

## 論文の内容の要旨

論文題名 微生物機能を用いた  
糖ヌクレオチド及び糖鎖の生産

氏名 遠藤 徹夫

糖鎖は細胞接着・癌・免疫など生体にとって重要な機能に関わる化合物であり、様々な生理活性をもっている。それゆえ、医薬品を中心とした糖鎖の広範な応用の可能性が指摘され、病原性細菌やウイルスの感染予防、毒素の中和、癌の免疫療法など、医薬品の開発が進みはじめている。しかしながら糖鎖の工業的な生産法がなくその供給が限られているため、潜在的可能性が指摘されながらも利用が進んでいないのが現状である。

糖鎖の生産法としては、まず化学合成法が挙げられる。過去多くの先駆的研究により、立体選択的合成法と生物機能解析の面ではさまざまな成果がでてきている。しかし依然として複雑な合成工程、保護・脱保護工程、立体選択性の制御など多くの問題点が残っており、工業的な大量生産法としては不向きである。

これとは別の生産法として酵素合成法があり、具体的にはグリコシダーゼの逆反応を利用する方法と糖転移酵素を利用する方法が知られている。グリコシダーゼの逆反応については、様々なグリコシダーゼも利用可能になってきているが、選択性の低さと収率の低さなどのため工業的な製法には問題点が残る。一方、糖転移酵素を利用した方法では、糖転移酵素のもつ基質特性の厳密さにより高い選択性と高収率が期待できる。理論的には副生産物ができないことから、糖転移酵素を利用する方法は糖鎖の工業的生産に適した方法と考えられているが、利用できる糖転移酵素が少ないことや、原料となる糖ヌクレオチドが高価である点から現在まで実用化に至っていない。

そこで筆者は、従来の発酵生産技術を組み合わせることで、現在まで大量生産法の確立していない糖ヌクレオチド及び糖鎖の工業的生産法を確立すべく検討を開始した。全章にわたって展開される合成法の骨子を以下に要約する。

第一章では微生物機能を用いた糖ヌクレオチド生産プロセスの構築に関して、オロ

ット酸から UTP 転換能をもつ *Corynebacterium ammoniagenes* と糖ヌクレオチド生合成遺伝子を強化した組換え大腸菌とを組み合わせる方法を検討した。筆者は糖ヌクレオチドの生産において、微生物の有する糖ヌクレオチド生合成経路を利用することを考え、糖ヌクレオチド生合成経路上の遺伝子を大腸菌で高発現させる方法を試みた。糖ヌクレオチドの原料となっているのは糖リン酸とヌクレオシド三リン酸 (NTP) であるが、これらを一つの菌株により生産することは困難である。そこで筆者は、単糖から糖リン酸を生産するには糖ヌクレオチド生合成系を強化した組換え大腸菌を用い、NTP の生産には核酸の生産菌である *C. ammoniagenes* を用いて、実際の生産プロセスではこの二つの菌株を組み合わせることを考えた。

具体的には、UDP-Gal 生産システムを構築する場合、大腸菌の UDP-Gal 生合成経路の酵素群 (Galactokinase, Galactose-1-P uridyltransferase, Glc-1-P uridyltransferase) の遺伝子を高発現した組換え大腸菌を作製し、オロット酸から UTP への転換能を有する *C. ammoniagenes* と共役させた。検討の結果、安価な原料である Gal とオロット酸より効率的に UDP-Gal を蓄積させることに成功した。

糖ヌクレオチドには UDP-Gal、UDP-Glc、UDP-GlcNAc、UDP-GalNAc、CMP-NeuAc などピリミジン系ヌクレオチドを基本にしたものと、GDP-Man、GDP-Fuc などプリン系ヌクレオチドを基本にしたものが存在するが、いずれにおいても糖とヌクレオチドから生産されるものであるから、生合成経路上で強化すべき遺伝子をうまく選択することができれば、上述の菌株を組み合わせる方法で様々な糖ヌクレオチドの生産が可能であると考えた。なお、*C. ammoniagenes* と組換え大腸菌を組み合わせるプロセスとしては、CDP-コリンの生産系を応用した。

第二章では先に開発した糖ヌクレオチド生産システムを利用した糖鎖生産システムの開発について論述している。糖転移酵素を用いた糖鎖生産の場合、主な問題点として、

- ①糖ヌクレオチドが高価で利用困難。
- ②糖ヌクレオチドのヌクレオチド部分が糖転移酵素反応を阻害する。
- ③利用できる糖転移酵素が限られている。

の三点がある。筆者はまず、第一章で確立した糖ヌクレオチド生産システムに糖転移酵素をカップリングさせることで、最初の二つの問題点を解決することを考えた。つまり、筆者の考案した糖ヌクレオチド生産システムに糖転移酵素を組み合わせることにより、糖転移反応で遊離したヌクレオチドは *C. ammoniagenes* により効率的に NTP に変換され、再び糖ヌクレオチド生産に利用されることが考えられた。第三の問題点である、利用できる糖転移酵素が限られるという点であるが、これまでに見出された多くの動物細胞由来の糖転移酵素は、そのほとんどが大腸菌で活性を発現せず、工業的生産に利用できないというのが主な理由である。しかし数年前より微生物にも動物細胞由来の糖転移酵素と同じ活性をもつ糖転移酵素が存在することが明らかになってきた。例えば *Neisseria gonorrhoeae* からは  $\beta$ -1,4-ガラクトース転移酵素、 $\alpha$ -1,4-ガラクトース転移酵素、 $\beta$ -1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素などがクローン化され、大腸菌で活性を検出することに成功している。加えてここ数年で爆発的な進歩をとげたゲノム解析技術の進展を考えれば、今後ますます多くの微生物由来の糖転移酵素がクローン化されていくものと思われる。また、これら微生物由来の糖転移酵

素の特徴として、動物細胞由来の糖転移酵素遺伝子と比べ大腸菌で発現が容易であることから、筆者は微生物由来の糖転移酵素遺伝子を用いた糖鎖生産システムの構築を検討した。

具体的には微生物由来の  $\alpha$ -1,4-ガラクトース転移酵素を高発現した組換え大腸菌菌体を UDP-Gal 生産システムに加えて反応させた。その結果、ガラクトース、ラクトース及びオロト酸から 188 g/L のグロボトリオースが蓄積した。また、微生物由来の  $\beta$ -1,4-ガラクトース転移酵素を高発現した組換え大腸菌を用いることで *N*-アセチルグルコサミン、ガラクトース、オロト酸から *N*-アセチルラクトサミンを 123 g/L 蓄積することができた。

第三章では糖鎖生産システムに利用できる新規糖転移酵素の取得について論述している。筆者が開発した糖鎖生産システムでは、大腸菌で発現可能な糖転移酵素が非常に重要であるが、特に微生物由来の糖転移酵素に大腸菌で活性をもつものが多く知られている。例えば第三章で利用した *Neisseria* 由来の糖転移酵素の他にも、*Helicobacter pylori* や *Photobacterium damsela* 等からも数種の糖転移酵素が発見され、大腸菌での高発現化に成功している。しかし現在まで知られている微生物由来の糖転移酵素については他者が権利を保有しているため、商業的な利用の際にはライセンスが必要である。そこで、微生物由来の新規糖転移酵素の取得を目指し、活性を指標としたスクリーニングを行った結果、*H. pylori* より新規  $\beta$ -1,4-ガラクトース転移酵素のクローン化に成功した。さらに本酵素の大腸菌での高発現化に成功し、本酵素を糖鎖生産システムに組み込むことで、1例として *N*-アセチルラクトサミンを効率的に生産することができた。

第四章では糖鎖生産システムの応用範囲を拡大するため、同じピリミジン系の糖ヌクレオチドである CMP-NeuAc の生産プロセスの構築について論述した。CMP-NeuAc 生産システムを構築する場合は、UDP-Gal 生産システムの場合と同様に、CMP-NeuAc 生合成経路上の酵素に着目し、各酵素をコードする遺伝子が大腸菌で高発現させることを考えた。また、CTP の生産においては、CDP コリンの生産プロセスを参考に、UTP から CTP を酵素的に生産する組換え大腸菌と *C. ammoniagenes* を利用することを考えた。

具体的には CMP-NeuAc 生合成経路の酵素群 (CTP synthetase, CMP-NeuAc synthetase) の遺伝子を高発現した組換え大腸菌を作製し、*C. ammoniagenes* と共役させた。その結果、シアル酸とオロト酸から効率的に CMP-NeuAc を蓄積させることができた。

第五章では、第四章で確立した CMP-NeuAc 生産システムを利用し、生体内で様々な生理活性をもつシアル酸含有糖鎖の生産システム確立について論述している。基本的な概念は第二章のガラクトース含有糖鎖生産システムと同様であり、シアル酸転移酵素の原料である CMP-NeuAc の生産システムにシアル酸転移酵素をカップリングさせる方法を検討した。具体的には、まず微生物由来の  $\alpha$ -2,3-シアル酸転移酵素をクローン化し、大腸菌で高発現させた。次にこの組み換え大腸菌を先に開発した CMP-NeuAc 生産システムと共役させ、糖鎖生産を検討した。その結果、オロト酸、

ラクトース、シアル酸を原料として、シアル酸含有糖鎖の一つである 3'-シアリルラクトースが効率的に蓄積した。

以上の検討により、*C. ammoniagenes* と組換え大腸菌の組み合わせにより、世界で初めて効率的で量産化する糖ヌクレオチド及び糖鎖の生産システムの構築が可能となった。微生物機能を利用し、従来大量生産が困難であった糖ヌクレオチド及び糖鎖の大量生産が可能になったことは、今後の糖鎖科学の発展に大きく寄与するものと確信している。