *J. Exp. Med.* **178**, 1771-1775

36. Yamamoto, T., Takakura, T., and Tsukamoto, Y. (2006) Bacterial sialyltransferases. *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **18**, 253-265
37. Yamamoto, T., Nakashizuka, M., Kodama, H., Kajihara, Y., and Terada, I. (1996) Purification and characterization of a marine bacterial beta-galactoside alpha 2,6-sialyltransferase from *Photobacterium damsela* JT0160. *J. Biochem.* **120**, 104-110
38. Kajihara, Y., Yamamoto, T., Nagae, H., Nakashizuka, M., Sakakibara, T., and Terada, I. (1996) A Novel α -2,6-Sialyltransferase: Transfer of Sialic Acid to Fucosyl and Sialyl Trisaccharides. *J. Org. Chem.* **61**, 8632-8635
39. Yamamoto, T., Nakashizuka, M., and Terada, I. (1998) Cloning and expression of a marine bacterial beta-galactoside alpha2,6-sialyltransferase gene from *Photobacterium damsela* JT0160. *J. Biochem.* **123**, 94-100
40. Kushi, Y., Kamimiya, H., Hiratsuka, H., Nozaki, H., Fukui, H., Yanagida, M., Hashimoto, M., Nakamura, K., Watarai, S., Kasama, T., Kajiwara, H., and Yamamoto, T. (2010) Sialyltransferases of marine bacteria efficiently utilize glycosphingolipid substrates. *Glycobiology* **20**, 187-198
41. Kushi, Y., Tsunoda, A., Komatsuzaki, A., Watanabe, K., Kasama, T., and Handa, S. (1995) Characterization of blood-group-ABO(H)-active glycosphingolipids in type-AB human erythrocytes. *Eur. J. Biochem.* **231**, 862-867
42. Watarai, S., Kushi, Y., Shigeto, R., Misawa, N., Eishi, Y., Handa, S., and Yasuda, T. (1995) Production of monoclonal antibodies directed to Hanganutziu-Deicher active gangliosides, N-glycolylneuraminic acid-containing gangliosides. *J. Biochem.* **117**, 1062-1069
43. Ishikawa, D., and Taki, T. (2000) Thin-layer chromatography blotting using polyvinylidene difluoride membrane (far-eastern blotting) and its applications. *Methods Enzymol.* **312**, 145-157
44. Taki, T., Ishikawa, D., Handa, S., and Kasama, T. (1995) Direct mass spectrometric analysis of glycosphingolipid transferred to a polyvinylidene difluoride membrane by thin-layer chromatography blotting. *Anal. Biochem.* **225**, 24-27
45. Ciucanu, I., and Kerek, F. (1984) A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydrate Res.* **131**, 209-217
46. Mansson, J. E., Mo, H. Q., Egge, H., and Svennerholm, L. (1986) Trisialosyllactosylceramide (GT3) is a ganglioside of human lung. *FEBS Lett.* **196**, 259-262

47. Totani, K., Kubota, T., Kuroda, T., Murata, T., Hidari, K. I., Suzuki, T., Suzuki, Y., Kobayashi, K., Ashida, H., Yamamoto, K., and Usui, T. (2003) Chemoenzymatic synthesis and application of glycopolymers containing multivalent sialyloligosaccharides with a poly(L-glutamic acid) backbone for inhibition of infection by influenza viruses. *Glycobiology* **13**, 315-326
48. Watarai, S., Tana, Inoue, K., Kushi, Y., Isogai, E., Yokota, K., Naka, K., Oguma, K., and Kodama, H. (2001) Inhibition of Vero Cell Cytotoxic Activity in Escherichia coli O157:H7 Lysates by Globotriaosylceramide, Gb3, from Bovine Milk. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **65**, 414-419
49. Yamamoto, T., Hamada, Y., Ichikawa, M., Kajiwara, H., Mine, T., Tsukamoto, H., and Takakura, Y. (2007) A beta-galactoside alpha2,6-sialyltransferase produced by a marine bacterium, Photobacterium leiognathi JT-SHIZ-145, is active at pH 8. *Glycobiology* **17**, 1167-1174
50. Yamamoto, T. (2010) Marine bacterial sialyltransferases. *Mar. Drugs* **8**, 2781-2794
51. Kamimiya, H., Suzuki, Y., Kasama, T., Kajiwara, H., Yamamoto, T., Mine, T., Watarai, S., Ogura, K., Nakamura, K., Tsuge, J., and Kushi, Y. (2013) Unique gangliosides synthesized in vitro by sialyltransferases from marine bacteria and their characterization: ganglioside synthesis by bacterial sialyltransferases. *J. Lipid Res.* **54**, 571-580
52. Kushi, Y., Shimizu, M., Watanabe, K., Kasama, T., Watarai, S., Ariga, T., and Handa, S. (2001) Characterization of blood group ABO(H)-active gangliosides in type AB erythrocytes and structural analysis of type A-active ganglioside variants in type A human erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta.* **1525**, 58-69
53. Kasai, N., Sillerud, L. O., and Yu, R. K. (1982) A convenient method for the preparation of asialo-GM1. *Lipids* **17**, 107-110
54. 福井 裕士 (2008) シアル酸構造と結合位置を認識するモノクローナル抗体と可変領域の解析. 帯広畜産大学大学院畜産学研究科生物資源科学専攻修士論文
55. Kotani, M., Kawashima, I., Ozawa, H., Ogura, K., Ishizuka, I., Terashima, T., and Tai, T. (1994) Immunohistochemical localization of minor gangliosides in the rat central nervous system. *Glycobiology* **4**, 855-865
56. Keranen, A. (1976) Methylation analysis of the major gangliosides of the human alimentary mucosa. *Biochim. Biophys. Acta.* **431**, 96-104

57. Koerner, T. A., Jr., Prestegard, J. H., Demou, P. C., and Yu, R. K. (1983) High-resolution proton NMR studies of gangliosides. 2. Use of two-dimensional nuclear Overhauser effect spectroscopy and sialylation shifts for determination of oligosaccharide sequence and linkage sites. *Biochemistry* **22**, 2687-2690
58. Samuelsson, B. E., Magnusson, S., Rydberg, L., Schersten, T., and Breimer, M. E. (2006) Structural characterization of blood group A glycolipids in blood group A liver tissue in situ perfused with O blood: the dominating presence of type 1 core chain A antigens. *Xenotransplantation* **13**, 160-165
59. Yu, R. K., and Ariga, T. (2000) Ganglioside analysis by high-performance thin-layer chromatography. *Methods Enzymol.* **312**, 115-134
60. Cheng, S. C., Huang, M. Z., and Shiea, J. (2011) Thin layer chromatography/mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1218**, 2700-2711
61. Fuchs, B. (2012) Analysis of phospholipids and glycolipids by thin-layer chromatography-matrix-assisted laser desorption and ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1259**, 62-73
62. Ivleva, V. B., Sapp, L. M., O'Connor, P. B., and Costello, C. E. (2005) Ganglioside analysis by thin-layer chromatography matrix-assisted laser desorption/ionization orthogonal time-of-flight mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **16**, 1552-1560
63. Valdes-Gonzalez, T., Goto-Inoue, N., Hirano, W., Ishiyama, H., Hayasaka, T., Setou, M., and Taki, T. (2011) New approach for glyco- and lipidomics--molecular scanning of human brain gangliosides by TLC-Blot and MALDI-QIT-TOF MS. *J. Neurochem.* **116**, 678-683
64. Suzuki, Y., and Kabayama, K. (2012) Convenient and rapid removal of detergent from glycolipids in detergent-resistant membrane microdomains. *J. Lipid Res.* **53**, 599-608
65. Kamimiya, H., Suzuki, Y., Mathew, A., Kabayama, K., Kojima, H., and Kushi, Y. (2013) Simple and rapid removal of the interference in gangliosides extracted from HPTLC spot on MALDI-TOF MS analysis *Anal. Methods* **5**, 6617-6621
66. Ogawa, H., Kobayashi, T., Yokoyama, I., Nagatani, N., Mizuno, M., Yoshida, J., Kadomatsu, K., Muramatsu, H., Nakao, A., and Muramatsu, T. (2002) Reduction of alpha-galactosyl xenoantigen by expression of endo-beta-galactosidase C in pig endothelial cells. *Xenotransplantation* **9**, 290-296
67. Watanabe, S., Misawa, M., Matsuzaki, T., Sakurai, T., Muramatsu, T., Yokomine, T. A., and

- Sato, M. (2008) Production and characterization of transgenic mice systemically expressing endo-beta-galactosidase C. *Glycobiology* **18**, 9-19
68. Yogeeswaran, G., Sheinin, R., Wherrett, J. R., and Murray, R. K. (1972) Studies on the glycosphingolipids of normal and virally transformed 3T3 mouse fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **247**, 5146-5148
69. Hirabayashi, Y., Sugimoto, M., Ogawa, T., Matsumoto, M., Tagawa, M., and Taniguchi, M. (1986) Reactivity of mouse monoclonal antibody M2590 against B16 melanoma cells with chemically synthesized GM3 ganglioside. *Biochim. Biophys. Acta.* **875**, 126-128
70. Okamoto, K., and Goto, T. (1990) Glycosidation of sialic acid. *Tetrahedron* **46**, 5835-5857
71. Hasegawa, A., Hotta, K., Kameyama, A., Ishida, H., and Kiso, M. (1991) Synthetic Studies on Sialoglycoconjugates 23: Total Synthesis of Sialyl- α (2 \rightarrow 6)-Lactotetraosylceramide and Sialyl- α (2 \rightarrow 6)-Neolactotetraosylceramide. *Journal of Carbohydrate Chemistry* **10**, 439-459
72. Hotta, K., Kawase, T., Ishida, H., Kiso, M., and Hasegawa, A. (1995) Synthetic Studies on Sialoglycoconjugates 75: A Total Synthesis of β -Series Ganglioside GQ1 β . *Journal of Carbohydrate Chemistry* **14**, 961-975
73. Hotta, K., Komba, S., Ishida, H., Kiso, M., and Hasegawa, A. (1994) Synthetic Studies on Sialoglycoconjugates 61: Synthesis of α -Series Ganglioside GM1 α . *Journal of Carbohydrate Chemistry* **13**, 665-677
74. Kameyama, A., Ishida, H., Kiso, M., and Hasegawa, A. (1991) Synthetic Studies on Sialoglycoconjugates 27: Synthesis of Sialyl- α (2 \rightarrow 6)-Lewis X. *J. Carbohydr. Chem.* **10**, 729-738
75. 木曾 真, and 長谷川 明 (1991) 生理活性糖脂質ガングリオシドの系統的化学合成. *油化学*, 370-378
76. Fujikawa, K., Nakashima, S., Konishi, M., Fuse, T., Komura, N., Ando, T., Ando, H., Yuki, N., Ishida, H., and Kiso, M. (2011) The first total synthesis of ganglioside GalNAc-GD1a, a target molecule for autoantibodies in Guillain-Barre syndrome. *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* **17**, 5641-5651
77. Endo, T., Koizumi, S., Tabata, K., and Ozaki, A. (2000) Cloning and expression of beta1,4-galactosyltransferase gene from Helicobacter pylori. *Glycobiology* **10**, 809-813
78. Fukuda, M. N. (1985) Isolation and characterization of a new endo-beta-galactosidase from Diplococcus pneumoniae. *Biochemistry* **24**, 2154-2163

79. Fukuda, M. N., and Matsumura, G. (1976) Endo-beta-galactosidase of *Escherichia freundii*. Purification and endoglycosidic action on keratan sulfates, oligosaccharides, and blood group active glycoprotein. *J. Biol. Chem.* **251**, 6218-6225
80. Fushuku, N., Muramatsu, H., Uezono, M. M., and Muramatsu, T. (1987) A new endo-beta-galactosidase releasing Gal alpha 1---3Gal from carbohydrate moieties of glycoproteins and from a glycolipid. *J. Biol. Chem.* **262**, 10086-10092
81. Hood, D. W., Cox, A. D., Gilbert, M., Makepeace, K., Walsh, S., Deadman, M. E., Cody, A., Martin, A., Mansson, M., Schweda, E. K., Brisson, J. R., Richards, J. C., Moxon, E. R., and Wakarchuk, W. W. (2001) Identification of a lipopolysaccharide alpha-2,3-sialyltransferase from *Haemophilus influenzae*. *Mol. Microbiol.* **39**, 341-350
82. Kim, S., Matsuo, I., Ajisaka, K., Nakajima, H., and Kitamoto, K. (2002) Cloning and characterization of the nagA gene that encodes beta-n-acetylglucosaminidase from *Aspergillus nidulans* and its expression in *Aspergillus oryzae*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **66**, 2168-2175
83. Shen, G. J., Datta, A. K., Izumi, M., Koeller, K. M., and Wong, C. H. (1999) Expression of alpha2,8/2,9-polysialyltransferase from *Escherichia coli* K92. Characterization of the enzyme and its reaction products. *J. Biol. Chem.* **274**, 35139-35146
84. Chiu, C. P., Watts, A. G., Lairson, L. L., Gilbert, M., Lim, D., Wakarchuk, W. W., Withers, S. G., and Strynadka, N. C. (2004) Structural analysis of the sialyltransferase CstII from *Campylobacter jejuni* in complex with a substrate analog. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**, 163-170
85. Ni, L., Chokhawala, H. A., Cao, H., Henning, R., Ng, L., Huang, S., Yu, H., Chen, X., and Fisher, A. J. (2007) Crystal structures of *Pasteurella multocida* sialyltransferase complexes with acceptor and donor analogues reveal substrate binding sites and catalytic mechanism. *Biochemistry* **46**, 6288-6298
86. Kakuta, Y., Okino, N., Kajiwarra, H., Ichikawa, M., Takakura, Y., Ito, M., and Yamamoto, T. (2008) Crystal structure of *Vibrionaceae* *Photobacterium* sp. JT-ISH-224 alpha2,6-sialyltransferase in a ternary complex with donor product CMP and acceptor substrate lactose: catalytic mechanism and substrate recognition. *Glycobiology* **18**, 66-73

謝辞

本博士論文研究を行うにあたり、本研究の実施の機会と懇切なご指導を頂きました日本大学理工学部教授の櫛泰典先生、同大理工学部助教の鈴木佑典先生に深く感謝致します。また、本論文を作成するにあたり、貴重なご助言を頂きました日本大学理工学部教授の澤口孝志先生、同大学理工学部客員教授の貝沼圭二先生、北里大学一般教育部教授の中村和生先生に深く感謝いたします。本研究を実施するに当たり、6種の海洋性細菌由来 ST および *P. damsela* JT0160 株由来の ST 遺伝子をご提供頂きました日本たばこ産業株式会社の山本岳博士、峯利喜博士に深く感謝いたします。第2章、第3章において、SIMS を用いた酵素合成物の構造解析を行うにあたり、多大なご協力を頂いた東京医科歯科大学医歯学研究センター准教授の笠間健嗣先生に深く感謝いたします。第2章、第3章において、ガングリオシドとインフルエンザ A ウイルスの結合実験を行うにあたり、多大なご協力を頂いた大阪府立大学大学院生命環境科学研究科准教授の渡来仁先生に深く感謝いたします。第4章において、TM 領域遺伝子をご提供頂きました独立行政法人農業生物資源研究所研究員の渡部聡博士に深く感謝いたします。さらに、研究遂行にあたり有益なご討論、ご助言を頂きました日本大学・物質生命化学研究室の大学院生、並びに学部生の皆様に心よりお礼申し上げます。