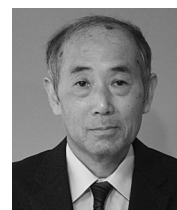


## 微生物によるヘテロオリゴ糖代謝の分子細胞学的解析と複合糖質工学の新展開



石川県立大学 教授 山本 憲二

ヘテロオリゴ糖はデンプンやセルロース、キチンなどのように単純な構造を持つホモ多糖とは異なり、数種の糖によって構成された複雑な構造を持ち、生体内では主としてタンパク質や脂質に結合して複合糖質を形成している。ホモ多糖がエネルギー源や生体保護物質としての役割を持つ一方、ヘテロオリゴ糖は細胞間の認識や発生・分化、疾病の発症など、さまざまな生命現象に深く関与している。筆者は応用微生物学・分子細胞学の立場から、ヘテロオリゴ糖の構造や機能、あるいはその代謝機構を明らかにする目的で研究を行い、複合糖質の科学の新領域を開拓する多くの成果を得た。さらに、ヘテロオリゴ糖の分解と生合成に関わる微生物酵素を有用物質の生産などに応用して、新規な複合糖質工学を発展させた。本講演ではこれらの研究の概要を述べる。

## 1. ヘテロオリゴ糖鎖の生合成に関わる糖ヌクレオチドの発酵生産法の開発

糖ヌクレオチドは多糖類や複合糖質の生合成において糖転移酵素の糖供与体基質として重要な化合物である。ヘテロオリゴ糖鎖の重要な構成糖である *N*-アセチルアミノ糖や *L*-フコースの供与体として働く糖ヌクレオチドは UDP-*N*-アセチルグルコサミン、UDP-*N*-アセチルガラクトサミン、GDP-*L*-フコースで、その生合成に関わる酵素系が複雑なために多量生産は困難であった。しかし、複合糖質の生体内における重要性が認識されるに伴って、これらの糖ヌクレオチドに対する要求性が高まってきた。筆者は乾燥パン酵母を用いた高エネルギー共役発酵法によって UDP-*N*-アセチルグルコサミンや GDP-*D*-マンノースの多量生産法を確立するとともに細菌のエピメリ化酵素を利用して UDP-*N*-アセチルグルコサミンから UDP-*N*-アセチルガラクトサミンを、また、NADP が関与する細菌の酵素系を利用して GDP-*D*-マンノースから GDP-*L*-フコースを多量に生産する方法を開発した。これらの糖ヌクレオチドは判定が困難な変異血液型に対する新しい血液型判定試薬として市場に供給され、輸血や親子鑑定などの法医学領域に貢献している。

## 2. ヘテロオリゴ糖鎖の構造・機能の解明に有用な微生物グリコシダーゼ群の発見

筆者は糖タンパク質や糖脂質のヘテロオリゴ糖鎖の働きに注目し、糖鎖の複雑な構造や多彩な機能を解明するための手段として、土壌などより分離同定した種々の微生物が生産するさまざまな糖質分解酵素を単離精製するとともに、基質特異性など諸性質を解明した。これらの酵素は糖タンパク質・糖脂質のさまざまな糖鎖の  $\alpha, \beta$  立体配置を含む構造および機能の解明に用いられ、汎用性のある酵素 ( $\beta$ -ヘキソサミニダーゼ、 $\alpha$ -*N*-アセチルガラクトサミニダーゼ、 $\alpha$ -*L*-フコシダーゼ、エンド- $\beta$ -*N*-アセチルグルコサミニダーゼ、エンド- $\alpha$ -*N*-アセチルガラクトサミニダーゼ) については上市された。筆者はこれらの酵素を駆使して、糖代謝不全症患者尿中のヘテロオリゴ糖鎖の構造やア

ミラーゼ、プロテアーゼなどの糖タンパク質性酵素の糖鎖の機能など、さまざまな糖鎖の構造や機能を解析した。

## 3. ヘテロオリゴ糖鎖を付加する新奇な微生物酵素の発見と機能性糖鎖複合体の化学-酵素合成

糖質分解酵素 (グリコシダーゼ) はグリコシド結合を加水分解する活性とともに、遊離した糖を水の代わりに水酸基を持つ化合物に転移付加する糖転移活性を示す。筆者は土壌より単離同定した糸状菌 *Mucor hiemalis* が生産する新奇なエンド型グリコシダーゼ (エンド- $\beta$ -*N*-アセチルグルコサミニダーゼ) を発見し、その酵素源にちなんで Endo-M と名づけた。Endo-M は水酸基を持つ化合物に糖鎖供与体から糖鎖を転移付加する高い糖転移活性を有し、その特異な活性を活用してさまざまな化合物に糖鎖を付加することに成功した。細胞内では小胞体とゴルジ体において数十にも及ぶ段階を経て行われる糖鎖の付加反応が Endo-M のみを用いた一段階の酵素反応によって行うことが可能で、このような糖鎖の付加方法は遺伝子工学やタンパク質工学では不可能な機能を付与する方法であり、革新的技法と評価されている。筆者は *N*-アセチルグルコサミンペプチドを化学合成した後、本酵素を用いて糖鎖を付加する糖ペプチドの化学-酵素合成法を開発し、「生理活性糖ペプチドの合成」に初めて成功した (図 1)。すなわち、骨粗鬆症の治療薬のカルシトニンをはじめとするさまざまな生理活性ペプチドに糖鎖を付加した糖ペプチドの合成に成功するとともに、天然界ではアスパラギン残基にのみ付加する糖鎖を、本技法によりグルタミン残基にも付加することが可能となり、グルタミン結合糖鎖を持つサブスタンス P などの生理活性糖ペプチドの合成に成功した。得られたさまざまな生理活性糖ペプチドについて解析を行い、糖鎖が安定性や細胞の受容体との結合に影響を与えることを明らかにした。また、この糖鎖付加技法を活用して、ヒトインフルエンザウイルスの感染阻害剤やヒト型糖鎖を持つ糖タンパク質の合成、糖鎖抗体の作製などを行った。さらに、Endo-M の活性中心付近のアミノ酸残基の置換変異を行うことにより、加水分解活性が抑制され、糖転移活性が著しく上昇した変異酵素の取得に成功し、機能性糖鎖複合体を収率良く合成できるようになった。また、本酵素の反応はオキサゾリン型糖鎖が反応中間体になることを利用して、合成したオキサゾリン型糖鎖を基質とする糖転移反応により得られる生成物を加水分解しないグリコシターゼ様の変異酵素を取得し、Endo-M を物質の生産を目的とした合成触媒に発展させた。

## 4. 糖鎖を介した乳酸菌の腸管接着機構の解析

ウイルスや病原性細菌、細菌毒素が糖鎖を介して細胞に結合し、感染することはよく知られている。筆者はヒト腸管に棲息する腸内細菌の中でも整腸作用など宿主に有益な働きをするラクトバチルス属乳酸菌が宿主の腸管表面に存在する特定の糖鎖 (非還元末端にガラクトース残基を有する糖鎖) に結合するこ

とを見だし、乳酸菌をプロバイオティクスとして活用することに分子レベルでの根拠を与えた。また、腸内の善玉菌の代表であるビフィズス菌がヒト腸管に分泌される血液型物質やムチン糖タンパク質の糖鎖を分解する特有の酵素 (1,2- $\alpha$ -L-フコシ

ダーゼやエンド- $\alpha$ -N-アセチルガラクトサミニダーゼ) を生産することを見だし、これらの酵素と糖鎖との相互作用を介して腸管へ接着することを示唆した。さらに、これらの酵素は遺伝子解析や結晶構造解析の結果、新しい糖加水分解酵素のファミリーに属する酵素であることを明らかにした。

5. 母乳に含まれるビフィズス菌増殖因子オリゴ糖の代謝経路の解明

ビフィズス菌は整腸作用のみならず免疫賦活作用などを発揮することが知られている善玉菌で、母乳で育てられた乳幼児の腸管に優勢に棲息することが知られている。それゆえに母乳中にビフィズス菌の増殖促進因子が存在すると考えられ、一世紀にもわたって探索されてきた。牛乳中に含まれる糖成分のほとんどがラクトース (乳糖) である一方、母乳中にはラクトースのほかにヒトミルクオリゴ糖と呼ばれるヘテロオリゴ糖が多量に含まれている。そこで、母乳栄養児の腸管でビフィズス菌が優勢に生育する因子として、このヒトミルクオリゴ糖が考えられる。筆者は母乳中のヘテロオリゴ糖群に注目し、それらの構成単位である「ラクト-N-ビオース」がビフィズス菌の増殖促進因子であることを示した。また、ヘテロオリゴ糖を分解代謝するビフィズス菌の酵素を網羅的に解析し、ラクト-N-ビオースにまで代謝分解する一連の酵素群 (シアリダーゼ、L-フコシダーゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、 $\beta$ -ヘキソサミニダーゼ、ラクト-N-ビオシダーゼなど) の遺伝子解析を行った。さらに、ラクト-N-ビオースのみを特異的に取り込むトランスポーターをビフィズス菌の菌体膜に発見して、遺伝子解析を行うとともに結晶構造解析を行った (図2)。このトランスポーターは宿主腸管に分泌される糖タンパク質ムチンからビフィズス菌のエンド- $\alpha$ -N-アセチルガラクトサミニダーゼによって遊離されるムチン型糖鎖 (ガラクト-N-ビオース) をも取り込む (図2)。さらに、ラクト-N-ビオースを炭素源として培養した場合、母乳栄養児の腸管に優勢的に棲息するビフィズス菌のみが特異的に増殖し、他の腸内細菌は増殖しないことを明らかにした。これらの結果、ラクト-N-ビオースを粉ミルクに添加して母乳の機

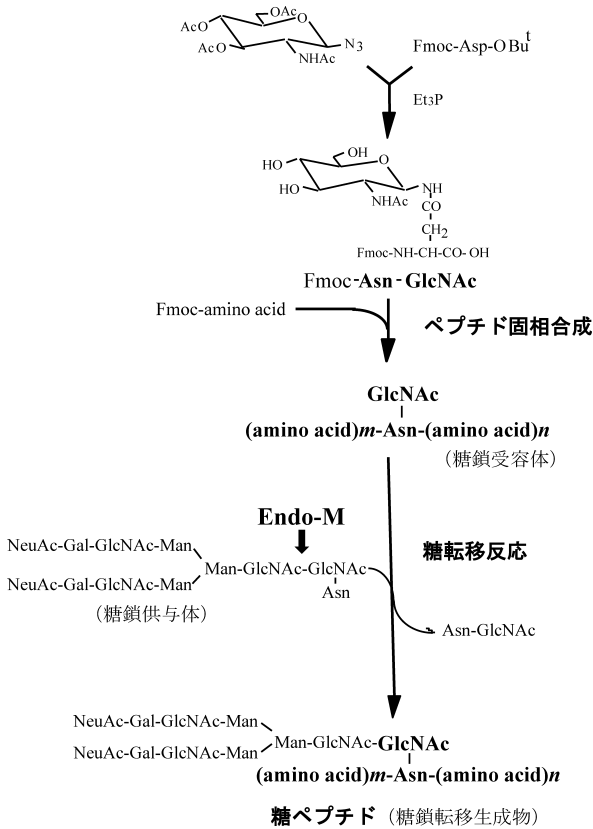


図1 Endo-Mの糖転移活性を利用した糖ペプチドの化学-酵素合成  
 Fmoc-Asp-OBu<sup>t</sup>: Fmoc (9-フルオレニルメチルオキシカルボニル)-アスパラギン酸  $\alpha$ -*t*-ブチルエステル, Et<sub>3</sub>P: トリエチルフォスフィン, NeuAc: N-アセチルノイラミン酸 (シアリ酸), Gal: D-ガラクトース, GlcNAc: N-アセチル-D-グルコサミン, Man: D-マンノース

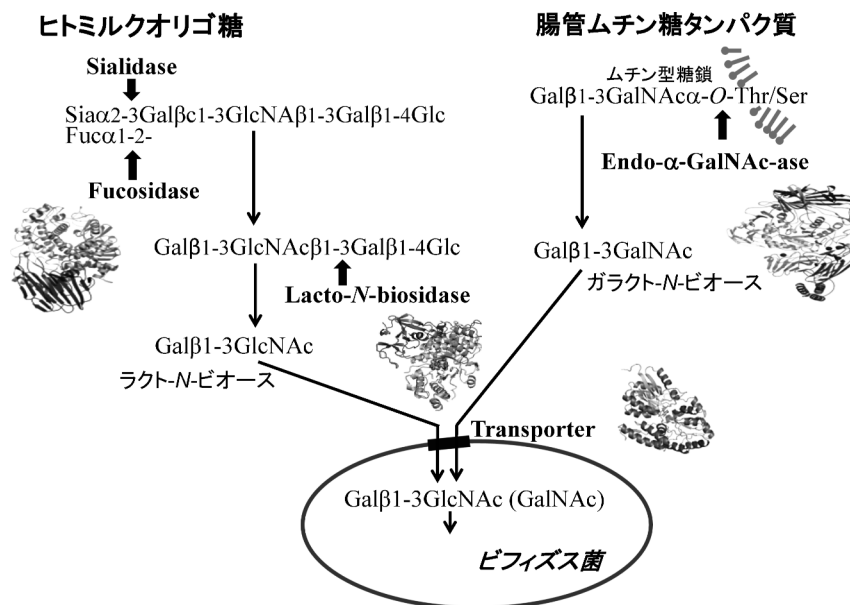


図2 ビフィズス菌によるヒトミルクオリゴ糖およびムチン糖タンパク質糖鎖の代謝  
 Sia: シアリ酸, Fuc: L-フコース, Gal: D-ガラクトース, GlcNAc: N-アセチル-D-グルコサミン, GalNAc: N-アセチル-D-ガラクトサミン, Glc: D-グルコース

能を有する人工乳の開発の可能性を示した。

#### 6. 糸状菌の新奇な細胞膜構成糖脂質の生合成系の解明

ケカビを含む接合菌類が抗真菌剤である Aureobasidin に耐性であることを発見し、その菌体膜が他の糸状菌の菌体膜とは大きく異なる新奇糖脂質から構成されていることを見いだした。構造解析の結果、ガラクトースのみからなる糖鎖構造を明らかにするとともに、新しい糖脂質生合成系を見いだした。

本研究は京都大学農学部食品工学科微生物生産学研究室および京都大学大学院生命科学研究科分子応答機構学、微生物細胞機構学の各研究室において、多くの優秀な学生・院生、研究員の皆様の努力によって成し遂げられた研究の成果です。皆様に

心より感謝を申し上げますとともに、ご指導頂きました京都大学名誉教授の柘倉辰六郎先生と熊谷英彦先生（石川県立大学教授）、奈良女子大学名誉教授の河合弘康先生に厚く御礼を申し上げます。また、本研究に大きな力添えを頂きました野口研究所の羽田勝二博士、稲津敏行博士（東海大学教授）、キリンビール(株)の<sup>故</sup>竹内誠博士、食品総合研究所の北岡本光博士、東京大学大学院の伏信進矢博士、岐阜大学の木曾眞教授、九州大学大学院の竹川薫教授、長浜バイオ大学の伊藤正恵教授、石川県立大学の片山高嶺准教授、京都大学大学院生命科学研究科の芦田久准教授、その他、ご協力いただきました多くの研究機関の皆様に深謝いたします。