

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 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つことが知られている。これまで糖鎖は主に化学的合成法で合成され、糖鎖の機能解析に極めて大きな貢献をしてきたが、糖鎖構造の複雑さゆえ合成過程の制御が難しく、合成される量もまた種類も十分供給されているとはいえない状況にある。化学的合成方法以外では酵素的合成方法が知られており、これにはガラクトシダーゼの逆反応を用いた方法と糖転移酵素を用いた方法とがある。しかし前者は収率や副生産物に関して問題点があり、後者は基質となる糖ヌクレオチドの工業的製法がないため高価であることから、現在まで糖鎖を大量生産するには至っていない。本研究は糖転移酵素を用いた糖鎖合成の手法に着目し、糖ヌクレオチドの大量生産法および糖鎖生産プロセスの開発を試みたもので、五章よりなる。

序論で糖ヌクレオチドおよび糖鎖の生産法に関する現状を述べたあと、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について述べている。*C. ammoniagenes* と組換え大腸菌を組み合わせるプロセスは、CDP-コリンの生産で実績があるため、実験室レベルである程度の生産性が達成できればスケールアップは容易であることが推定された。

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の遺伝子を高発現した組換え大腸菌菌体と、オロット酸からUTPへの転換能を有する *C. ammoniagenes* の菌体とを混合し、安価な原料であるGalとオロット酸を基質として添加し、界面活性剤の存在下で攪拌し反応を進行させることより、効率的にUDP-Galを蓄積させることに成功した。

第二章では先章で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述べている。糖鎖生産システムの構築においては、糖転移酵素をカップリングさせることにより、基質の糖ヌクレオチドから副生されるヌクレオチドを *C. ammoniagenes* により反応系内で再びNTPに変換し、リサイクル利用することを試みた。また、大腸菌で発現させる糖転移酵素のソースとしては、動物細胞由来の糖転移酵素遺伝子と比べて大腸菌で発現が容易な微生物由来の糖転移酵素遺伝子について検討を行った。

具体的には微生物由来の α -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UDP-Gal 生産システムと共役させた。その結果、ガラクトース、ラクトース及びオロット酸から188g/Lのグロボトリ

オースが蓄積した。また、微生物由来の β -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により *N*-アセチルグルコサミン、ガラクトース及びオロット酸から *N*-アセチルラクトサミンを 123g/L 蓄積させることができた。

第三章では糖鎖生産システムに利用できる新規な糖転移酵素の取得について述べている。本研究で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ことから、微生物由来の糖転移酵素の取得を検討した。その結果、*Helicobacter pylori*より新規 β -1,4-ガラクトース転移酵素のクローン化および高発現化に成功した。本酵素は上記糖鎖製造システムに利用可能であり、1例として *N*-アセチルラクトサミンを 20 時間で 60g/L 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述べた。ここでは CMP-NeuAc 生合成経路の酵素群の遺伝子を高発現した組換え大腸菌を、*C. ammoniagenes* と共役させた。その結果、シアル酸とオロット酸から効率的に CMP-NeuAc を生産することに成功した。

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。具体的には、微生物由来の α -2,3-シアル酸転移酵素を高発現した組換え大腸菌を、先に開発した CMP-NeuAc 生産システムと共役させることにより、シアル酸含有糖鎖を効率的に蓄積した。

終章の総括では、*C. ammoniagenes* と組換え大腸菌を組み合わせた糖ヌクレオチドおよび糖鎖の効率的な大量生産システムを世界に先駆けて構築できたことを述べるとともに、この新システムが従来量産が困難であった多種多様な有用糖ヌクレオチドおよび糖鎖の大量供給を可能にし、今後の糖鎖科学の発展に大きく寄与する可能性について述べている。また、複合微生物系を用いて糖転移酵素機能と糖代謝工学とをドッキングさせたこの新システムは、人工的な生合成システム (artificial biosynthetic system) として応用生物科学に新たな視点を与えることが期待される。

以上、本論文は複合微生物系を用いた糖ヌクレオチドおよび糖鎖の効率的な生産システムを新規に構築したもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって、審査員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。