



## 酵素法を基盤とした糖質複合分子の機能設計に関する研究

福島工業高等専門学校化学バイオ工学科 尾形 慎

### はじめに

糖質は地球上に存在する有機物の大部分を構成し、すべての生物において多様な役割を担っている。それは、エネルギーや代謝中間体、核酸の構造骨格、細胞壁のような構造体から細胞間認識、タンパク質の品質管理、細菌やウイルスの感染に至るまで、実に多種多様である。このような性質の豊かさは、糖質構造の複雑性や異分子（タンパク質や脂質など）との結びつきによる構造多様性などと密接に関わっており、その多様かつ複雑な分子を化学あるいは酵素合成手法を用いて正確に再構築し、活用する試みが盛んに行われている。さらに、この構造複雑な糖質分子を単純化あるいはモデル化してもなお、天然の精密な機能を維持できないか？あるいは天然物をも超える糖質素材を創り出すことができないか？ということについても現在大きな関心が寄せられている。

このような学術的背景のもと我々は、生物工学的手法で独自に発現した酵素をオリゴ糖鎖合成に適用し、合成糖鎖を分子認識素子に見立て異分子に導入することで人工糖鎖ポリペプチドなど糖質複合分子の汎用性の高い構築法を開発し、実際に天然の分子認識能に“どこまで迫れるのか”生物機能素材としての有効性を展開してきた。また、酵素法によりキチンオリゴ糖を改変・再構築することで有用糖質複合分子へと変換する新しい合成プロセスを開発し、合成素材がリゾチームの加水分解反応機構解明のツールとして極めて有効であることを実証した。以下に、これら研究成果の概要を紹介する。

### 1. インフルエンザウイルス感染阻害剤の構築

人類の脅威となっているインフルエンザウイルス (IFV) の感染は、ウイルス表面ヘマグルチニン (HA) が受容体となり宿主細胞表面のムチン (糖タンパク質) シアロ糖鎖を認識し感染が成立する。宿主ムチンは、高度にグリコシル化された糖鎖構造を有しウイルス感染防御の生体内バリア分子として機能する。

そこで我々は、HA を介したヒト型およびトリ型 IFV の細胞接着機構を逆手にとり、IFV 感染阻害剤“人工ムチン”を設計した。その際、構造を受容体糖鎖部・リンカー部・ポリペプチド部の各モジュールに分割し、これらを単純なプロセスで繋ぎ合わせるモジュール化結合法を開発した。始めに、逐次酵素合成したオリゴ糖鎖をリンカーに繋ぎ配糖化したリンカー結合型糖鎖配糖体を納豆菌由来  $\gamma$ -ポリグルタミン酸 ( $\gamma$ -PGA) 側鎖に組み込むことで、実に簡単にアシアロ糖鎖ポリペプチドを作製する新規構築法を考案した。次に、組換え糖転移酵素をカイコバクミド法により異種発現し、続いて、これら酵素を用いたシアロ酸付加反応により  $\alpha 2,3$  および  $\alpha 2,6$  結合型シアロ糖鎖ポリペプチド (人工ムチン) を構築することで、種々の糖鎖ポリペプチドライブラリーを作製した。このライブラリーからヒト型 IFV の細胞への感染に対し天然シアロフェツインを遥かに超える極めて低濃度 ( $10^{-12} \sim 10^{-14}$  M) で阻害可能な  $\alpha 2,6$  結合型シアロ糖鎖ポリペプチドを見出した<sup>1)</sup>。また、ヒト型 IFV-HA の糖鎖認

識特異性は末端シアロ酸の結合様式に依存し、且つそのコアとなる内部糖鎖の長さ (ヒト型 IFV は長鎖、トリ型 IFV は短鎖) が感染阻止活性に深く関与することを明らかにし、さらにヒト型 IFV 感染阻止の飛躍的増大に関与する内部糖鎖の一部を直鎖アルキル鎖に置き換えても高活性を維持していた<sup>1)</sup>。

また、これとは別に、応用展開を見据え細胞毒性がなく粒子径が 15 nm 程度に制御されたデキストリンナノ粒子を骨格構造に有するシアロ糖多価ナノ粒子をヒト型 IFV 阻害剤として構築した。結果として、このシアロ糖多価ナノ粒子の阻害能は粒子表面のシアロ糖鎖と IFV-HA のシアロ酸結合部位との相互間の適正配置に起因していることを提唱した<sup>2)</sup>。

### 2. 糖鎖クラスター複合分子の設計・合成・機能

一般的に、一对の糖鎖間相互作用は極めて弱い ( $10^{-2} \sim 10^{-3}$  M) ことが知られている。そこで、クラスター化された糖鎖による分子認識能増強効果を  $\gamma$ -PGA やデキストリンナノ粒子以外的高分子 (例えば、粒子や基板など) や中分子にも展開することで、ウイルスや毒素タンパク質などを吸着、検出可能な新素材を開発した。研究成果例として、下記に二つの糖鎖クラスター複合分子の合成とその利用を紹介する。

一つ目は、合成糖鎖微粒子を用いた馬インフルエンザウイルス (EIV) の検出感度向上技術である。馬インフルエンザは、EIV 感染によって起こる著しく伝染性の強い急性の呼吸器感染症として知られている。このサーベイランスには、感染初期の低濃度ウイルスを検出することが重要となる。我々は、EIV の感染プロセスに必須な希少糖 *N*-グリコシルノイラミン酸 (Neu5Gc) を含むオリゴ三糖 “Neu5Gc $\alpha 2,3$ LacNAc” を多価導入した EIV 吸着性糖鎖ポリマーを合成後、直径 1  $\mu$ m の有機シリカ微粒子表面に固定化することで、EIV が馬細胞に結合する原理を逆手にとった EIV 吸着性微粒子を開発した。本微粒子は、クラスター効果により EIV に対し特異的かつ強力な吸着能を有し、この特性をリアルタイム PCR 法と組み合わせることで、従来法では捉えられなかった感染初期の超微量 EIV の検出に成功した<sup>3)</sup> (図 1)。本技術は、馬産業に大打撃を与える伝染性の高い EIV を早期発見可能な検出法として有用であると期待している。

二つ目は、糖鎖のクラスター数を数個程度に制御した構造明

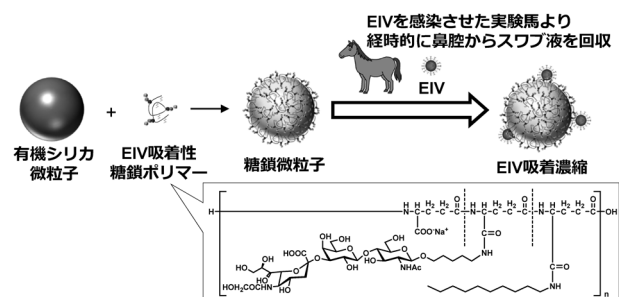


図 1. 合成糖鎖微粒子を用いた EIV 濃縮技術

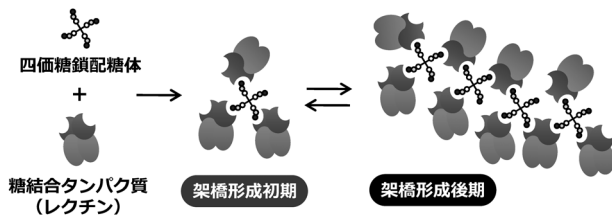


図2. 四価糖鎖配糖体とレクチンとの架橋体形成反応

確な中分子型糖鎖クラスター複合分子である。代表的な合成分子として、金属キレート剤グリコールエーテルジアミン四酢酸(EGTA)の四価カルボキシ基が配位子として“カニばさみ”のように金属を補足するキレート原理に着目し、EGTAをリンカー部とし糖鎖リガンドを配位子に見立てた四価糖鎖配糖体を紹介する。本四価糖鎖配糖体は、多価の糖結合部位を有するレクチンとの反応において、クラスター効果によってもたらされる結合親和力の増大に伴い多重架橋複合体を形成し、抗原抗体反応と同様な反応を誘起した<sup>4)</sup>(図2)。本知見は、糖結合特性によって引き起こされる形態変化を指標とした新たなウイルスや毒素タンパク質の検出アプローチとして化学的に確かな指針を与えることができた。

### 3. リゾチームの遷移状態アナログ阻害剤と新規活性測定基質の分子設計

ニワトリ卵白リゾチーム(HEWL)は、酵素として初めてX線結晶解析によって立体構造が明らかにされたにもかかわらず、その加水分解機構はもまだ議論の対象となっている。そこで、酵素基質複合体形成のモデルとして阻害剤に着目し、HEWL遷移状態アナログ阻害剤キトオリゴ糖末端ラクトン体(GN<sub>3</sub>L, *sp*<sup>2</sup>軌道半イス型)とキトオリゴ糖末端モラノリン体(GN<sub>3</sub>M, *sp*<sup>3</sup>軌道イス型)を設計し、これら二種類を用いて反応機構を再検証した(図3A)。すると、GN<sub>3</sub>Mは強力な拮抗阻害剤(*K*<sub>d</sub>値10<sup>-7</sup>Mオーダー)となるばかりか、HEWLとのX線共結晶構造解析から活性中心上でモラノリン残基がイス型配座していることを発見し、共有結合中間体形成の新たな実証例を示した<sup>5)</sup>(図3B)。これまで、酵素と基質間の複合体形成は、オキソカルベニウムイオン中間体(*sp*<sup>2</sup>型)“Phillips説”と共有結合中間体(*sp*<sup>3</sup>型)“Koshland説”かで論争が絶えなかった。本成果は、天然型HEWLの活性中心に関するX線共結晶構造解析を初めて可能にしたKoshland型阻害剤として、重要な学術的知見である。

さらに我々は、HEWLの糖結合サブサイトと阻害剤との結合親和力解析からヒントを得て、二種類の新規リゾチーム活性測定用基質“4<sup>1</sup>-*O*-β-galactosyl-β-tri-*N*-acetylchitotriosyl 2-acetamide-2-deoxy-2,3-anhydro-glucopyranose (Gal(GlcNAc)<sub>3</sub>DGN)<sup>6)</sup>およびGalβ1,4(GlcNAc)<sub>2</sub>-β-pNP<sup>7)</sup>”をコンピューターシミュレーションにより分子設計した。両基質に共通した化学構造的特徴は、非還元末端にガラクトース残基を有したキトオリゴ糖誘導体という点である。この特徴により、両基質はHEWLのクレフト内に存在する糖結合サブサイトのうち、Gal(GlcNAc)<sub>3</sub>DGNは-3から+2に、Galβ1,4(GlcNAc)<sub>2</sub>-β-pNPは-3から+1に結合し、限定的な加水分解をうけることを実験的に証明した。つまり、両基質はキチンオリゴ糖を基本骨格に持つオリゴ糖分子であるにも関わらず、HEWLによってランダム加水分解を受けないという新知見を得た。結果として、本基質特性をリゾチームの活性評価に利用することで、こ

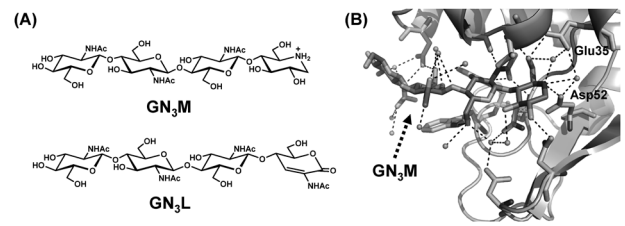


図3. (A) Koshland型とPhillips型それぞれの遷移状態アナログ阻害剤 (B) グリコシル酵素共有結合中間体を支持するGN<sub>3</sub>MとHEWLとのX線共結晶構造解析

れまで評価しにくかった反応速度論解析や活性評価の飛躍的な簡便化が可能になった。

おわりに

我々は、糖質に関わる自然界の普遍現象を手本とし、科学的な疑問解決や社会実装を志向したモノづくりに一貫して取り組んできた。結果、本稿で紹介したいくつかの糖質複合分子を創り上げることに成功した。一方で、これら糖質複合分子をより良いものに仕上げていくアプローチや分子設計に関しては、改善の余地が多分に残されている。今後は、糖鎖合成の技術向上への挑戦と異分野融合研究を推し進めながら、更なる開発研究に取り組んでいきたいと考えている。

(引用文献)

- Ogata M, Hidari KIPJ, Murata T, Shimada S, Kozaki W, Park EY, Suzuki T, Usui T. *Bioconjugate Chem.*, 20, 538-549 (2009).
- Ogata M, Umemura S, Sugiyama N, Kuwano N, Koizumi A, Sawada T, Yanase M, Takaha T, Kadokawa J, Usui T. *Carbohydr. Polym.*, 153, 96-104 (2016).
- Ogata M, Yamanaka T, Koizumi A, Sakamoto M, Aita R, Endo E, Yachi T, Yamauchi N, Otsubo T, Ikeda K, Kato T, Park EY, Kono H, Nemoto M, Hidari KIPJ. *ACS Appl. Bio Mater.*, 2, 1255-1261 (2019).
- Ogata M, Yano M, Umemura S, Murata T, Park EY, Kobayashi Y, Asai T, Oku N, Nakamura N, Matsuo I, Usui T. *Bioconjugate Chem.*, 23, 97-105 (2012).
- Ogata M, Umemoto N, Ohnuma T, Numata T, Suzuki A, Usui T, Fukamizo T. *J. Biol. Chem.*, 288, 6072-6082 (2013).
- Ogata M, Matsui M, Kono H, Matsuzaki Y, Kato Y, Usui T. *Anal. Biochem.*, 538, 64-70 (2017).
- Matsui M, Kono H, Ogata M. *J. Appl. Glycosci.*, 65, 31-36 (2018).

謝辞 本研究は、静岡大学大学院農学研究科生物化学研究室および生物工学研究室、福島工業高等専門学校化学バイオ工学科糖質化学研究室で行われたものです。私に糖質研究の機会と研究者としての素養を与えて下さった恩師碓氷泰市先生に心より感謝申し上げます。本研究を遂行するにあたり、静岡大学の村田健臣先生、朴龍洙先生、会津大学の左一八先生、産業技術総合研究所の鶴沢浩隆先生、近畿大学の深溝慶先生、大沼貴之先生、信州大学の長田光正先生、宇都宮大学の鈴木智大先生、一関高専の戸谷一英先生、茨城高専の若松孝先生、苫小牧高専の甲野裕之先生ならびに多くの先生方に多大なるご支援を賜りました。ここに深く感謝申し上げます。また、本研究成果は、共に同じ目標に向かって昼夜問わず研究に取り組んだ学生諸子の努力の賜物であり、改めて敬意と謝意を表します。最後になりましたが、学生時代より常に温かく応援してくださり、本奨励賞へのご推薦もして下さいました静岡大学グリーン科学技術研究所の河岸洋和先生に厚く御礼申し上げます。