

N-3

## 海洋性細菌由来シアル酸転移酵素 (ST) を用いたガングリオシド合成とその応用研究 — 有用なガングリオシド合成ツールの確立 —

Gangliosides synthesis using sialyltransferases (STs) from marine bacteria and its application

- Establishment of valuable tool for gangliosides synthesis -

○上宮悠<sup>1</sup>, 岡本明<sup>2</sup>, 柿沼俊光<sup>2</sup>, 峰利喜<sup>3</sup>, 鈴木佑典<sup>4†</sup>, 櫛泰典<sup>4‡</sup>

\*Hisashi Kamimiya<sup>1</sup>, Akira Okamoto<sup>2</sup>, Toshihiro Kakinuma<sup>2</sup>, Toshiki Mine<sup>3</sup>, Yusuke Suzuki<sup>4†</sup>, Yasunori Kushi<sup>4‡</sup>

**Abstract:** Sialic acids are present in a variety of mammalian glycoproteins and glycosphingolipids (GSLs), usually at the terminal positions of carbohydrate chains. These chains play critical roles in biological phenomena, such as cell-cell recognition, neurite outgrowth and virus infection. The sialic acids are transferred to carbohydrate chains by specific sialyltransferases (STs) in the cell. Therefore, the STs are considered to be key enzymes in biosynthesis of sialylated-glycoconjugates. In this report, we examined GSLs substrates for sialylated-GSLs (gangliosides) *in vitro* synthesis using bacterial STs from marine sources, and demonstrated that these STs could be valuable tool for gangliosides synthesis.

### 1. はじめに

高等動物の細胞膜上には糖脂質や糖タンパク質といった複合糖質が多く存在している。複合糖質は、各種の糖が鎖状に連なった糖鎖を持ち、細胞の様々な生理的環境維持に貢献していることが知られている。複合糖質の中でも、シアル酸 (Sia) と呼ばれる酸性糖を糖鎖非還元末端に持つ糖脂質 (ガングリオシド) や糖タンパク質は、細胞間の認識機構や細胞の分化・悪性化、細菌・ウイルスの感染機構など重要な生命現象に関与している。そのため、これら Sia を持つ複合糖質 (シアリル化複合糖質) を大量かつ持続的に供給することは、複合糖質のより詳細な機能性の解明、並びに糖質を基盤とした新たな医薬品の開発につながる事が期待される。しかしながら、シアリル化複合糖質を生体から精製する作業には莫大な手間と時間が必要となるだけでなく、生体内組織の採取といった倫理的問題も生じるため、持続的に供給していくことは困難を極める。さらに、化学的グリコシル化も一般的に低収率であるため、新しい合成法が望まれていた。

そこで我々は酵素化学的手法に着目し、比較的入手が容易な非シアリル化 (中性) 糖脂質に対して *in vitro* で Sia を付加させることを試みた。

### 2. 研究概要

生体内ではシアル酸転移酵素 (ST) と呼ばれる糖転移酵素によって糖鎖末端に Sia が付加される。近年、我々の研究グループは *Photobacterium damsela* や *Photobacterium leiognathi* といった海洋性細菌が ST を産生している事実を突き止めた。これまでの研究や知見により、細菌由来の ST は、従来の動物由来 ST よりも格段に優れた触媒能と幅広い基質特異性を有していることがすでに明らかになっている。本研究では、この新規 ST の特徴づけ並びに合成ツールとしての有用性を、糖脂質の観点から検証した。

本研究に用いた ST は、Sia を  $\alpha 2-3$  配位で糖鎖末端に付加させる  $\alpha 2,3$ -ST が 3 種類 (#1~3)、Sia を  $\alpha 2-6$  配位で付加させる  $\alpha 2,6$ -ST が 3 種類 (#4~6) の計 6 種類である。基質として用いた中性糖脂質はネオラクト系列やラクト系列、ガングリオ系列の糖脂質である。

結果的に、本酵素は上記の糖脂質群を基質に用いた際に効率良く Sia を転移させた。酵素合成物に関しては各種の機器分析や抗体による免疫染色法などによりその構造を確認した。本酵素によって転移した Sia はいずれも糖鎖末端に結合しており、その結合様式は ST の違いにより  $\alpha 2-3$  配位、 $\alpha 2-6$  配位となっていた。

1: 日大理工・院 (後)・応化 2: 日大理工・学部・応化 3: 日本たばこ・糖鎖ビジネス 4: 日大理工・教員・応化

### 3. 方法

ST は, JT ish-224 株由来 (#1), JT ish-467 株由来 (#2), JT faj-16 株由来 (#3) の $\alpha$ 2,3-ST と, JT ISH-224 株由来 (#4), JT pda-rec 株由来 (#5), JT 0160 株由来 (#6) の $\alpha$ 2,6-ST, 計 6 種類を使用した. 糖供与体は CMP-NeuAc, 基質には, ネオラクト系列, ラクト系列, ガングリオ系列の糖脂質を用いた. 使用した糖脂質の糖鎖構造は Table I に示してある.

酵素反応は糖脂質 25  $\mu$ g に対し, CMP-Sia, 界面活性剤などの試薬, さらに ST (0.1U) 2  $\mu$ l を加えて 37°C で 3 時間反応させた後, C18 カラムにより糖脂質を回収した. これを薄層クロマトグラフィ (TLC) によって展開し, オルシノール試薬によって糖脂質を発色させ, 合成物の有無を確認した.

合成物確認後は, TLC/SIMS や  $^1$ H NMR などの機器分析, あるいはモノクローナル抗体 (mAb) による TLC/免疫染色を用いてシアル酸の結合位置, 結合配位を決定した.

Table I. Glycosphingolipids structures utilized in this study

Neolacto-series	
nLc <sub>4</sub> Cer	Gal $\beta$ 1-4 GlcNAc $\beta$ 1-3 Gal $\beta$ 1-4 Glc $\beta$ 1-1' Cer
nLc <sub>6</sub> Cer	Gal $\beta$ 1-4 GlcNAc $\beta$ 1-3 Gal $\beta$ 1-4 GlcNAc $\beta$ 1-3 Gal $\beta$ 1-4 Glc $\beta$ 1-1' Cer
nLc <sub>2</sub> Cer	Gal $\beta$ 1-4 GlcNAc $\beta$ 1-3 Gal $\beta$ 1-4 GlcNAc $\beta$ 1-3 Gal $\beta$ 1-4 Glc $\beta$ 1-1' Cer
	Gal $\beta$ 1-4 GlcNAc $\beta$ 1-6
Lacto-series	
Lc <sub>4</sub> Cer	Gal $\beta$ 1-3 GlcNAc $\beta$ 1-3 Gal $\beta$ 1-4 Glc $\beta$ 1-1' Cer
Ganglio-series	
GA2	GalNAc $\beta$ 1-4 Gal $\beta$ 1-4 Glc $\beta$ 1-1' Cer
GA1	Gal $\beta$ 1-3 GalNAc $\beta$ 1-4 Gal $\beta$ 1-4 Glc $\beta$ 1-1' Cer

Gal: galactose      Glc: glucose      GalNAc: galactosamine  
GlcNAc: glucosamine      Cer: ceramide

### 4. 結果

海洋性細菌由来 ST は, ネオラクト系列の糖脂質を基質に用いた際に, 効率良く Sia を糖鎖末端に転移させた (Fig.1). 同様に, ラクト系列やガングリオ系列などの糖脂質に対しても Sia を転移させた.

興味深いことに, ガングリオ系列の糖脂質である GA1 や GA2 を基質に用いた際に,  $\alpha$ 2,6-ST において

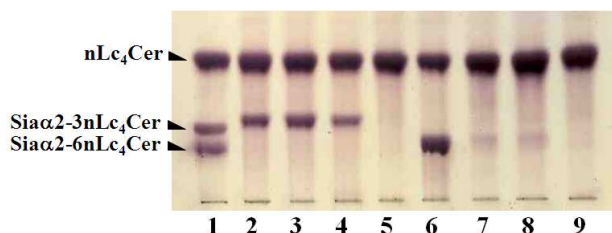


Fig.1 Sialylation of nLc<sub>4</sub>Cer by STs from marine bacteria  
Lane 1 contains the standard GSLs: nLc<sub>4</sub>Cer, Sia  $\alpha$ 2-3 nLc<sub>4</sub>Cer and Sia  $\alpha$ 2-6 nLc<sub>4</sub>Cer from the top. In lanes 2-4, #1, #2 and #3  $\alpha$ 2-3 STs were used, respectively, and #4, #5 and #6  $\alpha$ 2-6 STs were used in lanes 6-8. Lanes 5 and 9 represent TLC without each STs.

合成物が確認された. GA1 や GA2 に Sia が結合したものは GM1, GM2 と呼ばれているが, 自然界では Sia が $\alpha$ 2-3 配位で結合したものしかその存在が確認されていない. そのため,  $\alpha$ 2,6-ST によって合成されたこれらの合成物は, 共に新規のガングリオシドである可能性が高い.

さらに, インフルエンザウイルスとの結合実験の結果から, 人工的に合成したガングリオシドの生理活性が, 天然のガングリオシドと同程度であることも示され, 本酵素の合成ツールとしての有用性が示唆された.

### 5. まとめ・考察

本研究によって, 海洋性細菌由来 ST の特徴的性質が明らかになった. 本酵素は, 糖鎖末端ガラクトース (Gal) に対し, 効率的に Sia を転移させることが可能である. またその際, ST は糖鎖内部のガラクトサミン (GalNAc) やグルコサミン (GlcNAc) といった糖の違いは区別していない可能性が高い. さらに,  $\alpha$ 2,6-STに限っては基質の糖鎖末端が GalNAc であっても Sia を転移させることが可能である.

以上のように, 海洋性細菌由来 ST が, これまでには無かった有用なガングリオシド合成ツールとなりうることを示唆され, 本酵素の有用性が強く示された.

今後は海洋性細菌由来 ST の *in vivo* における有用性にも着目し, 遺伝子レベルでの研究を行っていく予定である. 具体的には, ST 遺伝子を哺乳類由来の細胞株に導入した形質転換細胞を樹立したいと考えている. 前述した通り, 細胞における糖鎖の役割, 特に Sia を有する糖鎖の役割は様々な生命現象において非常に重要である. そのため, 本酵素を細胞で発現させることは, 細胞表面のシアル酸量の増加とともに, 細胞の形態や性質変化, あるいはアポトーシス耐性やウイルス感染力上昇といった, 様々な生命現象の変化を引き起こされると予測できる. そしてこれらの変化を詳細に検討することで, 糖鎖が関与する様々な生命現象に対する新しい知見が得られると期待している.

### 6. 文献・参考文献

- Y Kushi, H Kamimiya, *et al.* (2010) *Glycobiology*. 20: 187-198, T Yamamoto, *et al.* (2007) *Trends Glycosci. Glycotechnol.* 18: 253-265