

| | |
|----------|---|
| 氏名 | あしだ ひさし 芦田 久 |
| 学位(専攻分野) | 博士(農学) |
| 学位記番号 | 論農博第 2331 号 |
| 学位授与の日付 | 平成 12 年 9 月 25 日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第 4 条第 2 項該当 |
| 学位論文題目 | Studies on Microbial Enzymes Acting on Mucin-type Oligosaccharides (ムチン型糖鎖に作用する微生物酵素に関する研究) |
| 論文調査委員 | (主査) 教授 熊谷 英彦 教授 清水 昌 教授 井上 國世 |

論 文 内 容 の 要 旨

糖タンパク質のセリンまたはスレオニン残基の水酸基に結合した O-結合型糖鎖のうち、Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc α 1 \rightarrow Ser/Thr をコア構造とする糖鎖は、ムチン型糖鎖と呼ばれている。正常細胞でのムチン型糖鎖では、コア構造にシアル酸や硫酸基やさらに長い中性糖鎖が結合している。しかし、ガン細胞ではしばしばその不全が観察され、それらは T 抗原 (Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc α 1 \rightarrow Ser/Thr)、Tn 抗原 (GalNAc α 1 \rightarrow Ser/Thr) と呼ばれ、腫瘍マーカーとして診断に利用されている。本論文は、ムチン型糖鎖のコア構造に作用する微生物酵素、 α -N-acetylgalactosaminidase (α -GalNAc-ase) と endo- α -N-acetylgalactosaminidase (endo- α -GalNAc-ase) の諸性質を解明するとともにその応用について研究した結果をまとめたものである。

その主な点は以下のとおりである。

1. *Acromonium* の α -GalNAc-ase 遺伝子の解析とその酵母における発現

土壌より単離した *Acromonium* 属糸状菌が生産する α -GalNAc-ase の遺伝子 (*nagA*) のクローニングを行った。*nagA* は 547 アミノ酸残基からなるタンパク質をコードし、N 末端に 21 アミノ酸残基からなるシグナル配列を有していた。*nagA* を酵母 *Saccharomyces cerevisiae* に導入したところ、本酵素活性は培養液中に存在し、シグナル配列が酵母においても機能することを示した。酵母で発現した NagA は *Acromonium* の天然型酵素と同様の性質を示した。NagA は α -GalNAc 残基に対して高い特異性を有しており、糖鎖の構造や機能の解析のツールとして優れたものであった。NagA のアミノ酸配列は、真核生物由来の α -GalNAc-ase および α -galactosidase (α -Gal-ase) と高い相同性を示し、特に *Aspergillus niger* 由来の α -Gal-aseA と最も高い相同性を示した。系統解析によると、NagA は高等脊椎動物の酵素とは系統が異なり、糸状菌の α -Gal-ase から進化した可能性が高いことが判明した。

2. *Bacillus* 属細菌が生産する endo- α -GalNAc-ase の精製と諸性質の解明

Endo- α -GalNAc-ase は、ムチン型糖鎖とタンパク質との結合部の GalNAc α 1 \rightarrow Ser/Thr に作用し、オリゴ糖を遊離する酵素である。土壌より単離同定した *Bacillus* sp. A198 株の培養上清より、本酵素を単離し、その分子量 (約 110,000)、基質特異性などを解明した。

3. Endo- α -GalNAc-ase の糖転移活性を利用した新規オリゴ糖および糖脂質ミミックの合成

本酵素は Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc α 1 \rightarrow p-nitrophenol (pNP) を糖鎖供与体として、種々の単糖、二糖、糖アルコールに Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc 二糖を転移付加し、新規なオリゴ糖を生成する糖転移活性を有していた。グルコースやマンノースに対して最も効率的に二糖を転移し、その転移率は供与体当たり約 35% であった。本酵素はまた、糖脂質のミミックである T 抗原含有アルキル糖鎖の合成が可能であった。Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc α 1 \rightarrow pNP を糖鎖供与体とした場合、直鎖アルコールへの転移率は、メタノール、エタノール、1-プロパノール、1-ブタノールでは約 70% であった。また、糖鎖供与体として天然糖タンパク質であるアシアロフェツインを用いた場合も糖転移が認められた。合成された T 抗原含有アルキル糖鎖は、T 抗原を介したガンの転移や浸潤を抑制する薬剤として利用できる可能性を示唆した。

4. Endo- α -GalNAc-ase によりムチン型糖鎖を除いたウシフェツインのトリプシン阻害

Neuraminidase および *Bacillus* sp. の endo- α -GalNAc-ase を用いて脱シアロ、脱 O-結合型糖鎖フェツインをそれぞれ調製した。これらのトリプシン阻害活性を調べたところ、天然型フェツインはトリプシンとのモル比 1:1 でトリプシン活性を阻害したのに対し、脱シアロおよび脱 O-型糖鎖フェツインではそれぞれ阻害活性が 1/2, 1/3 に低下した。これらの結果から、ムチン型糖鎖がフェツインのトリプシン阻害活性に関わっている可能性を示した。

論文審査の結果の要旨

糖タンパク質や糖脂質などの複合糖質の糖鎖に作用するグリコシダーゼは糖鎖の構造解析や機能解明のためのツールとして有用である。さらに近年、このようなグリコシダーゼの特異的な糖転移活性を用いて、オリゴ糖や複合糖質の酵素合成も試みられている。特にエンド型グリコシダーゼによる糖転移反応は糖鎖を丸ごとタンパク質や脂質に転移付加させることができるため、糖鎖工学における重要な手段となりつつある。著者は、本研究においてムチン型糖鎖のコア構造に作用する微生物酵素、 α -N-acetylgalactosaminidase (α -GalNAc-ase) と endo- α -N-acetylgalactosaminidase (endo- α -GalNAc-ase) を探索し、その諸性質を解明するとともにその応用について新知見を得た。

評価すべき主な点は以下のとおりである。

1. *Acremonium* 属糸状菌の α -GalNAc-ase 遺伝子 (*nagA*) をクローニングし、酵母に導入し、本酵素の菌体外大量生産を実現した。酵母発現型 NagA はネイティブ酵素と同じ性質を示し、天然基質にも作用することを発見した。

2. *Bacillus* 属細菌が生産する endo- α -GalNAc-ase を単離し、諸性質を明らかにした。本酵素は T 抗原二糖に特異的に作用したが、アグリコンに対しては比較的広い基質特異性を有していることを解明した。

3. *Bacillus* の endo- α -GalNAc-ase が糖転移活性を有することを明らかにし、これを利用して T 抗原を含有する新規オリゴ糖や糖脂質ミミックを合成した。T 抗原含有糖脂質ミミックは、抗 T 抗原モノクローナル抗体とアシアロフェツインとの結合を阻害することを示し、医薬への利用の可能性を示した。

4. Neuraminidase と endo- α -GalNAc-ase を用いて脱 O-型糖鎖フェツインを調製し、そのトリプシン阻害活性が脱糖鎖により低下することを発見した。糖鎖がフェツインのトリプシン阻害に関わっていることを実際に示した。

以上のように、本論文において著者は、動物のムチン型糖鎖に作用する微生物酵素について、性質の解明やクローニングを行った。さらにこれらの酵素が複合糖質の糖鎖の機能解析や新しい複合糖質の合成に利用できることを実際に示した。得られた新知見は酵素化学、および応用微生物学に寄与するところが大きい。

よって本論文は、博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成12年7月14日、論文ならびにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。