

氏 名	まる いさ ふみ 丸 勇 史
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	論 農 博 第 2361 号
学位授与の日付	平 成 13 年 3 月 23 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 STRUCTURE, FUNCTIONS, AND INDUSTRIAL UTILIZATION OF <i>N</i> -ACYL-D-GLUCOSAMINE 2-EPIMERASE FROM PORCINE KIDNEY (ブタ腎臓由来 <i>N</i> -アシル-D-グルコサミン 2-エピメラーゼの構造、機能及び 工業的利用に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 村 田 幸 作 教 授 熊 谷 英 彦 教 授 加 藤 暢 夫

論 文 内 容 の 要 旨

N-アシル-D-グルコサミン 2-エピメラーゼ (AGE) は、ATP を活性化因子として *N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc) と *N*-アセチルマンノサミン (ManNAc) のエピメリ化反応を触媒する。哺乳類の細胞において、ManNAc はシアル酸の前駆体として重要であるが、その生合成は UDP-GlcNAc 2-エピメラーゼを含む経路で行なわれることが知られており、AGE の生理学的な意義は判っていない。

一方、シアル酸をベースとした新薬が開発され、シアル酸の需要が増大している。従来、シアル酸は天然物から調製されていたが、供給量及びコストの面で問題があり、安価な製造法が望まれていた。近年、ブタ腎臓の AGE とシアル酸リアーゼを用いて、安価な GlcNAc とピルビン酸からシアル酸を合成する方法が提案されたが、AGE の供給が困難であるため実用化されていない。

本研究は、ブタ腎臓由来 AGE の性質、機能及び構造を明らかにすると共に、AGE を用いたシアル酸の製造法を確立し、医薬、化学分野への応用を図ることを目的としている。

第 1 章では、ブタ腎臓由来 AGE の酵素化学的諸性質及び本酵素遺伝子の解析により、本酵素が二機能性のタンパク質であることを明らかにしている。ブタ腎皮質より精製した本酵素の分子量及び諸性質を解析すると共に、本酵素遺伝子で大腸菌を形質転換し、AGE 生産株を構築した。更に、AGE がレニン結合タンパク質 (RnBP) と遺伝子レベルで 99.6% のホモロジーを有することを明らかにした。RnBP は、昇圧系酵素レニンにロイシンジッパーを介して結合し、高分子型レニンを形成すると共に、レニン活性を強く阻害すると報告されている。そこで、AGE がレニン阻害活性及び高分子型レニン形成能を有することを実証し、本質的に異なるエピメラーゼ活性とレニン結合・阻害活性の二機能を有するタンパク質であることを明らかにした。

第 2 章では、二機能を有する AGE の構造と機能の相関性を明らかにするため、X 線結晶構造解析を行っている。大腸菌で発現したブタ腎臓の AGE をハンギングドロップ蒸気拡散法にて結晶化し、重原子同形置換法により立体構造を決定した。AGE は、非対称単位中にホモダイマーとして存在し、各々のサブユニットが 12 本の α ヘリックスから成る α_6/α_6 バレル構造をとっていた。また、バレルの中央には、約 $10 \times 10 \times 10 \text{ \AA}$ の活性クレフトが存在した。その結果、AGE が触媒本質を異にするセルラーゼ、グルコミラーゼやアルギン酸リアーゼ等の糖質関連酵素と同一の基本構造を持つことを明らかにした。更に、AGE (RnBP) に特徴的な構造であるロイシンジッパーモチーフが、ダイマー形成や高分子型レニン形成に必須であるとする従来の説を否定し、イオン相互作用がこれらの構造形成に関与していることを明らかにした。

第 3 章では、シアル酸の完全酵素合成法及び直接結晶化法による簡便な大量製造法を確立している。シアル酸の合成反応は、AGE による GlcNAc のエピメリ化反応と、生じた ManNAc とピルビン酸をシアル酸リアーゼでアルドール縮合する二反応を同一容器内で行うが、GlcNAc に対してピルビン酸を 2 倍当量まで逐次的に添加することによって、GlcNAc からシアル酸への変換率が 75% を超えることを見出した (従来法: 40% 程度)。更に、反応液中のシアル酸含量が高いために、

反応液に直接酢酸を添加することによって純度99%以上のシアル酸の結晶が得られることも見出し、高純度のシアル酸を大量・安価に製造する技術確立した。

第4章では、シアル酸を用いた機能性物質の合成を目的に、シアリルラクトースの合成を行っている。本研究では、初めてノイラミニダーゼの逆反応を見出すと共に、シアル酸とラクトースから、母乳成分である α -2,6-シアリルラクトースと新規な $\text{Gal } \beta 1 \rightarrow 4 (\text{NeuAc } \alpha 2 \rightarrow 6) \text{Glc}$ を合成した。本法は簡便な合成法であるが、反応特異性が低く、受容体（ラクトース）のグルコースまたはガラクトース残基のC6位一級水酸基にシアル酸が優先的に結合されることを示した。

論文審査の結果の要旨

シアル酸は、細胞膜に存在する糖タンパク質や糖脂質の糖鎖の非還元末端に存在し、細胞認識や情報伝達に重要な役割を果たしている。一方、シアル酸の誘導体が、インフルエンザ治療薬や診断薬として実用化されたことからシアル酸の需要が急速に拡大しており、その効率的な製造法が求められている。近年、*N*-アセチルグルコサミン（GlcNAc）とピルビン酸から、*N*-アシル-D-グルコサミン 2-エピメラーゼ（AGE）を用いたシアル酸合成法が提案されたが、ブタ腎臓を AGE の起源としていたため、実用化には至っていない。

本研究では、AGE の工業的利用を図ることを目的に、ブタ腎臓 AGE 及び本酵素遺伝子の諸性質を明らかにし、AGE 生産大腸菌を構築した。また、AGE の立体構造を決定すると共に、本酵素が昇圧系酵素レニンの阻害剤であるレニン結合タンパク質（RnBP）と同一物質であることも明らかにし、糖代謝と血圧調節系との関連性を示唆した。評価すべき点は、次の通りである。

1. ブタ腎臓より AGE を単離し、酵素化学的諸性質を明らかにすると共に、本酵素遺伝子で大腸菌を形質転換することによって、AGE 生産株を構築した。更に AGE の遺伝子解析から、RnBP と極めて高いホモロジーを認めると共に、AGE の RnBP 活性を実証し、AGE と RnBP の同一性を明らかにした。
2. AGE の構造と機能の相関を明らかにするため、重原子同形置換法を用いた X 線結晶構造解析を行い、本酵素の立体構造を初めて決定した。本酵素は、 α_6 / α_6 バレル構造から成り、触媒本質を異にするセルラーゼ、グルコアミラーゼやアルギニンアミナーゼ等の糖質関連酵素と同じ基本骨格を有することを明らかにした。
3. 安価な原料である GlcNAc とピルビン酸から、AGE とシアル酸リナーゼを用いて、簡便かつ効率的なシアル酸合成法及び精製法を確立し、医薬、化学分野への実用的供給を可能とした。

以上のように、本論文は、AGE の酵素化学的及び遺伝学的性質を明らかにすることによって、工業レベルでのシアル酸製造を可能にすると共に、AGE の立体構造を初めて明らかにし、糖質関連酵素の進化系統を考察する重要な端緒を与えた。更に、AGE と RnBP の同一性を証明したことから、本酵素と血圧上昇機構であるレニン-アンジオテンシン系への関連性を示唆し、糖代謝と血圧調節機構を関連づける新規な概念を提出したものであり、酵素化学、酵素利用学、糖質化学、分子進化学及び病態生理学の発展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13年1月11日、論文並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。