

《農芸化学奨励賞》

有用糖質関連酵素遺伝子の構造と機能に関する研究



独立行政法人理化学研究所フロンティア研究システム 研究員 高 島 晶

さまざまな生理機能をもつ糖鎖を有効利用するうえで、その生合成や分解にかかわる糖質関連酵素遺伝子の研究は欠かせない。本研究では、このうち糸状菌由来のセルラーゼ遺伝子群と、動植物由来のシアル酸転移酵素関連遺伝子群について解析を行ったので、以下にその内容を紹介する。

1. 糸状菌由来のセルラーゼ遺伝子群の解析

セルロースはグルコースがβ1,4結合でつながった直鎖状多糖で、植物体の主要構成成分である。地球上で最も多く存在する炭水化物であるが、現在はその一部が木材やパルプ原料などとして利用されているにすぎず、大部分は未利用のままである。しかし完全分解してグルコースにすれば、食糧やエネルギー源になることから、バイオマス資源としての有効利用が期待されている。

セルラーゼはセルロースを分解する酵素の総称で、セルロースのβ1,4結合を非特異的に分解するエンドグルカナーゼ、末端からセロビオースやグルコース単位に分解するエキソグルカナーゼ（特にセロビオース単位に分解するものはセロビオヒドロラーゼと呼ばれる）、セロオリゴ糖をグルコース単位に分解するβ-グルコシダーゼ、などが知られている（図1）。

本研究では、高温性糸状菌 *Humicola grisea* var. *thermoidea* および強力なセルラーゼ生産菌として知られる *Trichoderma reesei* (*Hypocrea jecorina*) のセルラーゼ系について解析を行った。まず *H. grisea* から9種類の新規セルラーゼ成分を精製し、本菌のセルラーゼ系はβ-グルコシダーゼ活性が高いことや、これらの酵素が耐熱性の酵素であることなどを示し、*Trichoderma* のセルラーゼ系とは異なる特徴をもつことを示した。また *H. grisea* のβ-グルコシダーゼを *Trichoderma* のセルラーゼに加えることで、セルロースの糖化効率を改善できることを示した（図2）。

次に精製酵素のアミノ酸配列情報や既知セルラーゼ遺伝子の配列情報を利用して、*H. grisea* より8種類、*T. reesei* より7種類のセルラーゼ関連遺伝子をクローニングした。これらを当時まだ一般的ではなかった糸状菌 *Aspergillus oryzae* の発現系で大量発現させ、この発現系が糸状菌由来遺伝子の遺伝子操作

に極めて有効であることを示した。さらに本研究では、タンパク質工学的手法を用いてキメラ酵素や変異酵素を作製し、糸状菌セルラーゼに含まれるセルロース結合ドメインの機能解析や酵素活性の強化を試みた。その結果、セルロース結合ドメインをもつセルラーゼにとっては、結晶性セルロースを効率よく分解するうえでこのドメインが必須であること、およびセルロース結合ドメインをもたないセルラーゼにこのドメインを付加することで、酵素の諸性質を改変できる可能性があることなどを明らかにした。

また本研究ではセルラーゼ遺伝子の発現制御機構についての解析も行い、カタボライト抑制に関与している転写因子 CreA (Cre1) が、*H. grisea*, *T. reesei* のセルラーゼ遺伝子の発現制御にも関与している可能性を示した。

2. シアル酸転移酵素関連遺伝子の解析

シアル酸は通常、糖鎖の末端に見いだされる酸性糖で、分子内にカルボキシル基に由来する負電荷を有する。シアル酸を含む糖鎖はこの負電荷を介して他の分子と相互作用するので、免疫、発生、分化、がん化などのさまざまな生命現象において重要な役割を果たしている場合が少なくない。糖鎖へのシアル酸の付加は、シアル酸転移酵素によってなされる。動物の場合、シアル酸転移酵素はシアル酸の転移様式や基質特異性の違いか

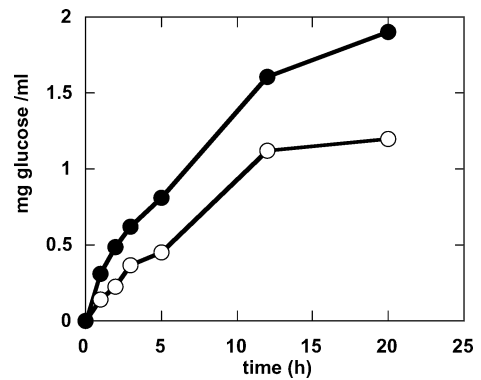


図2 *H. grisea* β-グルコシダーゼの添加によるセルロース糖化の改善
○: *Trichoderma* 由来セルラーゼによるセルロースの分解, ●: *Trichoderma* 由来セルラーゼ+*H. grisea* β-グルコシダーゼによるセルロースの分解

セルラーゼ： セルロースを分解する酵素群の総称

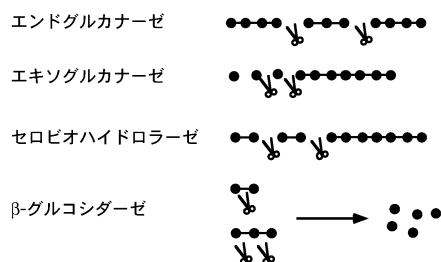


図1 糸状菌のセルラーゼ系

シアル酸転移酵素

ST3Gal-family:	Galにα2,3の結合様式でシアル酸を転移	Siaα2-3Gal-	6種
ST6Gal-family:	Galにα2,6の結合様式でシアル酸を転移	Siaα2-6Gal-	2種
ST6GalNAc-family:	GalNAcにα2,6の結合様式でシアル酸を転移	Siaα2-6GalNAc-	6種
ST8Sia-family:	Siaにα2,8の結合様式でシアル酸を転移	Siaα2-8Sia-	6種

Gal: ガラクトース, GalNAc: N-アセチルガラクトサミン, Sia: シアル酸

図3 シアル酸転移酵素ファミリー

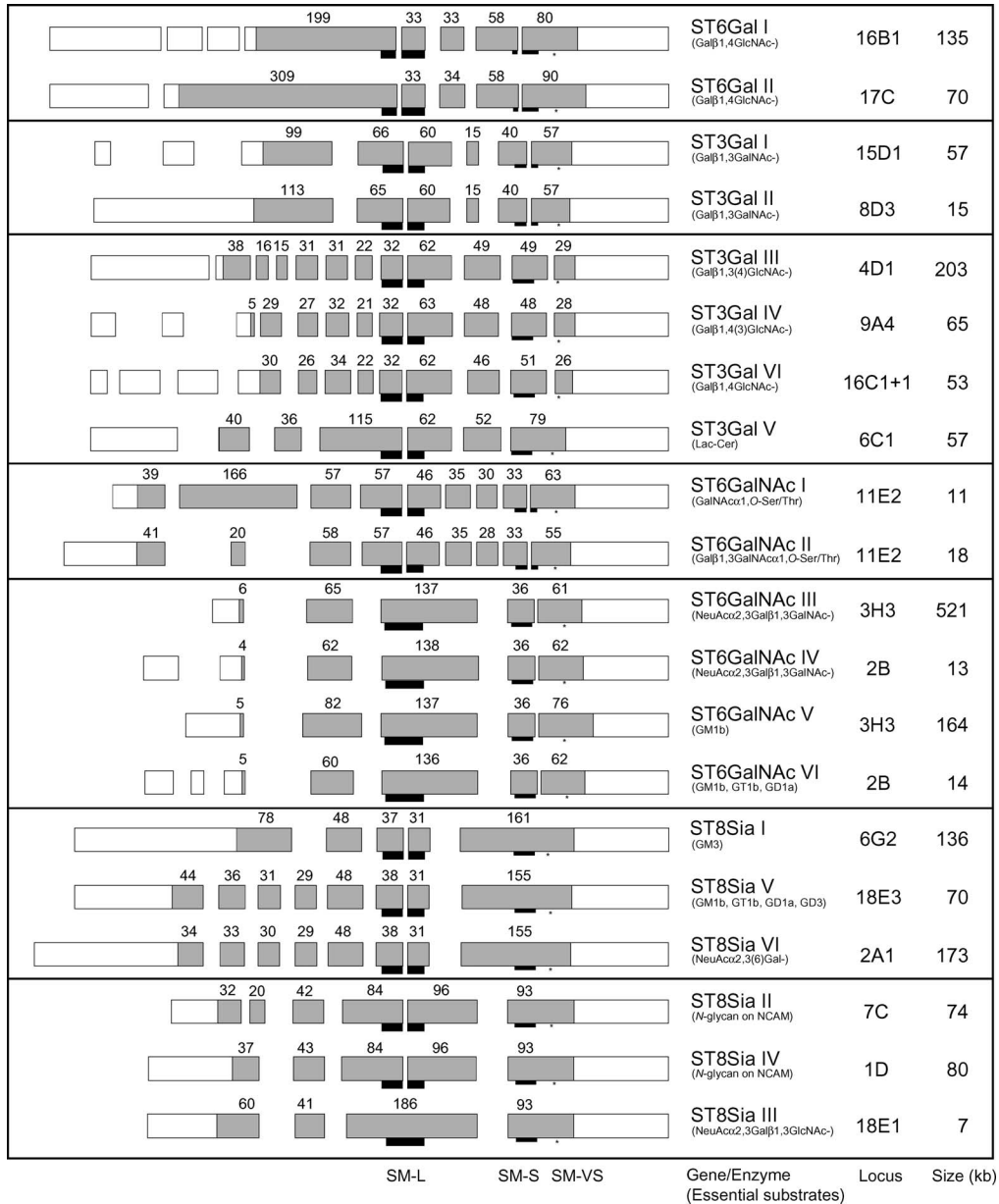


図 4 マウスシアル酸転移酵素遺伝子群のゲノム構造比較
 遺伝子構造の白抜き部分は非翻訳領域を、灰色部分は翻訳領域を示す。翻訳領域の上の数字は当該 exon にコードされているアミノ酸残基数を示す。SM-L, S, VS は動物のシアル酸転移酵素間で保存されているシアルリモチーフを示す。

ら、 α 2,3-シアル酸転移酵素 (ST3Gal), α 2,6-シアル酸転移酵素 (ST6Gal), GalNAc α 2,6-シアル酸転移酵素 (ST6GalNAc), α 2,8-シアル酸転移酵素 (ST8Sia) の四つのファミリーに大別されている (図 3)。

本研究では、シアル酸転移酵素遺伝子群の全貌を解明するため、新規シアル酸転移酵素の cDNA クローニング、シアル酸転移酵素遺伝子のゲノム構造および発現調節機構の解析を行ってきた。cDNA クローニングについては、糖タンパク質中の O-結合型糖鎖に対して高い活性を示すという、従来の α 2,8-シアル酸転移酵素とは異なる基質特異性をもった新規 α 2,8-シアル酸転移酵素 ST8Sia VI や、その存在が全く予想されていなかった第二の α 2,6-シアル酸転移酵素 ST6Gal II などをはじめとする 6 種類のシアル酸転移酵素の cDNA クローニングにかかわり、マウスの全シアル酸転移酵素 (20 種類) の全貌解明に大きく貢献した。

次に各シアル酸転移酵素遺伝子の分子進化的類縁関係を明ら

かにするため、遺伝子のゲノム構造解析を行った。現在ではゲノムプロジェクトの成果により、遺伝子のゲノム構造情報はデータベース検索によって容易に取得することができるが、本研究の開始時にはまだゲノムプロジェクトが進行中であり、データベースからだけではシアル酸転移酵素遺伝子群のゲノム構造情報を入手することは困難であった。そこで常法に従い、各シアル酸転移酵素遺伝子のゲノミック DNA 断片を取得し、シーケンスにより exon-intron 構造を明らかにしていった。このようにして本研究では 10 種類のシアル酸転移酵素遺伝子のゲノム構造解析を行った。その結果、基質特異性が類似している酵素の遺伝子同士は、お互いに類似したゲノム構造をしており、分子進化的に密接な関係にあることが明らかになった (図 4)。そして、この分子進化的類縁関係を考慮すれば、四つに大別されるシアル酸転移酵素ファミリーが、より細かく七つのグループに分類できることを示した。

さらに、ここで取得したゲノミック DNA 断片より、シアル

酸転移酵素遺伝子のプロモーター領域をサブクローニングし、発現調節機構の解析を行った。その結果、神経細胞接着分子上のポリシアル酸合成に関与している α 2,8-シアル酸転移酵素 ST8Sia IV の遺伝子発現には、Sp1 と NF-Y の両転写因子が関与していることが明らかになった。また、ガングリオシド GD3 の合成酵素 (ST8Sia I) や GalNAc α 2,6-シアル酸転移酵素 (ST6GalNAc III, IV) の遺伝子発現にも、Sp1 が関与していることが明らかになった。

ところで、シアル酸は植物には存在しないと考えられているが、植物ゲノム中には動物のシアル酸転移酵素に類似したタンパク質をコードする遺伝子が存在している。そこでそのような遺伝子をイネやシロイヌナズナから取得し、組換えタンパク質を作製して酵素活性を調べてみたところ、イネ由来の2種類のタンパク質についてシアル酸転移酵素様の活性が認められた。これらのタンパク質の植物体内における生理的基質や生理機能はまだ不明であるが、その存在はシアル酸転移酵素の進化や生物界における分布を考えるうえで興味深いといえる。

3. おわりに

以上、本研究では有用糖質関連酵素遺伝子として、主にセルラーゼ遺伝子とシアル酸転移酵素関連遺伝子の解析を行った。現代社会においては、自然災害や人口増加による食糧不足、エネルギー資源の枯渇、環境汚染などのさまざまな問題が生じている。セルラーゼによるセルロース資源の有効利用を目指した本研究が、これらの問題の解決にわずかでも貢献できれば幸いである。またシアル酸転移酵素関連遺伝子の研究については、その成果が疾患の予防、診断、治療や機能性糖鎖の開発などに結びつき、役立つことを期待したい。

本研究は、東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命工学専攻分子育種学研究室 (旧 育種生産工学研究室) ならびに独立

行政法人理化学研究所で行われたものです。糸状菌セルラーゼ遺伝子群の研究を行う機会を与您にいただきました東京大学名誉教授 (現 明治大学教授)・魚住武司先生、ならびにシアル酸転移酵素遺伝子群の研究を行う機会を与您にいただきました東海大学教授・辻 崇一先生には、終始ご指導ご鞭撻を賜りましたこと、心より御礼申し上げます。セルラーゼ遺伝子の研究について直接のご指導、ご激励をいただきました筑波大学助教授・中村 顕先生、ならびにシアル酸転移酵素関連遺伝子の研究の場を引き続き与えていただきました理化学研究所主任研究員・辻本雅文先生に厚く御礼申し上げます。また多くのご助言、ご支援を賜りました東京大学大学院教授・正木春彦先生、同 助教授・日高真誠先生、理化学研究所チームリーダー・橋本康弘先生に深く感謝いたします。菌株・ベクター・試料などのご供与や種々のご援助を賜りました東京大学大学院教授・北本勝ひこ先生、岐阜大学教授・木曾 真先生、東京化成・石田秀樹博士、明治製菓・滝沢登志雄博士、大阪大学助教授・藤山和仁先生、理化学研究所・吉田茂男先生、協和発酵・設楽研也博士、BioWa 社・花井陳雄博士、農業生物資源研究所・川東広幸博士、ならびに国内外の共同研究者の方々に厚く御礼申し上げます。また三重大学・西田 有博士、東京都臨床医学総合研究所・吉田雪子博士、新潟薬科大学・重松 亨博士、日本原子力研究開発機構・飯倉 寛博士をはじめとする東京大学大学院でお世話になりました皆様、ならびに東海大学教授・小島直也先生、NIH 研究員・河野まり博士、理化学研究所・北爪-川口しのぶ博士、阿部知子博士、斎藤臣雄博士、立田由里子氏をはじめとする理化学研究所でお世話になりました皆様に深く感謝いたします。最後に本奨励賞にご推薦くださいました日本農芸化学会関東支部長・太田明德先生ならびにご支援を賜りました諸先生に厚く御礼申し上げます。