

京都大学	博士（生命科学）	氏名	梅川 碧里
論文題目	微生物由来エンドグリコシダーゼが有する特異な糖転移機能の改良とその糖鎖複合体合成への応用		
（論文内容の要旨） Endo-β-N-acetylglucosaminidaseは糖タンパク質のN-結合型糖鎖の基部に作用し、タンパク質側に1残基のN-acetylglucosamine（GlcNAc）を残してオリゴ糖鎖を遊離するエンドグリコシダーゼである。糸状菌<i>Mucor hiemalis</i>由来の本酵素Endo-Mは高マンノース型や複合型などのさまざまなN-結合型糖鎖に作用して加水分解するのみならず、さまざまな化合物の水酸基に糖鎖を付加するという特異的な糖転移活性をも有している。それ故に、Endo-Mの糖転移活性は糖鎖工学の分野において有用な糖鎖付加のツールとなっている。しかし、Endo-Mの糖転移活性により生成した糖転移産物は本酵素の加水分解活性によって分解されるため、糖転移産物を高収率で得ることができない。本研究では、Endo-Mの組換え酵素の活性中心付近のアミノ酸残基に部位特異的変異導入を行い、糖転移産物を高収率で生成する変異体酵素を取得するとともに、さまざまな糖ペプチド・糖タンパク質を効率的に酵素合成することに成功した。また、これまで未解明であった本酵素の糖転移反応のメカニズムについて、詳細な解析を行った。 本研究では糖転移機能が向上した3つの変異体酵素を作成し、その解析を行っている。変異体酵素Y217Fはバクテリア由来のホモログ酵素の部分的立体構造を基にして作成したものであり、糖転移反応において糖鎖受容体に対する親和性が向上したことによって高い糖転移活性を示すことが明らかになった。本変異体酵素は糖転移産物の生成収率がもとの組換え酵素Endo-Mに比較して約8倍向上したが、生成した糖転移産物を加水分解するためにその生成量は急激に減少した。そこで、本酵素のsubstrate-assisted catalytic mechanismと呼ばれる反応機構に着目することによって、糖転移産物を加水分解しない‘glycosynthase-like’に機能する変異体酵素N175Aを作成した。すなわち、ホモログ間で高度に保存されているAsn-175が本酵素の反応中間体形成の鍵残基であることを見出し、反応中間体であるオキサゾリン構造を有する糖鎖誘導体を化学合成して、糖転移反応における糖鎖供与体基質とすることにより、N175Aが糖転移産物を加水分解することなく蓄積するglycosynthase-likeに機能することを見出した。しかし、N175Aは酵素反応の速度が遅く、反応に長時間を要する。そこで、Asn-175をさまざまなアミノ酸残基に変えたN175変異体酵素を作成し、酵素反応を解析した結果、糖転移反応速度がN175Aの約8倍向上した高い活性を持つglycosynthase-like変異体酵素N175Qを取得した。実際、N175Qを用いてPAMP12、Substance Pなどの生理活性ペプチドやRNaseBなどのタンパク質への糖鎖付加を試みたところ、高マンノース型やシアロ複合型の糖鎖構造を有するオキサゾリン誘導体を供与体とすることにより、各々の糖ペプチドや糖タンパク質を高収率で酵素合成することができた。 このように、本研究において、特異的な糖転移活性を有する糸状菌酵素Endo-Mの糖鎖付加機能が飛躍的に向上し、さまざまな糖鎖複合体の効率的な合成が可能になったことが示された。また、反応中間体の形成の鍵残基であるAsn-175を介した糖転移反応のメカニズムを酵素学的解析によって新たに提唱した。			

(論文審査の結果の要旨)

糖鎖はウイルス感染やタンパク質の品質管理、神経伝達などを初めとするさまざまな生命現象に関わる重要な生体物質である。近年では糖鎖の構造と機能に着目することによって糖タンパク質性医薬品など、さまざまな有用糖鎖複合体の創製が試みられている。糖鎖工学の分野における重要な課題の一つは、「種々の構造の糖鎖を目的の化合物に付与する技術の開発」である。本研究は糖鎖付加のツールとして注目されている糸状菌 *Mucor hiemalis* 由来のエンドグリコシダーゼ (Endo-M) の特異な「糖転移活性」について解析し、部位特異的変異を導入することによって酵素の糖鎖付加機能を飛躍的に向上させ、その変異酵素を用いて種々の有用な糖鎖複合体を実用レベルで酵素合成することを可能にしたものである。

Endo-MはN-結合型糖鎖の高マンノース型のみならずシアル酸を含む複合型の糖鎖にも作用する広い特異性を有する酵素で、遊離した糖鎖をさまざまな化合物に転移付加する特異な糖転移活性を有するが、その「糖転移産物」の収率が非常に低いことが実用化のボトルネックであった。また、Endo-Mの研究はこれまで、その糖転移活性の応用が先行し、詳細な酵素学的解析はほとんどなされていなかった。本論文の著者は、Endo-Mの糖転移活性により生成した糖転移産物が強い加水分解活性によって、迅速に分解されることに注目し、活性中心付近の部位特異的変異導入による変異体酵素を作成して、糖転移活性が向上し、加水分解活性が抑制された変異体酵素の取得を試みた。その結果、ホモログの部分的立体構造を基に作成した変異体酵素Y217Fが糖転移活性が向上するとともに糖転移産物を多量に生成することを見出した。さらに、Endo-Mがオキサゾリン誘導体を中間体とするユニークなメカニズムによって反応が進行することに注目して、オキサゾリン糖鎖誘導体を基質とする糖転移反応により、糖転移産物を加水分解することなく蓄積する‘glycosynthase-like’な変異体N175Aを創製することに成功した。この結果からAsn-175が本酵素の反応中間体形成の鍵残基であることを見出した。さらに詳細な解析を進めることにより、極めて効率的なglycosynthase-likeな変異体N175Qを創製するに至った。N175Qは化学合成によって得られるオキサゾリン誘導体糖鎖及び天然由来のN-結合型糖鎖を基質とした糖転移反応によって、種々の生理活性糖ペプチド・糖タンパク質を高収率で生成できることを示している。

本研究の成果は有機合成では困難な「オリゴ糖を化合物に付加する」ことを機能改変した酵素によって容易にかつ効率的に行うことを可能にした画期的なものである。本技術は今後、さまざまな有用糖鎖複合体の物質合成に実用化されることが期待される。また、特異な触媒メカニズムを有する本酵素について詳細な酵素学的解析を行い、触媒活性の鍵となるアミノ酸残基を初めて明らかにした学術的インパクトは大きい。

よって本論文は博士（生命科学）の学位論文として価値のあるものと認めた。なお、平成22年1月25日、論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日