OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

| | |
|---|---|
| Title | L-ガラクトース含有オリゴ糖生合成に関わる酵素の機能解析 |
| Author(s) | 大橋, 博之 |
| Citation | 大阪大学, 2018, 博士論文 |
| Version Type | VoR |
| URL | https://doi.org/10.18910/70699 |
| rights | |
| Note | |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

様式３

# 論　文　内　容　の　要　旨

| 氏　名　（　大橋　博之　） | |
|---|---|
| 論文題名 | L-ガラクトース含有オリゴ糖生合成に関わる酵素の機能解析 |

論文内容の要旨

オリゴ糖や糖鎖などの糖化合物や、それらがタンパク質や脂質と結合した複合糖質は、その多糖類の構造や、付加している糖残基が生理活性や物性に影響を与えることが知られている。ペクチンやキシログルカンといった天然多糖類は、食品や製剤の分野で、増粘剤、安定剤、ゲル化剤、糊料として利用されており、近年、その物性の改変や植物細胞内における生合成経路の探索が行われている。植物細胞は、自然界での存在量が少ない単糖（希少糖）を細胞壁や糖鎖などの糖化合物の構成要素の一部に利用している。このような希少糖を含む糖化合物の生合成経路の解明には、希少糖ヌクレオチドの入手が必要だが、市販されていないものも多く入手が困難である。希少糖の一種、L-ガラクトース（L-Gal）は、L-フコース（L-Fuc）の分子アナログであり、植物の細胞壁や糖鎖に含有され、細胞壁の強度の維持や成長への関与が指摘されている。また、グアノシン二リン酸（GDP）-L-Fuc新生経路破壊株であるシロイヌナズナ*mur1*変異体では、L-Galを含有する*N*-結合型糖鎖、及びL-Galを含有するキシログルカンが検出されている。しかし、L-Gal残基の転移に関わる酵素は同定されていない。これらの糖転移酵素は、GDP-L-Galをドナー基質とすると予測されるため、GDP-L-Galの入手が必要だったものの、入手は困難だった。そこで本研究でははず、GDP-L-Galの高収率生産系の構築を目指した。さらに、L-Galを含有するタンパク質*N*-結合型糖鎖および、キシログルカンオリゴ糖の生合成に関与するL-Gal転移活性の探索を行った。

第1章では、緒論としてGDP-糖の生合成経路や、タンパク質糖鎖、植物細胞壁合成経路に関する知見、及び先行研究をまとめ、本研究の位置づけを示した。

第2章では、まず、シロイヌナズナ由来GDP-マンノース 3’,5’エピメラーゼ（GME）を用いたGDP-L-Galの生成を試みた。分裂酵母を用いてGMEを発現させた酵素を用い、GDP-L-Galを生成した後、オルタナティブリサイクルHPLCを用い、酵素反応溶液よりGDP-L-Galを精製したが、その収率は15%程度だった。そこで、L-FucとL-Galが分子アナログであることに着目し、生体内においてL-Fucサルベージ経路を構成する、二機能性の酵素、L-フコキナーゼ/GDP-L-Fuc ピロホスホリラーゼ（FKP）を用いた新規合成手法の確立を試みた。ハイスループット解析系を用い、FKPのL-Galに対する至適反応条件の検討を行うことで、97%の転換効率でGDP-L-Galをワンポット合成することが可能となった。さらに、FKP反応溶液からのGDP-L-Gal精製条件を検討することで、わずか3ステップで純度99%以上のGDP-L-Galを、全収率92%で生成する新規ワンポット合成系を構築した。

第3章では、第2章で取得したGDP-L-Galをドナー基質として用い、*mur1*変異株で検出されたL-Gal含有*N*-結合型糖鎖、及びキシログルカンの生合成に関与する酵素の探索を試みた。まず、*N*-結合型糖鎖や、キシログルカンに対する既知のL-Fuc転移酵素のL-Gal転移活性を調査した。*N*-結合型糖鎖生合成における、*A. thaliana* α1,3-L-Fuc転移酵素（*At*FucTA）、*Mus musculus* α1,6-L-Fuc転移酵素（*Mm*Fut8）は、共に*N*-結合型糖鎖へのL-Gal転移活性を示した。また、キシログルカンの生合成に関与するL-Fuc転移酵素（*At*FUT1）は、キシログルカンオリゴ糖に対するL-Gal転移活性を示した。以上のように、*mur1*変異体で検出されたL-Gal含有糖鎖の生合成には、*At*FucTAや*At*FUT1といった、L-Fuc転移酵素が関与していることを明らかにした。さらに、*Mm*FUT8による新規L-Gal含有糖鎖の合成を行い、L-Fuc類縁体を含有する新規糖鎖生合成に、α-L-Fuc生合成酵素が利用可能であることを見出した。本研究では、FKPを用いた高効率GDP-L-Galワンポット生産系の構築を行い、L-Fuc転移酵素がL-Gal転移活性を有することを示した。

第4章では、第2章、第3章で得られた結果を総括するとともに、本研究で構築されたGDP-L-Gal高収率生産系の新規糖ヌクレオチド合成への展望や、それらを用いた新規糖化合物合成、植物細胞壁に含有される他のL-Galの転移に関わる酵素の探索における今後の展望を記述した。

様式 7

# 論文審査の結果の要旨及び担当者

| 氏　名 | （　大橋　博之　） |
|---|---|

| | （職） | 氏　名 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | | |
| 主 査 | 教授 | 藤山　和仁 |
| 副 査 | 教授 | 福崎　英一郎 |
| 副 査 | 教授 | 村中　俊哉 |
| 副 査 | 教授 | 渡邉　肇 |
| 副 査 | 教授 | 紀ノ岡　正博 |
| 副 査 | 教授 | 大政　健史 |
| 副 査 | 教授 | 内山　進 |
| 副 査 | 教授 | 永井　健治 |

## 論文審査の結果の要旨

植物は、細胞壁や糖鎖の構成成分として、自然界での存在量が少ない単糖（希少糖）を利用している。しかし、これら希少糖を含有する多糖類の生合成経路は解明されておらず、生合成に関わる酵素の探索が行われている。希少糖を転移する酵素の探索には、ドナー基質となる希少糖ヌクレオチドの入手が必須と予測されるが、市販されていないものも多く入手が困難であるため、探索を行う上でのボトルネックとなっている。

本論文で学位申請者は、L-フコース（L-Fuc）の分子アナログであり、植物の細胞壁や糖鎖を構成として、植物細胞壁の強度の維持や成長への関与が指摘されている希少糖の一種、L-ガラクトース（L-Gal）をターゲットとし、研究を進めている。先行研究において、GDP-L-Fuc新生経路破壊株であるシロイヌナズナ*mur1*変異体では、L-Galを含有する*N*-結合型糖鎖、及びL-Galを含有するキシログルカンが検出されているが、L-Gal残基の転移に関わる酵素は同定されていなかった。これらの糖転移酵素は、グアノシン二リン酸（GDP）-L-Galをドナー基質とすると予測される。そこで学位申請者は、GDP-L-Galの高収率生産系を構築している。さらに、生産したGDP-L-Galを用い、L-Galを含有するタンパク質*N*-結合型糖鎖およびキシログルカンオリゴ糖の生合成に関与するL-Gal転移活性を*in vitro* で検出し、L-Gal含有糖鎖およびキシログルカンの生合成にL-Fuc転移酵素が関与していることを明らかにしている。

第1章では緒論として、植物細胞における糖ヌクレオチドの生合成経路、タンパク質糖鎖の構造および生合成経路、植物細胞壁多糖類の構造及び生合成経路に関する知見や先行研究を示し、本研究を着想するに至った経緯を記述している。また、研究の過程で用いた酵素類についても、その反応機構や先行研究で得られた知見をまとめている。

第2章では、シロイヌナズナ由来GDP-マンノース 3’,5’エピメラーゼ（GME）と、L-フコキナーゼ/GDP-L-Fuc ピロホスホリラーゼ（FKP）を*Schizosaccharomyces pombe*で発現させ、酵素法によるGDP-L-Galの生成を試みている。L-FucとL-Galが分子アナログであることに着目することで、生体内においてL-Fucサルベージ経路を構成する、FKPを用いた新規合成手法を確立し、97%の転換効率でGDP-L-Galをワンポット合成することを可能にした。さらに、FKP反応溶液からのGDP-L-Gal精製条件を検討し、わずか3ステップで純度99%以上のGDP-L-Galを、全収率92%で生成する新規ワンポット合成系を構築している。

第3章では、第2章で取得したGDP-L-Galをドナー基質として用い、前述した*mur1*変異株で検出されたL-Gal含有*N*-結合型糖鎖、及びキシログルカンの生合成に関与する酵素の探索を行っている。*N*-結合型糖鎖生合成酵素、*A. thaliana* α1,3-L-Fuc転移酵素（AtFucTA）は、*in vitro* においてL-Gal転移活性を有することを示している。また、キシログルカン生合成に関与するL-Fuc転移酵素（AtFUT1）が、*in vitro* において、キシログルカンオリゴ糖に対するL-Gal転移活性を有することを示している。以上の結果より、学位申請者は、*mur1*変異体で検出されたL-Gal含有糖鎖やキシログルカンオリゴ糖の生合成に、既知のL-Fuc転移酵素である、AtFucTAやAtFUT1が関与していることを明らかにした。さらに、L-Gal含有糖鎖は検出されていないものの、*Mus musculus* α1,6-L-Fuc転移酵素（MmFUT8）のL-Gal転移活性を示し、新規L-Gal含有糖鎖の合成を行うとともに、L-Fuc類縁体を含有する新規糖鎖生合成に、α-L-Fuc生合成酵素が利用可能であることを見出している。

第4章では、結論として第2章、第3章で得られた結果について総括するとともに、本論文執筆時点で解明されてい

た、FKP、MmFUT8の結晶構造解析データを基にした、L-Gal転移活性向上や基質認識機構の改変について考察し、本研究で構築されたGDP-L-Gal高収率生産系の新規糖ヌクレオチド合成への展望や、それらを用いた新規糖化合物合成、植物細胞壁に含有される他のL-Galの転移に関わる酵素の探索における今後の展望を記述している。

以上のように、本論文において、FKPを用いた高効率GDP-L-Galワンポット生産系の構築が可能になり、FKPがL-Fucの構造類縁体を含む糖ヌクレオチドの生成に利用可能であることを示した。また本論文から、植物細胞内におけるL-Gal含有オリゴ糖の生合成にAtFucTAやAtFUT1が関与しているという重要な知見が得られた。加えて、AtFucTAのみならず、MmFUT8もL-Gal転移活性を有することから、L-Fuc転移酵素を基にした新規L-Gal転移酵素の発見や、L-Gal含有オリゴ糖の生産に貢献すると期待される。

よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。