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

博士学位論文

L-ガラクトース含有オリゴ糖生合成に関与する酵素の機能解析

大橋 博之

2018 年 5 月

大阪大学大学院工学研究科
生命先端工学専攻　生物工学コース

目次

略語一覧 3

第 1 章　緒言 5

1.1　糖ヌクレオチド 6

1.2　植物細胞壁生合成に関与する糖ヌクレオチドとその生合成経路 7

1.3　GDP-L-Fuc 生合成経路 8

1.4　植物における GDP-L-Gal 生合成 10

1.5　化学的手法による GDP-L-Gal 合成 12

1.6　タンパク質の *N*-結合型糖鎖修飾 13

1.7　陸上植物における細胞壁とその構成成分 15

1.8　キシログルカンの構造、生合成経路 16

1.9　ペクチンの構造 20

1.10　植物細胞における Gal 転移酵素 21

1.10.1.　糖転移酵素ファミリーと Gal 転移酵素 22

1.10.2.　植物の *N*-結合型糖鎖生合成に関与する Gal 転移酵素 22

第 2 章　GDP-L-ガラクトース生産系の構築 27

2.1　緒論 27

2.2　実験材料及び方法 29

2.2.1.　使用した試薬 29

2.2.2.　使用菌株 29

2.2.3.　*A. thaliana* 培養細胞 T87 破砕溶液からの GME 部分精製酵素の調製 29

2.2.4.　GDP-D-Man-3',5'-エピメラーゼ発現ベクターの構築 30

2.2.5.　*A. thaliana* GDP-マンノース 3',5'-エピメラーゼの発現及び精製 31

2.2.6.　Anti-His-tag 抗体を用いた精製タンパク質の解析 32

2.2.7.　GME 酵素反応産物の解析 33

2.2.8.　GDP-Man3',5'-エピメラーゼを用いた GDP-L-Gal 調製 34

2.2.9.　オルタナティブリサイクル HPLC システムを用いた GDP-L-ガラクトース精製 35

2.2.10.　L-フコキナーゼ/GDP-L-Fuc ピロホスホリラーゼの発現および精製 36

2.2.11.　L-フコキナーゼ/GDP-L-Fuc ピロホスホリラーゼの酵素活性測定 37

2.2.12.　FKP を用いた GDP-L-Gal 生産 39

2.2.13.　FKP 反応溶液からの GDP-L-Gal 精製 39

2.2.14.　FKP 生成産物の解析 40

2.2.15.　Matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) による解析 41

2.2.16.　Proton nuclear magnetic resonance spectroscopy（^{1}H-NMR）解析 42

2.3　結果 43

2.3.1. GDP-D-Man-3',5'-エピメラーゼ酵素活性測定系の構築 43
2.3.2. 組換え GDP-D-Man-3',5'-エピメラーゼの発現と精製 45
2.3.3. 組換え GDP-D-Man-3',5'-エピメラーゼの酵素活性 47
2.3.4. 組換え GDP-D-Man-3',5'-エピメラーゼを用いた GDP-L-Gal 調製 48
2.3.5. 組換え FKP の酵素学的解析 52
2.3.6. 組換え FKP を用いた GDP-L-Gal 生産系の構築 56
2.3.7. GDP-L-Gal の精製 57
2.3.8. 精製 GDP-L-Gal の構造解析 61
2.4 考察 62
2.5 結言 65
第 3 章 L-ガラクトース転移活性の検出と機能解析 66
3.1. 緒論 66
3.2. 実験材料及び方法 67
3.2.1. 使用した試薬・菌株 67
3.2.2. His タグ融合マウス α1,6-L-Fuc 転移酵素（*Mm*FUT8）の発現及び精製 68
3.2.3. His タグ融合 *A. thaliana* α1,3-L-Fuc 転移酵素（*At*FucTA）の発現及び精製 68
3.2.4. *Mm*FUT8、*At*FucTA の酵素活性測定 69
3.2.5. *Mm*FUT8、*At*FucTA 酵素反応産物の解析 70
3.2.6. PA 標識キシログルカン断片の調製 71
3.2.7. 細胞壁生合成に関わる L-Fuc 転移酵素の発現 72
3.2.8. キシログル L-Fuc 転移酵素 AtFUT1 の活性測定 73
3.2.9. 酵素反応産物の解析 74
3.2.10. 単糖組成分析 75
3.3. 実験結果 76
3.3.1. *N*-結合型糖鎖生合成に関わる L-Fuc 転移酵素の L-Gal 転移活性測定 76
3.3.2. *Mm*FUT8、*At*FucTA 生成産物の解析 78
3.3.3. L-Fuc 転移酵素の GDP-L-Gal に対する酵素学的パラメーターの算出 79
3.3.4. 2-アミノピリジン標識植物細胞壁多糖類の調製 80
3.3.5. キシログルカンオリゴ糖に対する L-Gal 転移活性の検出 81
3.3.6. AtFUT1 により生成されたキシログルカンオリゴ糖の構造解析 83
3.3.7. AtFUT1 の酵素学的解析 84
3.4. 考察 88
3.5. 結言 91
第 4 章 総括 92
参照論文 94
本報に関する論文 110

略語一覧

Man ... マンノース
Glc ... グルコース
Gal ... ガラクトース
Gul ... グロース
Fuc ... フコース
GalUA ... ガラクツロン酸
GlcUA ... グルクロン酸
GlcN ... グルコサミン
GlcNAc ... *N*-アセチルグルコサミン
GalNAc ... *N*-アセチルガラクトサミン
NeuAc ... *N*-アセチルノイラミン酸
Rha ... ラムノース
Glc ... グルコース
Xyl ... キシロース
Api ... アピオース
Ara ... アラビノース
Dha ... 3-デオキシ-D-リキソ-2-ヘプツロサル酸
Kdo ... 3-デオキシ-D-マンノ-2-オクツロソン酸
Ace ... アセル酸

NTP ... ヌクレオシド三リン酸
NDP ... ヌクレオシド二リン酸
ATP ... アデノシン三リン酸
ADP ... アデノシン二リン酸
AMP ... アデノシン一リン酸
GTP ... グアノシン三リン酸
GDP ... グアノシン二リン酸
GMP ... グアノシン一リン酸
NAD^+ ... ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（酸化型）
NADH ... ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（還元型）

HPLC ... 高速液体クロマトグラフィー
MALDI ... マトリックス支援レーザー脱離イオン化法
ESI ... エレクトロスプレーイオン化法
TOF-MS ... 飛行時間型質量分析法
MP-CE ... マルチプレックスキャピラリー電気泳動

Tris ... 2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール

EDTA ... エチレンジアミン四酢酸
SDS ... ラウリル硫酸ナトリウム
TEMED ... テトラメチルエチレンジアミン
NAA ... ナフタレン酢酸
PMSF ... フッ化メチルフェニルスルホニル
PA ... 2-アミノピリジン
IMAC ... 固定化金属イオンアフィニティークロマトグラフィー

第1章　緒言

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[1, 2]。糖化合物や複合糖質を構成する糖残基は、小胞体やGolgi体内腔に局在する糖転移酵素により生合成される。基質として利用されるヌクレオシド-二リン酸-糖（NDP 糖）は、新生経路や再利用経路により細胞質において生合成され、小胞体やGolgi体内腔へ輸送され、糖転移酵素に利用される[3]。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[4-6]や植物細胞内における生合成経路の探索[7]が行われている。

植物は、自然界での存在量が少ない単糖（希少糖）を構成要素とする多糖類を有する。植物は、希少糖を含む糖ヌクレオチドを多数生合成しているが、それらは多くが市販されておらず、入手が非常に困難である。植物細胞壁生合成経路の探索や、希少糖を含有する機能性糖質の作出などには、希少糖を含む糖ヌクレオチドが必要であり、その合成手法の構築は、新規糖転移酵素の発見や、新規機能性糖質の作出への貢献が期待される。

1.1 糖ヌクレオチド

糖転移酵素は、糖供与体から、糖類もしくはそれ以外のアクセプター基質上に糖残基を付加する酵素の総称である[8, 9]。糖転移酵素は糖供与体として、エネルギー準位の高い糖類、つまり糖ヌクレオチドを必要とする[10]。糖ヌクレオチドは、アデノシン、グアノシン、シチジン、ウリジン、チミジンなどのヌクレオシドと単糖が 1 つ、または 2 つのホスホジエステル結合で結合した、単糖の活性型である。生体内において、糖ヌクレオチドは、細胞質において、主に新生経路、再利用経路の 2 つの経路で生合成される。新生経路は、UDP-Glc、GDP-D-Man などを初発基質とした変換反応により、多様な糖ヌクレオチドが新たに生合成される経路である[11-13]。一方、代表的な再利用経路は、各種ピロホスホリラーゼにより、多糖類の分解などで生じた、細胞内の糖 1 リン酸とヌクレオチドから、糖ヌクレオチドが生成される経路である[14, 15]。これらを含め、現在、以下の Table 1.1-1 に示す 7 つの主要な糖ヌクレオチド生合成経路が知られている。

Table 1.1-1 糖ヌクレオチドの主要な生合成経路

（Mohnen *et al*., Bar-Peled and O'Neil [15, 16]）

Pathway	Reaction
Photosynthesis	Glc + ATP → → ADP + Glc-6-P → → Glc-1-P + UTP → UDP-Glc + pyrophosphate (PPi)
Salvage	Sugar + ATP → → ADP + Sugar-1-P + NTP → NDP-Sugar + PPi
CMP-Sugar synthesis	Sugar + CTP → CMP-Sugar
Interconversion	NDP-Sugar A ⇄ NDP-Sugar B
Transformation	NDP-Sugar C + Sugar D-1-P → Sugar C-1-P + NDP-Sugar D
Mobilization	Sucrose + UDP → UDP-Glc
Recycling	Glycan + Pi → Sugar-1-P + NTP → NDP-Sugar + PPi

生合成された糖ヌクレオチドは、トランスポーターにより小胞体やゴルジ体内腔に輸送され、糖転移酵素基質として利用される[3]。

1.2　植物細胞壁生合成に関与する糖ヌクレオチドとその生合成経路

現在、少なくとも 30 種類の糖ヌクレオチドが植物細胞より検出されている[16-18]。陸上植物では、前述した糖ヌクレオチド生合成経路に加え、光合成や植物細胞壁の分解といった代謝や異化による経路からも糖ヌクレオチドが供給される。Table 1.2-1 にこれらの糖ヌクレオチド代謝経路を示す[15]。

Table 1.2-1 陸上植物の NDP-糖供給に関わる代謝経路（Bar-Peled and O'Neil [15]）

Name	Metabolic and catabolic pathway of NDP-sugar
Carbon derived from photosynthesis	CO_2 → Fructose-6-phosphate → NDP-sugar
Sucrose as a carbon source	Carbon mobilization (Sucrose) → NDP-sugar
Storage carbohydrate as a carbon source	Storage polysaccharide (starch etc.) → NDP-sugar
Recycling and salvage of sugar residues	Glycan → sugar → NDP-sugar
Cell wall restructuring and recycling	Polysaccharide → sugar → NDP-sugar
Sugar derived from plant-microbe interactions	Glycan → sugar → NDP-sugar

上記経路、前述の糖ヌクレオチド生合成経路で供給される糖ヌクレオチドは、タンパク質糖鎖､植物細胞壁などの多糖類の合成において､ドナー基質として糖転移酵素に利用される。特に、植物細胞は数多くの種類の希少糖残基を構成成分として含む、多様で複雑な多糖類を有している。そのため、Fig. 1.2 に示すように、各種希少糖を含む糖ヌクレオチドを含め、多様な糖ヌクレオチド生合成経路を有している（Fig. 1.2）。

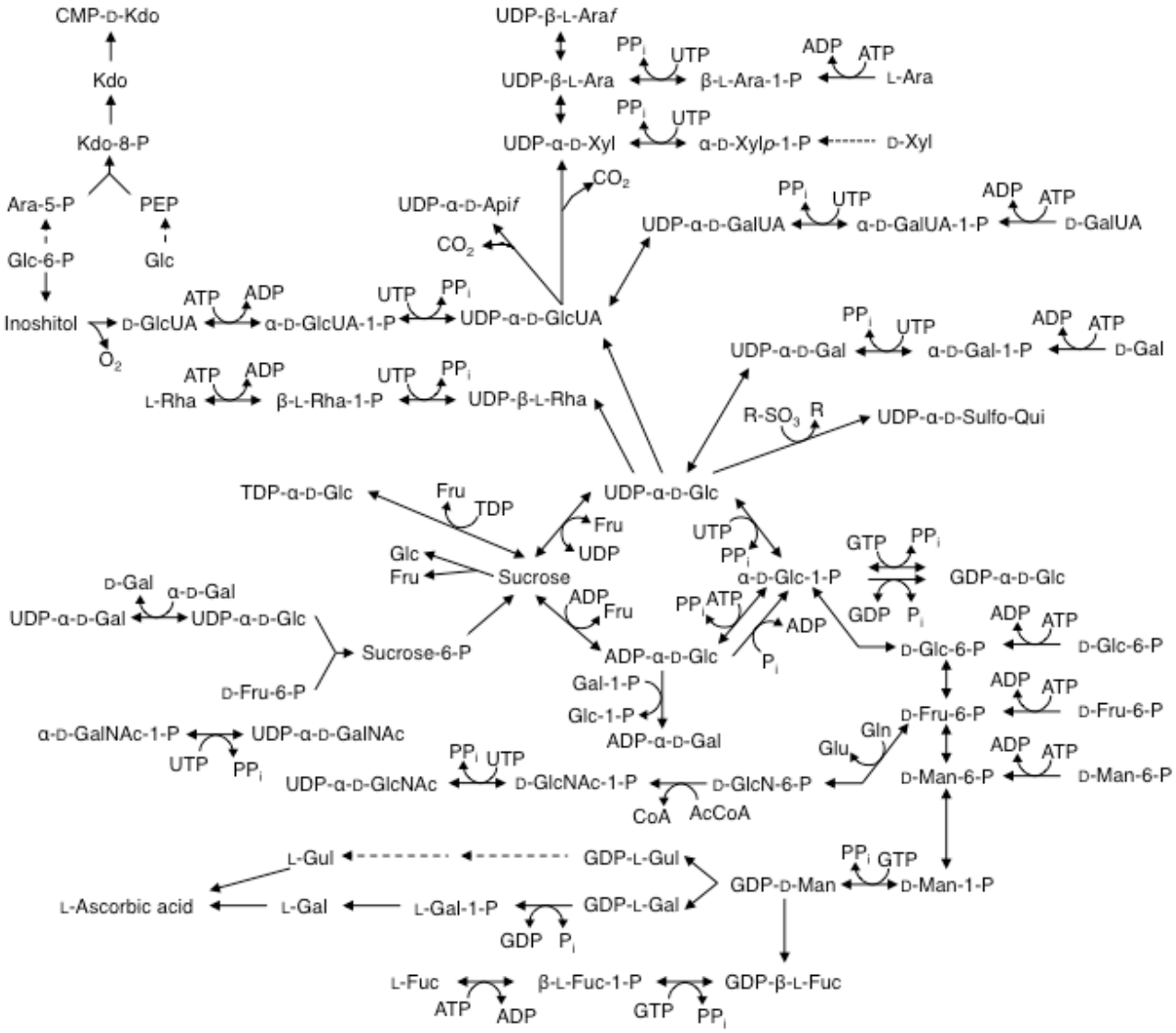

Fig. 1.2 植物生体内における糖ヌクレオチドの主要生合成経路

植物は多数の希少糖を含む糖ヌクレオチドを生合成し、細胞壁生合成などに利用している。実線は解明されている生合成経路を、破線は未解明の生合成経路を示す。(Bar-Peled *et al.*を一部改変[15])

1.3 GDP-L-Fuc 生合成経路

GDP-L-Fuc は、生体内の細胞質において、新生経路と再利用経路から生合成される。GDP-L-Fuc の主要な新生経路は、進化的に保存されており、バクテリア[19]、植物[20]、哺乳類[21]、無脊椎動物[22, 23]でその存在が報告されている。また、バクテリア[24]、植物[25]、哺乳類細胞[26]では、新生経路を構成する酵素をコードする遺伝子がクローニングされている。この新生経路は、GDP-D-Man-4,6-デヒドロゲナーゼ(GMD)と

GDP-4-*keto*-6-deoxy-D-Man-3,5-epimerase-4-reductase（Tsta3） の 2 つの酵素によって 3 つの酵素反応が触媒され、GDP-D-Man が GDP-L-Fuc に変換される経路である。

一方、再利用経路における GDP-L-Fuc の生合成には、L-フコキナーゼ/GDP-L-Fuc ピロホスホリラーゼ（FKP）という二機能性の酵素が担っている（Fig. 1.3）。UDP 糖の再利用経路は、単糖-1-リン酸の生成、UDP-糖の合成を担う異なる 2 つの酵素により、UDP-糖が生合成される[27-29]。一方、GDP-L-Fuc の再利用経路は、まず、細胞内に存在する L-Fuc と ATP を基質とし、FKP の有するフコキナーゼ活性により、L-Fuc-1-P に変換されることで開始される。次に、FKP の有する GDP-L-Fuc ピロホスホリラーゼ活性により、フコキナーゼ活性により生成された L-Fuc-1-P と GTP から GDP-L-Fuc とピロリン酸（PP_i）が生成される[30, 31]。フコキナーゼ活性や GDP-L-Fuc ピロホスホリラーゼ活性は、多くの真核生物、バクテリアで検出されており、*Bacteroides fragilis* や、*A. thaliana* で FKP をコードする遺伝子が同定されている[32, 33]。

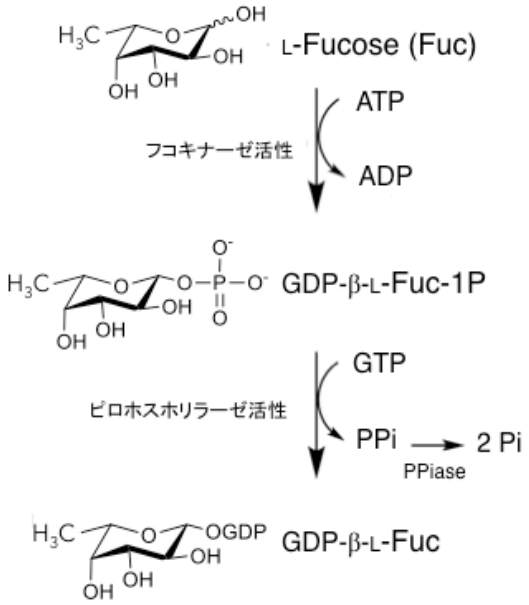

Fig. 1.3 FKP の酵素活性

FKP はフコキナーゼ活性、ピロホスホリラーゼ活性を有する 2 機能性の酵素であり、
L-Fuc + ATP + GTP → GDP-L-Fuc ＋ ADP ＋ PPi という反応を触媒する

1.4 植物における GDP-L-Gal 生合成

植物細胞は、他の真核生物とは異なる、GDP-L-Gal を介した L-アスコルビン酸合成経路(D-Man/L-Gal 経路)を有している[34-36] (Fig. 1.4-1)。D-Man/L-Gal 経路において、GDP-L-Gal は GDP-D-Man-3',5'-エピメラーゼ (GME) により GDP-D-Man より生合成される。GME は、*A. thaliana* 及び *Oryza sativa* においてその酵素活性が検出され、GDP-L-Gal 及び GDP-L-Gul の生成が報告されている[37, 38]。Wolucka *et al.* 及び Major *et al.* により、GME により触媒される詳細な反応経路が明らかにされた[39, 40]。 GME は、短鎖型脱水素酵素/還元酵素ファミリー（SDR family; short-chain dehydratase/reductase family）に属する酵素[41]であり、GDP-D-Man の C3'位、C5'位のエピメリ化により GDP-L-Gal 及び GDP-L-Gul を生成する酵素である。*Chlorella pyrenoidosa* より抽出した部分精製酵素を用いた GME の酵素解析により、GME による GDP-D-Man のエピメリ化反応は可逆反応であることが示された[42, 43]。加えて、^{3}H 標識水を用いた解析により、GME によるエピメリ化において、GME 反応後の GDP-D-Man、GDP-L-Gal から ^{3}H に由来するシグナルが検出されたことから、エピメリ化反応で生じるプロトンが溶媒との間で移動していると考えられる[44]。しかし、エピメリ化に必要な GDP-D-Man のプロトン化は酵素を用いた反応では化学的に起こり得ない。NAD (P)$^{+}$が補因子として働くことで、酵素による水素の移動が起こると仮定すれば、化学エネルギー的に合理的なプロトン移動が起こると予測された[45]。しかし、*A. thalaian* GME の結晶構造解析を基に、NAD^{+}の結合部位が予測されたところ、NAD^{+}と GME は非常に強固な結合を形成し、水素の移動に関与できないと考えられた。実際、NAD (P)$^{+}$の添加により *A.thaliana* GME の酵素活性は 10-14% しか上昇せず、GME のエピメリ化反応は、GDP-D-Man/GDP-L-Gal/GDP-L-Gul = 80:15:5 で平衡に達する[40]。そこで、糖ヌクレオチドと GME の結合部位のアミノ酸残基を改変することで、その反応機構の解明が試みられた[40]。

その結果、エピメリ化反応はすべて、GME の一つの活性中心で行われることがわかった。GME による GDP-D-Man のエピメリ化はまず、酵素内部のシステイン残基が介する酸化反応により、Fig. 1.4-2 中に四角で示した GDP-β-L-4-keto-Gul が生成されると考えられた。また、生成された GDP-β-L-4-keto-Gul が還元されると、GDP-L-Gul が生成され、5'位のエピメリ化が完了する。3'位のエピメリ化はまず、GDP-β-L-4-keto-Gul に対し、ring flip もしくは、ヘキソース内部で電子移動が起こることで、GDP-β-L-4-keto-Gal が生成される。最終的に、GDP-β-L-4-keto-Gal が還元され、GDP-L-Gal が生成されると予測された（Fig. 1.4-2）。

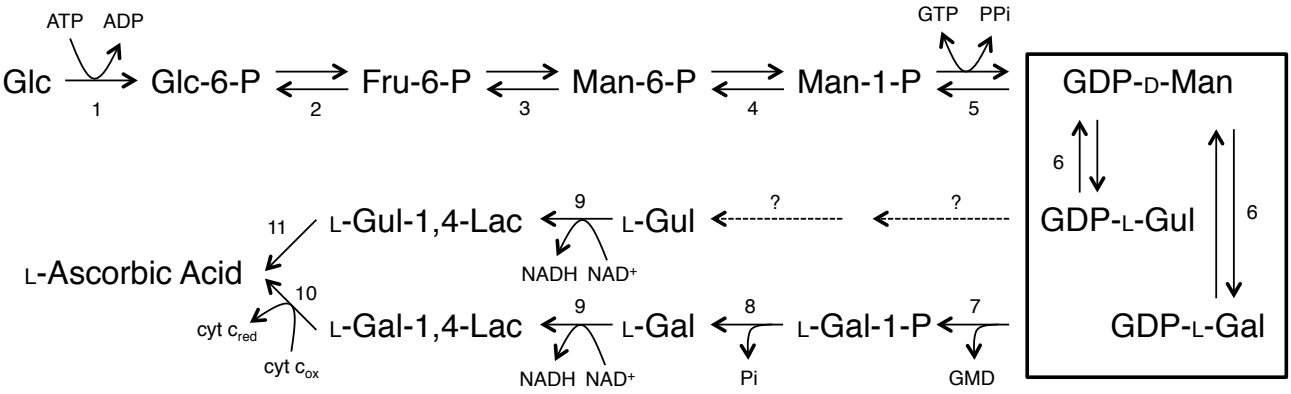

Fig. 1.4-1 植物における L-アスコルビン酸生合成経路

各反応ステップを触媒する酵素は以下の通り。破線は生合成機構が未知なステップを示す。四角で囲んだ部分は、GME が関与するステップを示す。（Wheeler *et al.* [36]を一部改変）

1, hexokinase; 2, phosphoglucose isomerase; 3, phosphomannose isomerase; 4, phosphomannose mutase; 5, GDP-D-Man pyrophosphorylase; 6, GME; 7, putative GDP-L-Gal pyrophosphorylase; 8, L-Gal-1-phosphate phosphatase; 9, L-Gal dehydrogenase; 10, L-Gal-1,4-lactone dehydrogenase; 11, L-Gul-1,4-lactone dehydrogenase. Abbreviations: L-Gal-1,4-Lac, L-galactono-1,4-lactone; L-Gul-1,4-Lac, L-gulono-1,4-lactone; cyt c_{ox}, cytochrome c oxdase; $cytc_{red}$, cytochrome c reductase.

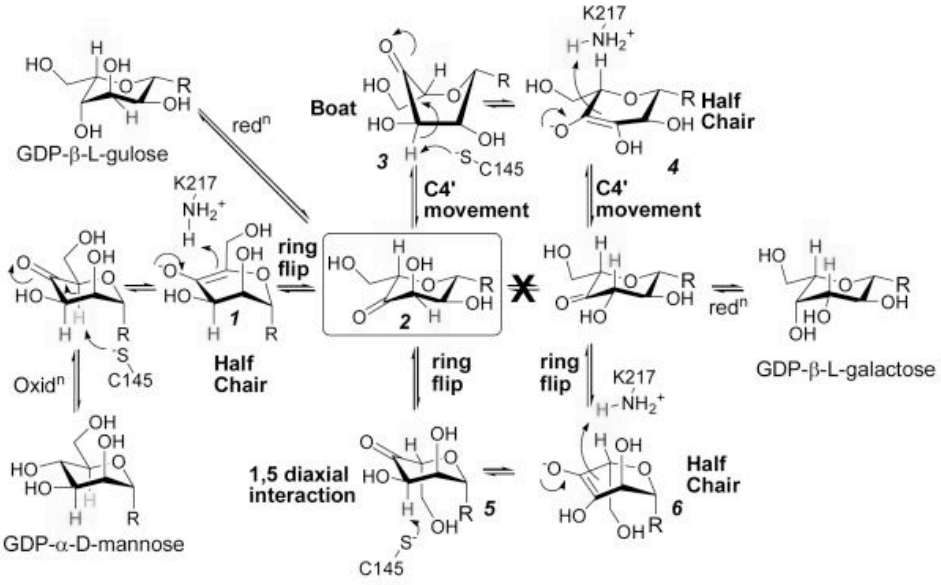

Fig. 1.4-2　GME によるエピメリ化反応モデル

GDP-D-Man はまず、GME 内部のシステイン残基による酸化反応により、C4’位がケト化される。その後、アスパラギン酸残基の NH_3^+位を介したプロトン移動により、ring flip が誘導され、GDP-β-L-4-keto-Gul が生成される。この GDP-β-L-4-keto-Gul を出発物質とし、還元反応、ring flip、プロトン移動により、C3’位及び C5’位のエピメリ化が起こる（Major *et al.* [40]より引用）。

1.5　化学的手法による GDP-L-Gal 合成

GDP-L-Gal は化学的手法において、糖残基の保護、脱保護反応を経て合成される。GDP-L-Gal の化学的手法による合成は、Binch *et al.*により初めて報告された。Binch *et al.*は、155 mg の GDP-L-Gal 2 リチウム塩を L-galactono-1,4-lactone より、収率 11% で合成した[46]。さらに、Baisch *et al.*により合成ステップの改善が行われ、オレンジ果皮より取得したアセチルエステラーゼを化学合成の最終ステップで用いることで、L-Gal を出発物質とし、180 mg の GDP-L-Gal が収率 57% で合成された。さらに高効率な GDP-L-Gal 合成は、Düffels *et al.* により報告された[47]。Düffels *et al.*の手法は、L-Gal-1-P と GTP のカップリング反応を改善することで、6 つの反応ステップにより、180 mg の GDP-L-Gal を収率 57% で入手可能なものである。これらの化学的手法による GDP-L-Gal の合成は、多段階の反応ステップを経て、高い収率で GDP-L-Gal を入手可能である。

1.6 タンパク質の *N*-結合型糖鎖修飾

小胞体（endoplasmic reticulum; ER）や Golgi 体において、糖転移酵素によるグリコシル化反応や、グリコシド結合の加水分解酵素によるトリミングといった多様なプロセシングにより、様々な糖鎖が生合成される。糖鎖はタンパク質の Ser/Thr に結合した *O*-結合型糖鎖と、Asn-X-Ser/Thr（X はプロリン以外のアミノ酸残基）に含まれるアスパラギン残基に結合した *N*-結合型糖鎖の 2 種類に大別される。*N*-結合型糖鎖修飾は、動物、酵母、植物、昆虫細胞でその合成経路が明らかにされている[48-52]。*N*-結合型糖鎖の構造は、糖鎖を構成する糖残基の種類や数により、ハイマンノース型、ハイブリッド型、コンプレックス型の 3 種類に大別される（Fig. 1.6-1）。ハイマンノース型の糖鎖はすべての真核生物に共通して存在するが、ハイブリッド型やコンプレックス型の糖鎖は生物種により異なり、各生物種に固有な構造に収束する。真核生物では ER から Golgi 体へ輸送された $Man_8GlcNAc_2$ に存在する α1,2-Man 残基間のグリコシド結合が α1,2-マンノシダーゼ I により加水分解され、$Man_5GlcNAc_2$ が合成される。その後、Golgi 体に局在する酵素群により、酵母を除く全ての真核生物で $GlcNAcMan_3GlcNAc_2$ が合成され、これを前駆体として Golgi 体に局在する酵素群やグリコシド結合の加水分解酵素により、各生物種に特徴的な *N*-結合型糖鎖が生合成される[53]（Fig. 1.6-2）。哺乳類細胞型糖鎖は、糖鎖非還元末端側にシアル酸の付加した分岐型糖鎖を有しており、一部の糖鎖は L-Fuc 残基を含有する。哺乳類細胞の有する糖鎖合成経路において、L-Fuc 残基は α1,6-Fuc 転移酵素（FUT8）により、asialo-agalacto-bi-antenna-Asn（$GlcNAc_2$-Man_3-$GlcNAc_2$-Asn, GN2M3-Asn、Fig. 1.6-3）糖鎖還元末端側のアスパラギンに結合した GlcNAc 残基に付加される[54]。植物は、α1,3-L-Fuc 及び β1,2-Xyl が付加した *N*-結合型糖鎖を有しており、この植物型糖鎖の生合成経路は明らかにされている[55, 56]。*A. thaliana* における α1,3-L-Fuc 転移酵素は、*Vigna radiata* より単離された α1,3-L-Fuc 転移酵素

[57]のアミノ酸配列情報を基に FucTA と FucTB に 2 つの酵素が予測された。それぞれの酵素活性が調査されたところ *At*FucTA は、GDP-L-Fuc を基質とし、$GlcNAc_2$-Man_3-Xyl-$GlcNAc_2$-Asn（GN2M3X-Asn、Fig. 1.6.-3）もしくは、GN2M3-Asn の糖鎖還元末端側のアスパラギンに結合した GlcNAc 残基への L-Fuc を有していた[58]。一方、*At*FucTA のアミノ酸配列と 77% の相同性を有する *At*FucTB は、活性が非常に弱いことが報告されている[59]。

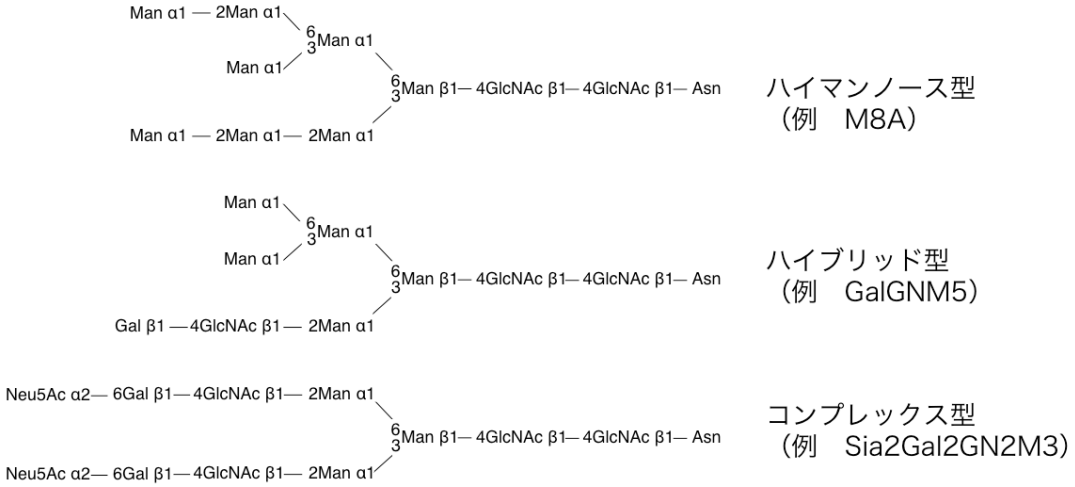

Fig. 1.6-1 ハイマンノース型、ハイブリッド型、コンプレックス型糖鎖の例

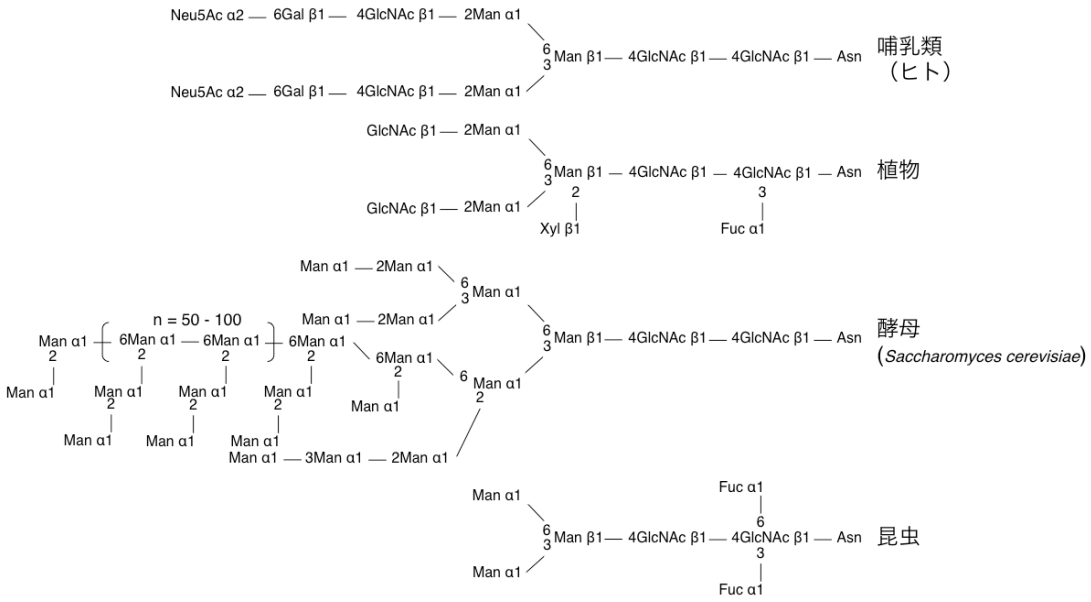

Fig. 1.6-2 哺乳類、昆虫、植物、酵母に特徴的な糖鎖の例

Fig. 1.6-3 FUT8、FucTA、FucTB 生合成に関与する糖鎖構造一覧

1.7　陸上植物における細胞壁とその構成成分

細胞壁は、細胞膜の表面を覆う細胞外被に分類されている。細胞外被は全ての細胞に存在するが、その構造や機能は生物種や分化の段階で異なり、変化に富んでいる。植物や真正細菌などの細胞外被は安定した構造と力学的強度を有することから細胞壁と呼ばれ、細胞骨格の維持や外敵からの防護装置などとして機能している。なかでも、植物細胞の細胞壁は最も強度の強い細胞壁の一つである[60]。陸上植物の細胞壁は、単純に細胞の形状維持や組織の支持といった機能のみならず、細胞分化や細胞成長の制御、細胞接着、情報処理機能、生体

防御・修復機構、水理機能、貯蔵機能といった多岐にわたる機能を有している[61-66]。このような植物細胞壁は、その構成成分・構造や機能により分類されている。一般に植物の細胞壁は、細胞伸張初期に細胞表面に構築される 1 次細胞壁と、細胞伸張後に 1 次細胞壁の内壁で構築される 2 次細胞壁に分類される[62, 67]。1 次細胞壁はセルロース微繊維を骨格とし、セルロース微繊維をヘミセルロースの一種であるキシログルカンが架橋している。さらに、セルロースとキシログルカンの間隙にペクチン分子やアラビノガラクタンタンパク質が充填され、柔軟性のある構造を維持している。一方、2 次細胞壁は重合度の高いセルロース微繊維の骨格を、ヘミセルロースの一種であるキシランが架橋し、それらの間隙が、リグニンなどのフェノール化合物で充填されており、非常に強固な構造を構築している[62, 68]。

1.8 キシログルカンの構造、生合成経路

キシログルカンは、Glc が β1,4 結合で連結した、β1,4-グルカンを主鎖とし、Glc 残基の C6’位が、規則的に Xyl、さらに D-Gal、L-Fuc などで修飾された側鎖を多量に含有する、ヘミセルロースに分類される多糖である[69]。キシログルカンは双子葉植物や裸子植物の 1 次細胞壁に 20-25% 含有されるものの、単子葉植物では 1-5% しか含有されていない。セルロース微繊維と強く水素結合を形成し、その分解や繋ぎ替えにより、植物の伸長や成長に関与していると考えられる[70]。キシログルカンの側鎖構造は、慣例的に Table 1.8-1 に示した 1 文字により表記される[71]。また、キシログルカンは、Fig. 1.8 に示すような規則的なサブユニットから形成されており、これらのサブユニットの構成比は植物種によって大きく異なる[70]。例えば、双子葉植物のキシログルカンは、XXFG や XXXG、XLLG といったサブユニットが含まれるが、単子葉植物のキシログルカンは側鎖の短い XXXG が主な構成成分である。また、ナス科植物は Ara を含むサブユニットから構成される[71]。キシログルカンの生合成には、主に、大別して 4 種類の転移酵素によりゴルジ体の中で合成される[72]。キシロ

グルカン β1,4-Glc 転移酵素により、UDP-Glc を基質として、キシログルカン主鎖である β1,4-グルカンが伸張され、同時にキシログルカン α1,6-Xyl 転移酵素により、UDP-Xyl を基質として、Xyl 残基が β1,4-グルカン上へ規則的に付加される。キシログルカン β1,4-Glc 転移酵素は、Cocuron *et al.*による、*Tropaeolum majus* における糖転移酵素関連遺伝子の発現解析を基に、種子形成時にキシログルカン Gal 転移酵素と共発現している酵素群より予測され、*CSLC* 遺伝子として単離された[73]。*T. majus* CSLC、及びホモログである *A. thaliana* CSLC4 を過剰発現させた酵母細胞では、低分子 β-グルカンの合成が確認された。さらに、キシログルカン β1,6-Xyl 転移酵素、XXT1 を共発現させると、高分子で不溶性の β-グルカンの合成が検出された[74, 75]。β1,4-グルカン主鎖の伸長には、Xyl 残基も必要であることから、β1,4-Glc 転移酵素、α1,6-Xyl 転移酵素が相互に機能することで、キシログルカンを伸張させていると推測される。キシログルカン Xyl 転移酵素は、糖質関連酵素（Carbohydrate-Active enZymes; CAZy）データベース上で、糖転移酵素ファミリー、GT34 ファミリーに分類されている。*A. thaliana* は、*XXT1*（*AtXT1*）を含め、GT34 ファミリーに分類される 7 つの遺伝子を有している。そのうち、XXT1（*At*XT1）、XXT2（*At*XT2）が、*in vitro* においてキシログルカン Xyl 転移活性を示し、キシログルカン α1,6-Xyl 転移酵素と同定されている[74, 75]。また、*XXT5*（*AtGT5*）遺伝子が欠損した *A. thaliana* 遺伝子破壊株の細胞壁の解析結果より、XXT5 もキシログルカン α1,6-Xyl 転移酵素として機能していると予測されている[76]。

キシログルカン主鎖及び、Xyl 側鎖の伸張後、β1,2-D-Gal 転移酵素により、Xyl 残基に D-Gal 残基が転移される。キシログルカン β1,2-D-Gal 転移酵素として、CAZy GT47 ファミリーに属する *A. thaliana* MUR3 が同定されている[77]。組換え MUR3 の *in vitro* での酵素活性測定において、MUR3 はキシログルカン XXXG 構造の非還元末端側から 3 番目の X に特異的に D-Gal を付加することが解明された。一方で、他の Xyl 残基への D-Gal 転移活性は検出され

ず、他の酵素が関与している可能性が示唆された。シロイヌナズナには、GT47 に属する 10 の遺伝子が存在することから、他の遺伝子がキシログルカン Xyl 転移酵素をコードしていると考えられる[77]。Xyl 残基へ D-Gal が転移された後、α1,2-L-Fuc 転移酵素により D-Gal 側鎖に L-Fuc が転移される。キシログルカン L-Fuc 転移酵素は、*Pisum sativum* より単離され、アミノ酸配列情報より *P. sativum* FUT1（PsFUT1）、*A. thaliana* FUT1（AtFUT1）が決定された[78, 79]。AtFUT1 は *in vitro* での酵素活性が検出され、キシログルカン Fuc 転移酵素であることが同定された。さらに、AtFUT1 はキシログルカンの L-Fuc 側鎖が欠失した *mur2* 突然変異体の原因遺伝子であることも解明された[80]。加えて、AtFUT1 はその結晶構造が明らかにされており、酵素活性に関与するアミノ酸残基が明らかにされた[81, 82]。FUT1 の *in vitro* 解析に用いられた基質と、解析内容を Table1.8-2 に示す。キシログルカン L-Fuc 転移酵素は CAZy GT37 ファミリーに属し、シロイヌナズナには、10 個の GT37 をコードする遺伝子（*AtFUT1 – AtFUT10*）が存在する[80]。しかし、AtFUT1 以外の GT37 ファミリー酵素には、キシログルカンへの L-Fuc 転移活性が検出されていない[79]。

Table 1.8-1 キシログルカン側鎖の非還元末端をもとにした 1 文字表記法

（Albersheim et al. [71]を一部改変）

1 文字表記	非還元末端の糖残基	構造
G	D-Glc	β-D-Glc
X	D-Xly	α-D-Xyl-β1,6-D-Glc
L	D-Gal	β-D-Gal-α1,2-D-Xyl-β1,6-D-Glc
F	L-Fuc	α-L-Fuc-β1,2-D-Gal-α1,2-D-Xyl-β1,6-D-Glc
J	L-Gal	α-L-Gal-β1,2-D-Gal-α1,2-D-Xyl-β1,6-D-Glc

Table 1.8-2 キシログルカンフコース転移酵素（**FUT1**）に関する研究

Substrate	Analysis	Reference
Tamarind xyloglucan	Substrate specificity, Kinetic analysis	[78, 79, 83]
XLLGXLLG	Substrate specificity	[79]
XLLG	Substrate specificity	[79, 82]
XXLG	Substrate specificity, Kinetic analysis, 3D structure analysis	[78, 82]
Lactose	Substrate specificity	[78]

※ Substrate specificity は放射線標識した GDP-L-Fuc が用いられた

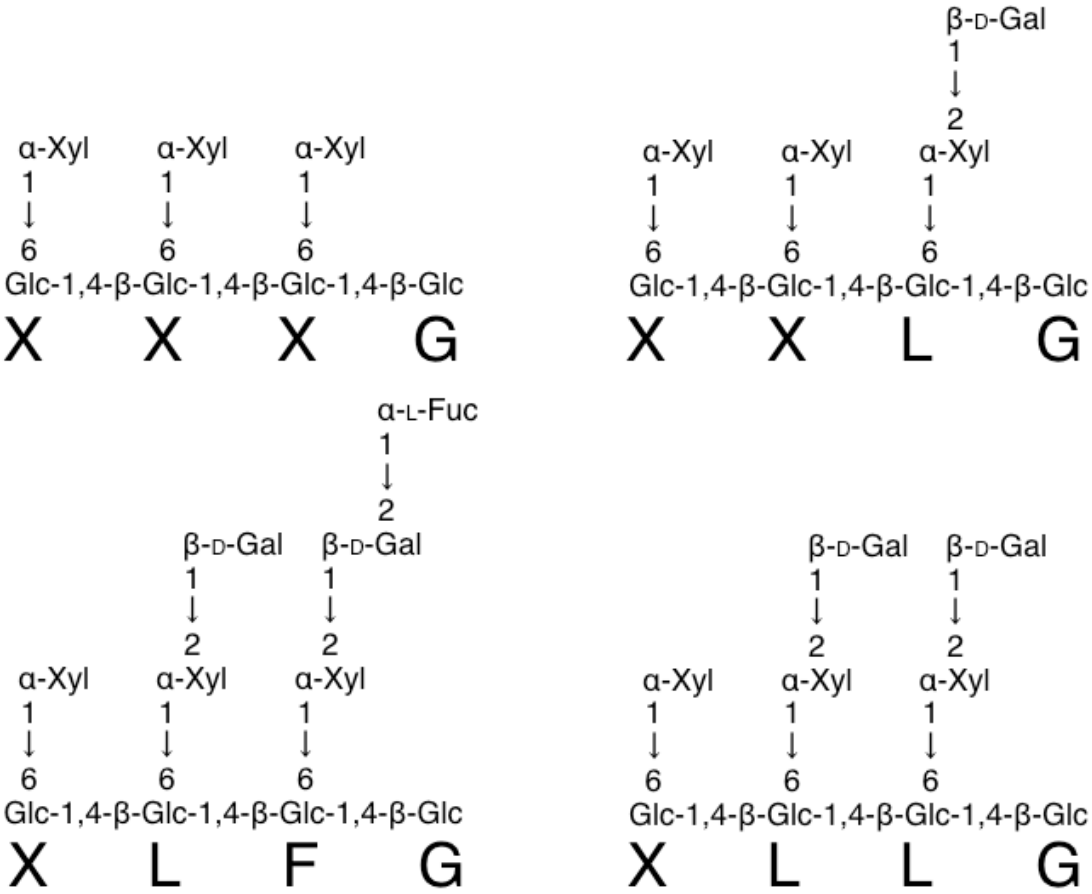

Fig. 1.8 キシログルカンを構成する代表的なサブユニット

1.9 ペクチンの構造

ペクチンの構造は O'Neill *et al.*の研究グループにより精力的に解析され、その詳細な構造が解明されている[84, 85]。ペクチンは主鎖や側鎖の違いにより、大きく分けてホモガラクツロナン（HG)、ラムノガラクツロナン-I（RG-I)、ラムノガラクツロナン-II（RG-II）の 3 つに分類される。ペクチンは多様な糖残基を含み、それぞれが異なるグリコシド結合を形成している。ペクチンの生合成には少なくとも 67 種類の糖転移酵素、メチル化酵素、アセチル化酵素が関与していると考えられ、ゴルジ体で生合成が行われると考えられているが、その生合成の順序は解明に至っていない[86-88]。ペクチンの約 65% の D-GalUA が α1,4-結合し、ポリガラクツロン酸を形成した HG である。HG は部分的に *O*-6 位がメチル化もしくは、*O*-2 位と *O*-3 位がアセチル化されており、さらに、隣接する HG は Ca^{2+}を介して架橋されている[62, 89, 90]。RG-I は D-GalUA と Rha が交互に結合した 2 糖（α1,4-GalUA-α1,2-Rha）を主鎖に持ち、Ara や D-Gal からなる側鎖が Rha 残基の C4'位に結合した複合多糖であり、ペクチンの 20 – 35% を占める。また、Ara や D-Gal 以外にも、L-Fuc や GlcUA、4-*O*-MeGlcUA が側鎖として結合しており、GalUA 残基 C2'位あるいは C3'位はその一部がアセチル化されている。RG-I 側鎖はその構成糖や構造により、枝分かれアラビナン、直鎖ガラクタン、I 型アラビノガラクタン、II 型アラビノガラクタンに分類される。RG-I 側鎖はその長さが 1 – 30 糖残基以上と幅広いため、RG-I は広い分子量分布を持っている[91]。一方、RG-II はすべての維管束植物の一次細胞壁に含まれるが、その含有量は一次細胞壁に含まれる多糖類の 0.1-5% 程度である[84]。しかし、その構造はシダ植物から種子植物までよく保存されている。RG-II の構成糖は他の細胞壁構成成分と比較すると非常に複雑である。RG-II は 12 種類の単糖成分から構成されており、その構造の違いから A、B、C、D、E、F と分類されている（Fig. 1.9、[92])。細胞壁中では 80% 以上の RG-II がホウ素によりジエステル架橋され、RG-II 二

量体として存在する[93, 94]。ホウ素の欠乏によりこのホウ酸ジエステル架橋の形成異常が起こると、植物の成長に著しい変化が引き起こされ、矮性を示すことが知られている[95, 96]。

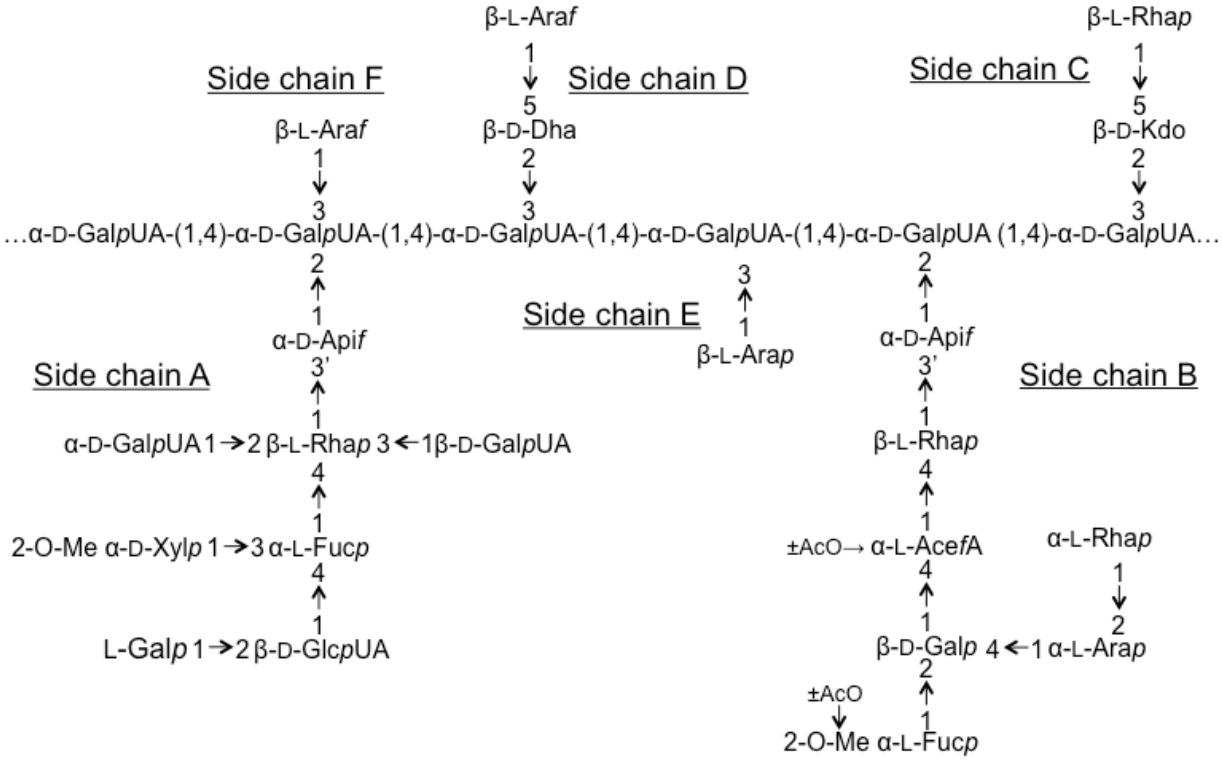

Fig. 1.9 RG-II の構造

f はフラノース、*p* はピラノース、AcO はアセチル基を示す。
（Pellerin *et al.*[92]、Bar-peled *et al.*[97]を一部改変）

1.10 植物細胞における Gal 転移酵素

前述の通り細胞壁多糖の詳細な構造が明らかになっており、タンパク質糖鎖やキシログルカン、RG–I 側鎖、アラビノガラクタンタンパク質糖鎖では D-Gal を、RG-II 側鎖では L-Gal を含有している[98]。これらの D-もしくは L-Gal 残基は異なる 12 の結合様式をとっており、少なくとも 12 種類の転移酵素がその生合成に関与していると考えられる。しかし、現在同定されている糖転移酵素は AGP 糖鎖生合成に関与する β1,3-Gal 転移酵素、*A. thaliana* GALT2[99] と、RG-I 生合成に関与する β1,4-Gal 転移酵素である GALS1[100]のみである。

1.10.1. 糖転移酵素ファミリーと Gal 転移酵素

糖質関連酵素を分類した CAZy の 糖転移酵素ファミリー (GT family) において、GT8、GT31、GT47、GT92 ファミリーに植物細胞壁合成に関与する Gal 転移酵素および推定 Gal 転移酵素が分類されている[77, 101, 102]。先に述べた RG-I 側鎖生合成に関与する β1,4-Gal 転移酵素は GT92 に属している[100]。また、細胞壁合成以外に *N*-結合型糖鎖生合成に関連する Gal 転移酵素は GT31 ファミリーに属している。

1.10.2. 植物の *N*-結合型糖鎖生合成に関与する Gal 転移酵素

植物は Fig. 1.6-2 に示したように α1,3-Fuc、α1,2-Xyl 残基が付加した特徴的な *N*-結合型糖鎖を有している[58]。Gal を含む糖鎖として、(FA)(FA)XF のように糖鎖非還元末端側に [Fucα1,4(Galβ1,3)-GlcNAc-R]の Lewis A 構造をもつ糖鎖が知られている (Fig. 1.10) [103]。近年、Strasser*et al.* により、CAZy GT31 ファミリーに属する 6 つの糖転移酵素候補遺伝子の *A. thaliana* T-DNA 破壊株の糖鎖構造解析が行われ、*At1g26810* 遺伝子（GALT1）破壊株では Lewis A 構造をもつ糖鎖から β1,3-Gal が欠失していた。この結果より、GALT1 が *N*-結合型糖鎖の β1,3-Gal 転移酵素であると予測された。しかし、その他の 5 つの糖転移酵素に関する酵素活性は不明である[104]。

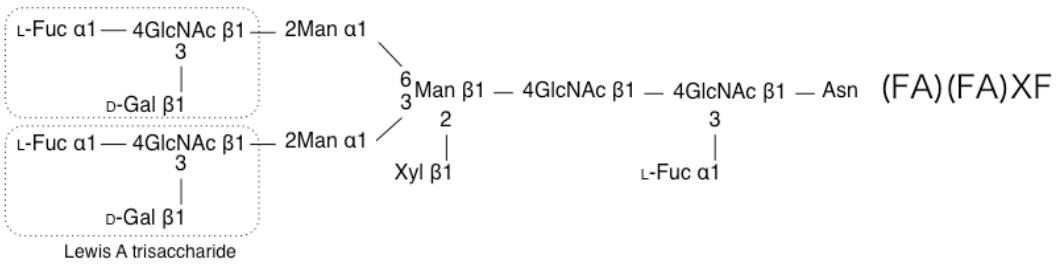

Fig 1.10 Lewis A 構造を有する植物型糖鎖の例

1.11 L-Fuc 残基の L-Gal への置換について

矮性を示す *A. thaliana mur1* 変異体は、GDP-L-Fuc の新生合成経路が破壊され、L-Fuc 転移酵素のドナー基質、GDP-L-Fuc が欠乏した株である。*mur1* 変異体のタンパク質 *N*-結合型糖鎖が詳細に解析されたところ、一部の植物型糖鎖では、本来 L-Fuc 残基が付加している部位に、L-Fuc の分子アナログである、L-Gal 残基が付加していた。しかし、L-Gal を転移する *N*-結合型糖鎖生合成酵素は報告がない。加えて、植物細胞に特徴的な α1,3-L-Fuc 転移酵素と、β1,2-Xyl 転移酵素をコードする遺伝子を破壊した *A. thaliana* 変異株（*xylt fucta/fuctb*）では、α1,3-L-Fuc 残基、β1,2-Xyl 残基が完全に欠失しているものの、L-Fuc 残基付加部位への L-Gal 残基付加は検出されなかった[105]。

植物細胞壁においても、L-Fuc 残基の付加部位への L-Gal 残基の付加が報告されている。Zablackis *et al.*による *A. thaliana mur1* 変異体のキシログルカンの構造が核磁気共鳴分光法（NMR）により決定された。*A. thaliana mur1* 変異体では、キシログルカンオリゴ糖鎖非還元末端側の L-Fuc が欠失していた。さらに、*A.thaliana mur1* 変異体で検出されたキシログルカンオリゴ糖の 6.5% が XXJG、11% が XLJG であり、17.5% のキシログルカンオリゴ糖の非還元末端側に L-Gal が付加していた[106]。野生型株では、キシログルカンオリゴ糖のうち、20.2% が XXFG、31.9% が XLFG であり、GDP-L-Fuc の欠失により、約 34% の L-Fuc 残基付加部位が L-Gal 残基に置換されていた。RG-II については、Reuhs *et al.* による質量分析法と NMR による分析で、RG-II 側鎖 B の非還元末端側の 2-*O*-Me-α-L-Fuc が欠失し、2−*O*-Me-L-Gal 残基が付加していること、RG-II 側鎖 A に含まれる L-Fuc が欠失し、L-Gal が付加していることが明らかになった。このように、キシログルカンや RG-II に含まれる L-Fuc や 2-*O*-Me-α-L-Fuc が欠失した場合、L-Gal や 2-*O*-Me-α-L-Gal が付加するが、なぜこのような置換が起こるのか、そのメカニズムは不明である[107]。

近年では、その他の植物種を含め、更に詳細な細胞壁構成成分の構造解析が行われており、*A. thaliana mur1* 変異体で検出された L-Fuc 残基の L-Gal 残基への置換が野生株でも一部起こっていることが解明されている。例えば、*Simmondsia chinensis*（ホホバ）種子より抽出されたキシログルカンオリゴ糖は、*A. thaliana* 野生株では検出されなかった XXJG、XLJG 構造を有している[108]。また、Pabst *et al.*、Buffetto *et al.*らの解析により、*A. thaliana* 野生株において、RG-II 側鎖 A に含まれる L-Fuc 残基の約 27% が L-Gal に置換されていることが解明された[109, 110]。

1.12 本論文の概要

UDP-Glc や GDP-D-Man、GDP-L-Fuc といった一般的な糖ヌクレオチドは、比較的安定的に入手可能である。一方で、希少糖に関連する糖ヌクレオチドは、その多くが市販されておらず、合成手法も確立されていない。そのため、希少糖を含む糖化合物や複合糖質の合成や、それらの合成に関わる酵素の探索が困難だった。植物細胞内では、数多くの希少糖ヌクレオチドが合成されており、希少糖ヌクレオチドを基質とし、植物に特徴的な糖化合物が生合成されていると考えられる。そこで、本研究では、希少糖 L-Gal に着目し、その糖ヌクレオチドである、GDP-L-Gal 大量合成系の確立、さらに L-Gal の転移に関わる酵素の探索を行った。

第 2 章では、FKP を用いた GDP-L-Gal の新規合成系の構築を試みた。前述したように、GDP-L-Gal は L-アスコルビン酸合成における重要な中間体である[34]。また、GDP-L-Gal の欠失により、植物細胞壁構造の変化に起因する植物の矮性が引き起こされる[111, 112]。GDP-L-Gal は、植物細胞内において、GME によるエピメリ化反応により、GDP-D-Man から生成される。GME によるエピメリ化の平衡は非常に GDP-D-Man に偏っているため、高収率での生産が困難と考えられるが、GME の酵素反応を利用することで、ワンポットで GDP-L-Gal が入手可能である[38, 40]。一方、化学合成による GDP-L-Gal の合成では、収率は 57%だが、その反応ステップは膨大だった[47]。本章ではまず、既知の GDP-L-Gal 合成酵素である GME を用い、GDP-L-Gal の合成を試みた。オルタナティブリサイクル HPLC を用いることで、GDP-L-Gal を GME 酵素反応産物から比較的簡便に入手できたものの、収率は 15% 程度だった。そこで、新規合成手法の確立を試みた。新規合成手法では、L-Gal の分子アナログである、L-Fuc の再利用経路を構成する酵素、FKP を用いた。L-Gal に対する FKP の酵素学的パラメーターは、ハイスループット解析系を用いて解析し、

GDP-L-Gal 大量合成に必要な知見を収集した。さらに、精製系の検討を行い、数百 mg スケールの純度 99% 以上の GDP-L-Gal を収率 92% で生産可能な、GDP-L-Gal ワンポット合成系を構築することに成功した。

第 3 章では、合成した GDP-L-Gal を用い、GDP-L-Fuc 新生経路破壊株である *mur1* 変異体で検出された 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の生合成に関わる、L-Gal 転移活性の検出を試みた。*N*-結合型糖鎖の生合成経路において、L-Fuc 転移を担う糖転移酵素（*Mm*FUT8、*At*FucTA）を用い、GDP-L-Gal をドナー基質とした場合の酵素活性について解析を行った。その結果、*Mm*FUT8、*At*FucTA 共に *N*-結合型糖鎖を構成するキトビオースへの L-Gal 転移活性を示し、その初速度は GDP-L-Fuc を基質とした場合の 44% (*Mm*FUT8)、33% (*At*FucTA) だった。これにより、植物細胞内において、L-Gal を含有する糖鎖の生合成に、*At*FucTA が関与していると考えられた。また、マウス由来 α1,6-Fuc 転移酵素である、*Mm*FUT8 も L-Gal 転移活性を示したことから、その他の L-Fuc 類縁体を含有する糖鎖の新規創出の可能性も示唆された。キシログルカン生合成に関わる L-Fuc 転移酵素（AtFUT1）について、GDP-L-Gal を基質とし、オリゴキシログルカンに対する活性を調査した。AtFUT1 は GDP-L-Gal を基質とした反応において、GDP-L-Fuc を基質とした場合の 27% の初速度で L-Gal をキシログルカンの D-Gal 残基上に転移した。これにより、*mur1* 変異体で検出された L-Gal 含有キシログルカンを、AtFUT1 が合成可能であることを見出した。

第 4 章では、本研究の総括を行い、将来の展望を考察する。

第2章 GDP-L-ガラクトース生産系の構築

2.1 緒論

糖ヌクレオチドは、糖転移酵素のドナー基質として利用価値が高い。特に、生体内において、糖転移酵素により生成される、多糖類を形成する糖残基の殆どは、糖ヌクレオチドよりアクセプター上に転移される。植物細胞は地上や海中の生物にとって珍しい希少糖を含む多様な多糖類、配糖体を生合成するが、希少糖を含有する糖ヌクレオチドはその多くが入手困難である。特に、植物細胞壁は、L-Gal や D-Api といった多様な希少糖を含有する。そのため、植物細胞壁の生合成に関わる糖転移酵素の発見や、生合成経路の解明には、希少糖を含む糖ヌクレオチドの入手が必須である。

よく知られている糖の一つである、L-Fuc（6-deoxy-L-Gal）は、糖タンパク質や糖脂質に付加した糖鎖に含まれ、L-Fuc 特異的なレクチンが認識し結合するなど、分子認識に関わっている[113]。一方、分子アナログである L-Gal は地上や海中の生物の多くが利用していないと考えられている。しかし、L-Gal は、植物細胞壁の構成成分[109]として利用されており、植物の生育[111, 112]への関与が示されている。また、GDP-L-Fuc の新生生合成経路をノックアウトした株において、L-Fuc 残基が L-Gal に置換[48, 106, 114]されていることが報告されている。これらの L-Gal 残基は GDP-L-Gal をドナー基質として糖転移酵素により付加されると考えられるが、GDP-L-Gal は市販されておらず入手が困難である。前述したように、GDP-L-Gal は植物生体内において、L-アスコルビン酸合成経路を構成する GDP-D-Man-3’,5’-エピメラーゼ (GME) により、GDP-D-Man より合成される。GDP-L-Gal の mg スケールでの合成系は、*O. sativa* 由来 GME を用いたものが報告されているが、そのエピメリ化効率は約 20% だった[38]。化学合成法においては、Düffels *et al.*により、収率 57% での GDP-L-Gal 合成[47]報告されているが、その反応ステップは複雑である。

本章では、GDP-L-Gal の入手と、その高収率ワンポット合成経路の構築を試みた。L-Fuc の再利用経路を担う酵素である FKP は、Liu *et al.*[32]による FKP を酵母菌体内で過剰発現させた株の解析において、L-Fuc のみならず、L-Fuc の分子アナログである D-Ara に対する酵素活性を示した。さらに、Wang *et al.*により、L-Gal を含め、種々の L-Fuc 類縁体に対する *B. fragilis* FKP の酵素活性が報告されている[115]。しかし、至適反応条件や高純度 GDP-糖の精製手法は確立されていない。そこでまず、FKP の L-Gal に対する活性を酵素学的解析より明らかにすることとした。得られた情報をもとに、FKP を用いた GDP-L-Gal 生産系を構築し、さらに、FKP 酵素反応溶液から高純度 GDP-糖を効率的に精製する手法の確立を試みた。

2.2 実験材料及び方法

2.2.1. 使用した試薬

本研究では以下の試薬を使用した。

微生物培養用の Yeast extract は、Difco Laboratories (Detroit, MI) より入手した。基質として使用した GDP-D-Man は YAMASA Shoyu (Chiba, Japan)より入手した。Man、D-Gal、L-Gal、Gul, L-Fuc、GTP、GDP、ATP、ADP、アデノシン、グアノシンは Sigma (St. Louis, MO) もしくは、和光純薬（Osaka, Japan）より入手した。使用した特級グレードの試薬は、和光純薬、ナカライテスク（Kyoto, Japan）より入手した。HPLC 分析で使用したアセトニトリルは、関東化学（Tokyo, Japan）より入手した。LC-MS、MALDI-TOF MS で使用した質量分析グレードのトリフルオロ酢酸（TFA）は、和光純薬より入手し、質量分析グレードのアセトニトリルは Thermo Fisher Scientific（Fair Lawn, NJ）より入手した。制限酵素は TOYOBO、TaKaRa、ニッポンジーン（Tokyo, Japan）、NEB（Ipswich, MA）のものを使用した。

2.2.2. 使用菌株

Eschericia coli は、DH5α [F^-, λ^-, *supE44*, Δ*lacU*169 (φ80*lcZ*Δ M15), *hsdR*17, *recA*1, *endA*1, *gyrA*96, *thi*-1, *relA*1, *phoA*] を用いた。また、*Schizosaccharomyces pombe* は、ARC001 (*h^- leu1-32*) を用いた。*A. thaliana* T87 培養細胞は、理研バイオリソースセンターから取り寄せた。T87 細胞は、Yamada *et al.* の手順に従い、23°C、長日条件（16 hr 明条件、8 hr 暗条件）で、JPL 培地を用いて培養し、14 days ごとに継代した[116]。

2.2.3. *A. thaliana* 培養細胞 T87 破砕溶液からの GME 部分精製酵素の調製

GME 酵素活性に用いた部分精製酵素は、Wolucka *et al.*の方法に従い、T87 植物細胞破砕液より調製した[37]。T87 細胞は、濾紙（TOYO 定性濾紙 No. 1: ADVANTEC, Tokyo, Japan）

で濾過し、細胞と培地を分離した。集めた細胞は、Millipore Q water で洗浄した。洗浄した細胞に 20 mL Buffer A (100 mM Tris-HCl pH 7.6,　5 mM DTT, 1 mM EDTA, 1% (w/v) ポリビニルポリピロリドン)を加え、よく懸濁した後、超音波破砕機 UD-211 (株式会社トミー精工, Tokyo, Japan) を用い、氷上で 5 min、発振強度 3、発振間隔 0.5 sec で処理し、細胞破砕を行った。細胞破砕溶液は、3,000 × *g*、30 min 遠心した後、上清を回収し、硫酸アンモニウム沈澱により分画した。硫酸アンモニウム沈澱では、急激な pH の変化による酵素失活を防ぐことを目的とし、100 mL の 100 mM Tris-HCl pH 7.5 に対し、硫酸アンモニウムを 74.4 g 溶解させ、炭酸水素ナトリウムを用い、pH 7.5 に調整した後、4˚C、16 hr 撹拌し、析出した結晶を除去したものを飽和硫酸アンモニウム溶液として使用した。前述の飽和硫酸アンモニウム溶液を、細胞破砕溶液に、終濃度 45% になるよう添加し、2 hr 緩やかに懸濁した。その後、4˚C、5,000 × *g*、30 min 遠心し、上清を回収した。回収した上清に対し、終濃度 65% になるよう飽和硫酸アンモニウムを添加し、16 hr 緩やかに懸濁した。4˚C、5,000 × *g*、1 hr 遠心し、45 – 60% の飽和硫酸アンモニウム濃度で塩析された画分を回収した。回収した沈澱を、2.0 mL Buffer B (50 mM Tris-HCl, 0.5 mM DETA, pH 7.5)に再懸濁した。再懸濁後、Buffer B で平衡化した PD-10 カラムで脱塩し、脱塩後のサンプル溶液を酵素反応溶液として用いた。

2.2.4. GDP-D-Man-3’,5’-エピメラーゼ発現ベクターの構築

A. thaliana の全 RNA は stage 6 のロゼット葉より RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Chatsworth, CA) を使用し調製した。得られた RNA より、RNA PCR Kit Ver.2.1 (TaKaRa) を用い逆転写反応により cDNA を調製した。調製した cDNA をテンプレートとし、*At*GME をコードする遺伝子 (TAIR: *At5g28840*) の CDS 領域を、PrimeSTAR® Max DNA Polymerase (TaKaRa) 及び、プライマー（5'-GME_CDS: ATGGGAACTACCAATGGAACAGACTATG; 3'-GME_CDS: TCACTCTTTTCCATCAGCCGCG）を使用し増幅した。増幅した断片は、pGEM T-easy vector

(Promega, Madison, WI) に TA クローニングした。クローニングにより作成された pGEM T-easy-GME_CDS をテンプレートとし、KOD Plus_Neo DNA polymerase (TOYOBO, Osaka, Japan) 及び、制限酵素サイト、His タグ配列を含むプライマー（GME-NNde-His-pombe: GGAATTCCATATGCATCACCATCACCATCACGGAACTACCAAGGAAC;
GME-CBam-ter-pombe: CGGGATCCTCACTCTTTTCCATCAGCC; 下線部は制限酵素サイト *Nde* I と *Bam*H I を示す。太字部は 6 × His タグ配列を示す。）を使用し、サブクローニング用の断片を増幅した。増幅した PCR 断片は、制限酵素処理し、*Schizosaccharomyces pombe* 発現用ベクターpREP1 へ挿入し、発現用ベクター（pREP1-His_GME）を構築した。

2.2.5. *A. thaliana* GDP-マンノース 3',5'-エピメラーゼの発現及び精製

3.2.4.で作成した pREP1-His_GME をリチウムアセテート法[117]により、*S. pombe* ARC001 株に導入し、MM-leu 培地上で形質転換体を選抜した。MM-leu 培地の組成は以下の通り[118]。

MM 培地	
KH phtalate	0.3%
Na_2HPO_4	0.22%
NH_4Cl	0.5%
Glucose	2%
Salts stock	
Supplements stock (-Leu)	
Vitamins stock	
Minerals stock	

100 × Supplemets stock (-Leu)	
Adenine	225 mg/mL
Histidine	225 mg/mL
Uracil	225 mg/mL
Lysine	225 mg/mL

10,000 × Minerals stock	
Boric acid	0.52 M
$MnSO_4$	80.9 mM
$ZnSO_4$	23.7 mM
$FeCl_2$	13.9 mM
Molybdic acid	2.47 mM
KI	6.02 mM
$CuSO_4$	1.60 mM
Citric acid	47.6 mM

1,000 × Vitamins stock	
Pantothenic acid	4.2 mM
Nicotinic acid	81.2 mM
Inositol	55.5 mM
Biotin	40.8 μM

100 × Salts stock	
$MgCl_2$	0.52 M
$CaCl_2$	10.0 mM
KCl	1.34 M
Na_2SO_4	28.2 mM

得られた形質転換体を、MM-leu 液体培地を用い、OD_{600} = 3.0 まで培養した。培養液を 3,000 × *g* で遠心し、得られた菌体を氷冷した滅菌水で洗浄した。菌体は、菌体と等量のガラスビーズを用い、Equilibration buffer A (50 mM Tris-HCl pH 7.8, 0.3 M NaCl, 1 mM PMSF) 中で 7.5

min ボルテックスし、破砕した。破砕溶液を、4˚C、10,000 × *g*, 15 min 遠心し、ガラスビーズ、未破砕細胞、細胞破砕片を除去した。破砕上清は、Equilibration buffer A で平衡化した nickel-IMAC profanity resin (Bio-Rad, CA, USA) にロードした。カラムの 5 倍量の、20 mM イミダゾールを含む Equilibration buffer A で洗浄した後、300 mM イミダゾールを含む Equilibration buffer A で吸着タンパク質を溶出した。タンパク質溶出フラクションは、PD-10 カラム（GE healthcare, NJ, USA）を用い、50 mM Tris-HCl pH 7.8, 50% (v/v) にバッファーを置換し、-20˚C で保存した。

2.2.6. Anti-His-tag 抗体を用いた精製タンパク質の解析

精製タンパク質は、溶出フラクションの 3 μL に相当する量を使用し、還元条件下で 10% (w/v) アクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE で分離した。泳動後のタンパク質を PVDF 膜に転写し、転写後、5% スキムミルクを含む Phosphate buffered saline with 0.05% (w/v) Tween® 20 (PBS-T)で室温 1 hr 振盪し、ブロッキングを行った後、PBS-T を使用し、洗浄を行った。1 次抗体に、Anti-His-tag 抗体（GE healthare）を 2.5×10^4 倍希釈となるように PBS-T に加え、25˚C、1 hr 振盪した。PBS-T を用い、洗浄を行った後、2 次抗体に Anti-Mouse IgG, HRP-Linked Whole Ab Sheep (GE healthcare) を 1×10^5 倍希釈となるように PBS-T を加え、25˚C、1 hr 振盪した。PBS-T を用い、再度洗浄を行った後、Luminata Forte Western HRP 基質（Merck Millipore, Guyancourt, France）をメンブレンに浸潤させ、X-線フィルムにより化学発光を検出した。

2.2.7.　GME 酵素反応産物の解析

GME の酵素反応により生成された産物は、薄層クロマトグラフィー（TLC)、もしくは、逆相 HPLC により分析した。

TLC による分析では、まず、終濃度 1 M になるよう、サンプルにトリフルオロ酢酸（TFA）を加え、100˚C、20 min 加熱し GDP 糖を酸加水分解した後、遠心濃縮した。遠心濃縮後のサンプルを、20 µL の Millipore Q water に溶解させ、ヘキソース 0.5 µg 相当を、0.3 M リン酸 2 水素ナトリウムでプレランしたシリカゲルプレート（GE Healthcare）にスポットした。サンプルは、アセトン:*n*-ブタノール:Millipore Q water (8:1:1 (v/v/v)) で展開した。展開された単糖は、オルシノール硫酸法[119]で検出した。2 M 硫酸に溶解した 0.2% (w/v) オルシノール（Wako, Osaka, Japan）をプレートに噴霧し、100˚C で 10 min 加熱し、糖を呈色した。

HPLC による分析では、Watanabe et al.の手法[38]を参考に、各種逆相カラムを用い、酵素反応産物の分離を試みた。各物質の濃度は、各物質に対する検量線を基に算出した。HPLC 解析条件を以下に示す。

【HPLC 解析条件】　Hitachi LaChrom 2000/7000
Column: COSMOSIL C_{18}-AR II (4.6 × 250 mm, Nacalai) 又は、
COSMOSIL C_{18}-PAQ (4.6 × 150 mm, Nacalai) 又は、
TSKgel ODS-100V (4.6 × 150 mm, TOSOH)
Solvent: Millipore Q water：トリエチルアミン：酢酸（1000:4:2（v/v/v））
Flow rate: 0.8 mL/min (isocratic)
Detection: Absorbance 254 nm
Temperature: 30˚C

2.2.8. GDP-Man3',5'-エピメラーゼを用いた GDP-L-Gal 調製

GME 活性測定は、3.2.3.、3.2.5.で調製した酵素溶液を用いて行った。酵素反応溶液は、Wolucka *et al.*[39] もしくは、Watanabe *et al.* [38]の酵素反応溶液組成を参考にした。酵素反応溶液組成は以下の通り。

酵素反応溶液（粗精製酵素）	
Tris-HCl pH 7.5	25 mM
GDP-D-Man	0.2 mM
EDTA	0.1 mM
NAD^+	0.2 mM
酵素溶液	500 μg/mL

酵素反応溶液（精製酵素）	
Tris-HCl pH 7.5	25 mM
GDP-D-Man	0.2 mM
EDTA	0.1 mM
酵素溶液	500 μg/mL

酵素活性確認のための酵素反応は、20 μL の反応系で行い、25˚C、15 min 反応を行った後、100˚C、3 min ボイルすることで反応停止した。反応停止後溶液は、3 min, 15,000 × *g* 遠心した後、上清の 1/10 に相当する 2 μL を使用し、HPLC による解析を行った。

mg スケールでの GME 酵素反応は 50 mL の反応系で行った。また、2.2.5.で調製した精製 GME を用い、Watanabe *et al.*の手法を参考に行った[38]。反応溶液組成は以下の通り。

反応溶液（50 mL）	
Tris-HCl pH 7.5	50 mM
GDP-D-Man	100 mg
EDTA	1 mM
精製 GME	2.5 mg

反応溶液を、37˚C、30 min インキュベートした後、Centriprep filter device (MWCF 10 kDa; GE healthcare) を用い、限外濾過を行った。濾液を回収し、凍結乾燥した後、2 mL の Millipore Q water に溶解した。その後、HW-40F カラム（2.5 × 50 cm; TOSOH, Tokyo, Japan）を用い、サイズ排除カラムクロマトグラフィーを行うことで、脱塩を行った。溶出液は、1 mL/fraction で分取し、各フラクションの吸光度 260 nm を計測することで、糖ヌクレオチドの溶出位置を決定した。溶出フラクションをエバポレーター（室温）により濃縮した後、凍結乾燥し、

-80˚C で保存した。脱塩後のサンプルは、リサイクル HPLC により分離し、GDP-L-Gal に相当するピークを分取した。

2.2.9. オルタナティブリサイクル HPLC システムを用いた GDP-L-ガラクトース精製

凍結乾燥サンプルは、2 mL の Millipore Q water に再溶解し、オルタナティブリサイクル HPLC システム（Shimadzu, Kyoto, Japan）を用い、精製した。リサイクル HPLC は、DAISO-PAK ODS BP-10 (1.0 × 25 cm; DAISO, Osaka, Japan) を 2 本直列に結合し、2.5% (v/v) アセトニトリル：トリエチルアミン：酢酸（100:2:1, （v/v/v））を 流速 12 mL/min で送液した。以下の Fig. 2.2.9 に、オルタナティブリサイクル HPLC システムとその制御の詳細を示す。インジェクションは、ポンプ→Column A→Column B→検出器と送液される、Switch R の状態で行った。この際、サンプルはまず Column A にインジェクションされ、Column B を通って UV 検出器で検出された。UV 検出器（検出波長 254 nm）で検出されたピークを、ポンプ→Column B→検出器→Column A と送液される、Switch B に切り替えることでリサイクルした。UV 検出器で検出されたピークのリサクルはバルブの切り換えで行われ、Column B から Column A に循環された。Column A でサンプルが保持されている間に Switch R の状態に戻すと、溶液は Column A→Column B と送液され、Column 4 本分のカラム長で分離されたサンプルが検出器で検出された。このバルブ切り替え操作を数回繰り返すことで擬似的にカラム長を長くすることが可能なシステムである。ピークが十分分離されたらリサイクルを停止し、分取を行った[60]。

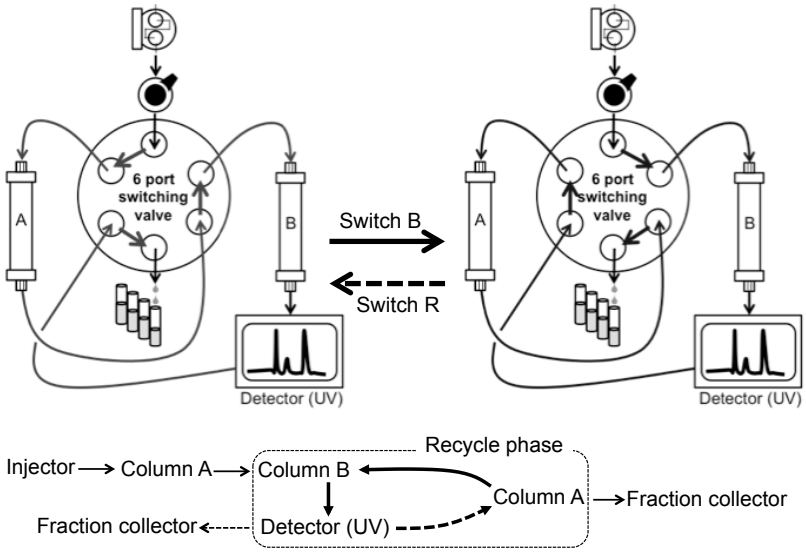

Fig. 2.2.9 オルタナティブリサイクル HPLC システムとその制御
オルタナティブリサイクル HPLC は、6 port switching valve と、直列に結合された 2 本のカラムから構成され、バルブの切り替え制御により、擬似的にカラム長を長くすることが可能となる。

2.2.10. L-フコキナーゼ/GDP-L-Fuc ピロホスホリラーゼの発現および精製

B. fragilis FKP は、pET22b his6propfkp[120]を導入した *E. coli* BL21 (DE3) 株を用い、発現させた。形質転換体は、37˚C、120 rpm、18 hr、20 mL の LB-Amp（100 μg/mL ampicillin）培地で前培養した後、1 L TB-Amp（100 μg/mL ampicillin）を用い、OD_{600}=0.6 まで 37˚C、80 rpm で培養した。0.1 mM IPTG を加えた後、25˚C、80 rpm、24 hr 培養し、発現誘導を行った。誘導後の菌体は、5,000 × *g*、15 min の遠心により回収し、-20˚C で保存した。LB 培地、TB 培地の組成は以下の通り。

LB 培地	
Bacto tryptone	1% (w/v)
Bacto yeast extract	0.5% (w/v)
NaCl	0.5% (w/v)

TB 培地	
Bacto tryptone	1.2% (w/v)
Bacto yeast extract	2.4% (w/v)
Glycerol	0.8% (v/v)
K_2HPO_4	0.94% (w/v)
KH_2PO_4	0.22% (w/v)

FKP の精製には、6 g（湿重量）の菌体を用いた。10 mM のイミダゾールを含む Equilibration buffer A（2.2.5 参照）を 10 mL 加え、氷上で融解した。その後、ソニケーション（3 × 30 sec）

により、細胞を破砕した。15,000 × *g*、30 min 遠心し、未破砕菌体、細胞破砕断片を除去した。His Trap HP 5 mL column (GE healthcare) に上清をアプライし、カラム容量の 5 倍量の 10 mM イミダゾールを含む Equilibration buffer で洗浄した、His タグ融合 FKP は、300 mM イミダゾールを含む Equilibration buffer A により溶出した。溶出フラクションは、Vivapin filter device (MWCF 5 kDa, GE healthcare) で限外濾過し、溶出バッファーを 100 mM Tris-HCl pH 7.8 に置換した。His タグ融合 FKP は、50% (v/v) グリセロール中で、-20˚C で保存した。

2.2.11. L-フコキナーゼ/GDP-L-Fuc ピロホスホリラーゼの酵素活性測定

FKP の酵素活性は、基質に ATP、GTP、L-Fuc または L-Gal を使用し、測定した。また、酵素反応で生じるピロリン酸を加水分解するため、Pyrophosphatase, Inorganic from baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) (PP_iase; Roche, Basel, Switzerland) を使用した。基質を混合し、37˚C、5 min インキュベートした後、FKP 及び PP_iase を加え、37˚C で酵素反応を行った。酵素反応の停止には、反応溶液の等量の、後述する反応停止液を加えた。酵素反応による生成物は、4,000 × *g*、20 min 遠心した後、上清を Wahl *et al.* の手法[121]を参考に、Multiplexed capillary electrophoresis (MP-CE)を用い、解析を行った。 以下に、基本的な酵素反応溶液、及び反応停止液の組成を示す。なお、FKP 活性 1 U は、以下の酵素反応溶液中、37˚C において、1 μmol の GDP-L-Fuc を、1 min で生成する酵素量として定義した。

酵素反応溶液	
Tris-HCl pH 7.5	50 mM
$MgCl_2$	4 mM
L-Fuc/L-Gal	2 mM
ATP	2 mM
GTP	2 mM
FKP	50 mU/mL
PP_iase	1 U/mL

反応停止液	
SDS	14 mM
4-aminobenzoic acid (PABA; internal standard)	2 mM

FKP 活性の時間依存性は、13 μg/mL の精製 FKP を用いて計測した。反応は、37°C で行い、3 min 毎に、0 min から 15 min までサンプリングを行い、サンプリングした酵素反応溶液と等量の反応停止液と混合した後、MP-CE で解析した。生成した GDP-L-Fuc/Gal 量は、MP-CE で得られたエレクトロフェログラムより、GDP-L-Fuc の検量線を基に算出し、L-Fuc 及び L-Gal に対する FKP の活性を評価した。

L-Gal に対する反応における、FKP の至適 pH は、pH 4.0 – 8.5 の範囲において、pH 0.5 刻みで測定した。なお、pH 4.0 – 6.0 は 50 mM MES-KOH、pH 6.0 – 7.0 は 50 mM MOPS-KOH、pH 7.0 – 8.5 は 50 mM Tris-HCl をバッファーとして用いた。反応は、37°C、5 min で行い、酵素反応停止後、MP-CE のエレクトロフェログラムより、FKP の活性を算出し、評価した。

金属イオン要求性は、50 mM Tris-HCl pH 7.5 の反応条件下で、終濃度が 4 mM になるように、EDTA、$MnCl_2$、$MgCl_2$、$CuCl_2$、$CaCl_2$、$ZnSO_4$ を添加、もしくは、2 価カチオンを添加せず、5 min 反応させた。酵素反応停止後、MP-CE のエレクトロフェログラムより、FKP の活性を算出した後、最も高い活性を保持した条件の反応量を 100% とし、各反応条件の活性を評価した。

L-Gal に対する FKP の酵素学的パラメーターは、50 mM Tris-HCl pH 7.5 の条件下で行った。金属イオンには、Mg^{2+}を用い、L-Gal 以外の基質はすべて前述した酵素反応条件に従った。0.2 – 8 mM（0.2 mM、0.8 mM、1.0 mM、1.5 mM、2.0 mM、4.0 mM。8.0 mM）の各点における L-Gal 濃度で FKP の反応を行い、GDP-L-Gal の生成速度を MP-CE のエレクトロフェログラムより算出した。酵素学的パラメーターは、Lineweaver-Burk プロットにより算出した。

2.2.12.　FKP を用いた GDP-L-Gal 生産

FKP を用い、数 10 – 数 100 mg スケールでの GDP-L-Gal 生産を以下の通り行った。250 mU/mL FKP、10 mM L-Gal、ATP、GTP、1 U/mL PP_iase、4 mM $MnCl_2$ を含む酵素反応溶液（33 mL）を 37˚C、3 hr インキュベートした。3 hr インキュベート後、1.1 U/mL FKP 溶液を 2 mL 添加（終濃度 300 mU/mL、35 mL）し、さらに 9 hr、37˚C でインキュベートした。酵素反応は、酵素反応溶液を、Vivaspin filter device（5 kDa MWCF; GE healthcare）で限外濾過し、酵素を除去することで停止した。回収した濾液は、2.2.13.に記載する精製ステップを行うまで、-80˚C で保存した。

2.2.13.　FKP 反応溶液からの GDP-L-Gal 精製

2.2.13.A. アルカリフォスファターゼ処理

2.2.12.で得られた濾液はまず、未反応のヌクレオチド類縁体のリン酸基を除去するため、Alkaline phosphatase from calf intestine（CIAP; TOYOBO）で処理をした。Tris-HCl pH 8.0 を終濃度 1 M になるよう添加した濾液に、終濃度 1 U/mL となりよう、CIAP を加え、緩やかに混合した後、22˚C、3 hr インキュベートした。CIAP 処理中、30 min 毎に pH を計測し、炭酸水素ナトリウムを添加し、pH 7.8 になるよう調整した。CIAP 反応後、Vivaspin filter device（MWCF 5 kDa）で限外濾過し、濾液を-80˚C で保存した。

2.2.13.B. 陰イオン交換カラムを用いた GDP-L-Gal の精製

陰イオン交換レジン DEAE Sephadex-A25（2.5 cm i.d. × 6.0 cm; GE Healthcare）は、4˚C において、10 mM 炭酸水素アンモニウム pH 7.5 で平衡化した。2.2.13.A.で得られた CIAP 処理サンプルは、Millipore Q water で 100 倍希釈し、DEAE レジンにロードし、レジンの 10 倍量の 10 mM 炭酸水素アンモニウム pH 7.5 で洗浄した。溶出は、300 mM

NH_4HCO_3 pH 7.0 で行い、溶出フラクションを 254 nm の吸光度で決定した。回収した溶出フラクション（20 mL）は、-80˚C で保存した。

2.2.13.C. 有機溶媒沈澱法による GDP-L-Gal の精製

有機溶媒によるヌクレオチドの沈澱に関する原理は、Bloomfield *et al.* により解説されている[122]。GDP-糖が含まれる溶液を、10 倍量のメタノール、エタノール、若しくは、イソプロパノールと混合し、−80˚C で 30 min インキュベートした。8,000 × *g*、30 min 遠心した後、上清を除去した。析出したペレットは、最小液量の Millipore Q water に溶解した後、凍結乾燥した。また、炭酸アンモニウムを完全に除去するため、凍結乾燥のステップは、3 回繰り返した。凍結乾燥後のサンプルは、-80˚C で保存した。

2.2.14. FKP 生成産物の解析

FKP の酵素反応により生成された産物は、MP-CE（cePRO 9600™ system; Advanced Analytical Technologies, Ames, IA）、もしくは、TSKgel ODS-100V を用いた HPLC 分析（3.2.7. を参照）により分離し、254 nm の吸光度を計測した。各物質の濃度は、各物質に対する検量線を基に算出した。

MP-CE による、FKP 生成産物の解析は、Wahl *et al.* の手法[121]を参考にした。MP-CE は、96 本のキャピラリー（effective length: 55 cm, total length: 80 cm, 50 μm i.d.）を用い、96 サンプルを同時に分析することが可能なハイスループットな解析系である。キャピラリーは、1 mM EDTA を含む 50 mM 酢酸アンモニウム pH 9.2 で充填され、12 kV の電圧で電気泳動を行った。サンプルは、96 穴 PCR プレートに分注し、1 mM EDTA を含む 50 mM 酢酸アンモニウム pH 9.2 で充填し、ピペッティングにより混合した後、キャピラリーに極微量ロードし、電気泳動を行った。サンプルロード量の差や、サンプルの蒸発による誤差は、内部標

準として加えた PABA を用い、キャリブレーションを行った。なお、各物質の泳動時間は、GDP-L-Fuc/Gal (21.85 min)、 GTP (43.08 min)、GDP (36.15 min)、ATP (46.46 min)、ADP (37.97 min)、PABA (26.85 min) だった。

HPLC による分離では、GME により生成された GDP-L-Gal をスタンダードとして用いた。各物質の溶出時間は、GDP-L-Gal (15.38 min)、 GTP (9.08 min)、GDP (11.08 min)、guanidine (17.13 min)、ATP (19.81 min)、ADP (26.73 min)、adenosine (17.12 min)だった。

2.2.15. Matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) による解析

GDP 糖や酵素反応溶液は、質量分析器 AutofLEX（Bruker Daltonics, Bremen, Germany）を使用した MALDI-TOF MS 解析により、*m/z* を計測した。マトリクスとして、α-Cyano-4-hydroxycinnamic acid（CHCA）（Bruker Daltonics）及び、2,5-dihydroxybenzoic acid（DHB）（Sigma） を使用した。マトリクスの組成は以下の通り。

【マトリクス 1】	終濃度
DHB	20 mg/mL
TFA	0.1% (v/v)
アセトニトリル	70% (v/v)

【マトリクス 2】	終濃度
CHCA	10 mg/mL
DHB	10 mg/mL
TFA	0.1% (v/v)
アセトニトリル	70% (v/v)

サンプルの調製は、Ayorinde *et al.*の手法[123]に従い、dried-droplet 法により調製し、MTP384 target plate of polished steel T L（Bruker Daltonics）上にスポットした。MALDI-TOF MS 解析条件は以下の通り。

【MALDI-TOF MS 条件】	AutoFLEX
Calibration standard	: Peptide Standard II mono（Bruker Daltonics）
N_2 laser	
Frequency	: 5.0 Hz
Polarity	: Positive/Negative

2.2.16. Proton nuclear magnetic resonance spectroscopy（^{1}H-NMR）解析

GME、及び FKP により生成された GDP-L-Gal（GME: 1.8 mg、FKP: 5.5 mg）は、凍結乾燥後、重水（D_2O: 99.9%, Wako）に溶解し、再度凍結乾燥した。D_2O に溶解したサンプルは、25˚C において、600 MHz Bruker Avance III HD Spectrometer（Bruker Daltonics）により NMR スペクトルを収集した。^{1}H ケミカルシフトは、HDO/H_2O（δ_H = 4.08）を基準とし、収集した。

2.3 結果

2.3.1. GDP-D-Man-3',5'-エピメラーゼ酵素活性測定系の構築

GDP-L-Gal は市場に流通しておらず、入手が困難なため、Wolucka *et al.* の手法[37]に従い、*A. thaliana* T87 培養細胞の破砕溶液より GME を粗精製し、GME 酵素反応を行った。酵素反応産物は、Wolucka *et al.*の手法[37]、Watanabe *et al.*の手法[38]を参考に、TLC、HPLC で解析を行った。TLC による解析では、酸加水分解により、糖ヌクレオチドから糖を遊離し、酵素反応溶液に含まれる糖残基を検出した。スタンダードとして用いた D-Man の R_f 値は 0.42、L-Gal の R_f 値は 0.24 だった（Fig 2.3.1 A）。ポジティブコントロールとして用いた、GDP-L-Fuc 及び GDP-D-Man を酸加水分解したサンプルで得られたスポットは、それぞれ $R_f = 0.92$ 及び 0.42 であった。酵素反応産物では、$R_f = 0.24$、0.42、0.58、0.92 のスポットが検出された（Fig 2.3.1 A）。この結果より、酵素反応産物には、D-Man、L-Gal を含有する糖ヌクレオチドが含まれていることがわかった。また、GME は、GDP-L-Gul も生成することが知られている[38, 39]ことから、$R_f = 0.58$ のスポットは、L-Gul 由来のスポットだと考えた。 以上より、粗精製酵素溶液を用い、GME の酵素活性を得ることができた。

TLC により、GDP-L-Gal、GDP-L-Gul の生成が検出されたため、粗精製酵素溶液を用いた酵素反応産物を用い、GME 生成産物の HPLC による解析系の構築を行った。COSMOSIL $5C_{18}$ AR-II カラムを用い、酵素反応産物の分離を試みた場合、GDP-D-Man と、酵素反応産物として予測される GDP-L-Gal、GDP-L-Gul、これらの 3 つの GDP 糖を分離することができなかった。そこで、COSMOSIL $5C_{18}$-PAQ カラムを用い、解析した結果、新規なピーク（peak a、保持時間 12.0 min）が検出された（Fig. 2.3.1 B）。また、TOSOH ODS-100V カラムを用い、解析した結果、酵素反応産物と考えられる 2 つの新規ピーク（peak b、peak c、保持時間 15.2 min、16.0 min）が検出された。TOSOH ODS-100V カラムで検出された peak b を分取し、

MALDI-TOF MS (Negative ion mode) で *m/z* を測定したところ、*m/z* 604.064、*m/z* 626.148、*m/z* 648.224 が検出され、それぞれ[GDP ヘキソース －H]$^-$（*m/z* 604.174）、[GDP ヘキソース －2H ＋ Na]$^-$（*m/z* 626.199）、[GDP ヘキソース －H ＋ 2Na]$^-$（*m/z* 648.223）と考えられた。これらの結果と、先行研究の HPLC 分析による GME 酵素反応産物の分析結果[38]より、GDP-D-Man の次に溶出したピークが GDP-L-Gal に相当すると推定した。

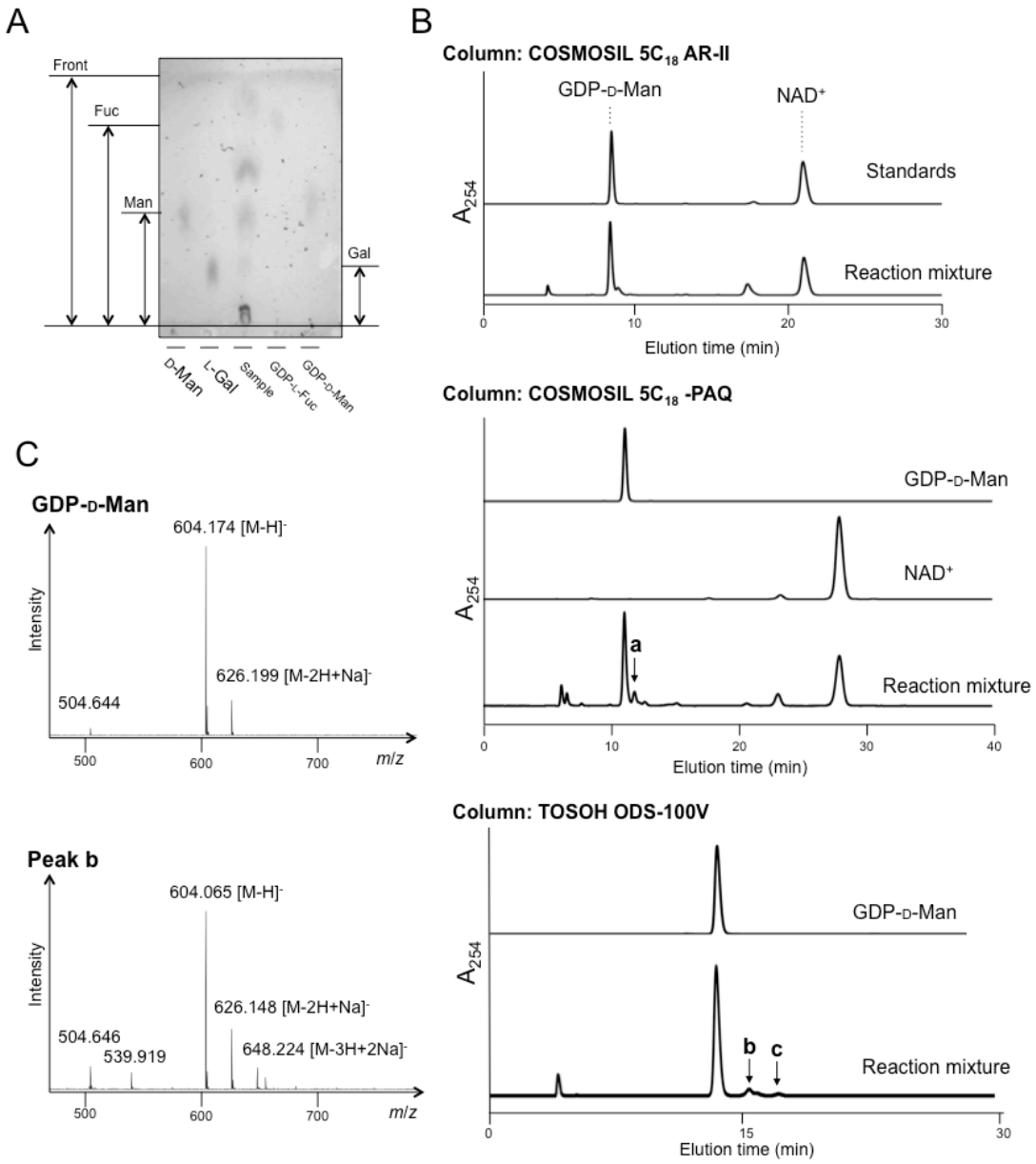

Fig 2.3.1. T87 細胞より調製した酵素溶液による反応物の解析

A: TLC による酵素反応産物の解析結果。B: 各種 ODS カラムを用いた HPLC による、GME 酵素反応産物の解析結果。a、b 、c は各カラムで検出された新規ピークを示す。C: MALDI-TOF MS(Negative ion mode) による、GDP-D-Man、分取した Peak b の解析結果。

2.3.2. 組換え GDP-D-Man-3',5'-エピメラーゼの発現と精製

GDP-L-Gal を mg スケールで調製するため、*S. pombe* を発現宿主とし、*A. thaliana* 由来 GME（At5g28840.1）を、N 末端 6 × His タグ融合タンパク質として発現させた。発現ベクター（pREP1-HisGME: Fig. 2.3.2 A）を導入した *S. pombe* を培養・発現誘導した後、集菌した。集菌した菌体をガラスビーズ破砕後、3,000 × *g*、20 min 遠心した後、破砕溶液上清を回収した。破砕溶液上清を SDS-PAGE にて展開、CBB 染色およびウエスタンブロッティング解析を行った。CBB 染色の結果、pREP1-HisGME 形質転換体では、44.6 kDa 付近に発現タンパク質の予測分子量と一致するバンドを検出した。また、Anti-His tag 抗体を用いたウエスタンブロット解析では、44.6 kDa 付近に、His タグ特異的なバンドが検出された（Fig. 2.3.2 B）。この破砕溶液上清より、Ni-IMAC アフィニティーレジンを用い、His タグ融合タンパク質の精製を行った。精製産物を SDS-PAGE で展開し、CBB 染色、ウエスタンブロッティング解析を行ったところ、300 mM イミダゾール溶出フラクションにおいて、目的タンパク質の単一バンドが検出されたため、目的タンパク質が精製できたと考えた（Fig2.3.2 C）。BSA を標準タンパク質としたブラッドフォード法により、精製後の GME 濃度を計測したところ、1.42 mg/mL（総量 9.82 mg）だった。

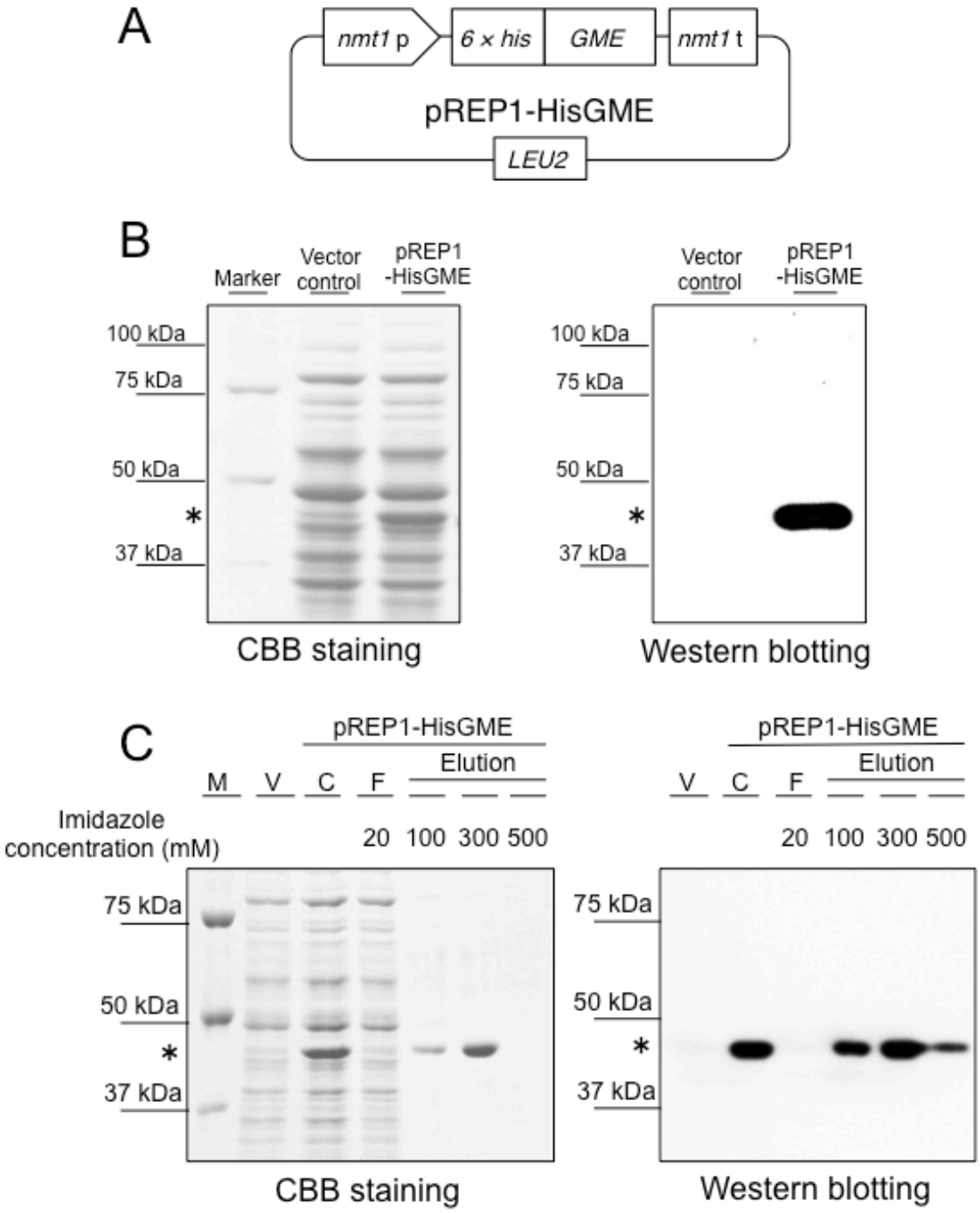

Fig. 2.3.2 *S. pombe* による 6 × His タグ融合 GME の発現と精製

A: *S. pombe* の形質転換に用いた発現ベクター、pREP1-HisGME。*nmt1* プロモーター下流に、*GME* 遺伝子配列を挿入した。*LEU2*、ロイシン要求性マーカー遺伝子; *nmt1* p、nmt1 プロモーター配列; *nmt1* t、nmt1 ターミネーター配列。B: GME 発現株の CBB 及びウエスタンブロッティング解析結果。*は 6 × His タグ融合 GME の予測分子量（44.6 kDa）を表す。C: 精製 GME の CBB およびウエスタンブロッティング解析結果。*は 6 × His タグ融合 GME の予測分子量（44.6 kDa）を表す。M、マーカー; V、ベクターコントロール（pREP1 形質転換株）; C、pREP1-HisGME 形質転換株; F、フロースルー及び洗浄フラクション

2.3.3. 組換え GDP-D-Man-3',5'-エピメラーゼの酵素活性

S. pombe により生産した His タグ融合 GME を用い、酵素反応時間、基質濃度の違いによる GDP-L-Gal 生産速度の変化とエピメリ化効率の関係を解析した（Fig.2.3.3）。精製 His タグ融合 GME 500 μg/mL を酵素溶液として使用し、2 mM GDP-D-Man を基質に酵素活性の経時変化を測定した（Fig. 2.3.3 A）。また、GDP-D-Man の濃度に依存するエピメリ化効率の変化を測定した（Fig. 2.3.3 C）。酵素反応産物の解析には TSKgel ODS-100V カラムを用いた。酵素活性測定の結果、保持時間 14.5 min 付近に Peak d、16 min 付近に Peak e が検出された。GDP-D-Man は保持時間 13 min 付近に溶出した（Fig. 2.3.3 A）。T87 培養細胞破砕液を粗精製した溶液を酵素とした酵素反応により GDP-L-Gal と予測されたピークと、Peak d の溶出時間が一致したことから、Peak d は GDP-L-Gal と考えられた（Fig. 2.3.3 B）。そこでまず、His タグ融合 GME の酵素反応時間依存性を測定した。GDP-L-Gal と予測された Peak d は反応時間 10 min までは反応時間依存的に増加したが、反応時間 10 min 以降、反応物生成速度が低下し、酵素反応時間 30 min におけるエピメリ化効率は 15.6% だった（Fig. 2.3.3 A）。さらに、この His タグ融合 GME の酵素速度論的解析を酵素反応時間 8 min で行ったところ、GDP-D-Man に対する K_m は 17.8 μM、V_{max} は 0.40 μmol･h^{-1}･mg^{-1} だった。GDP-D-Man 濃度の変化による酵素活性の変化について、GDP-D-Man 濃度 1.0、2.5、5.0、7.5 mg/L におけるエピメリ化効率を 0、5、10、15 min で測定したところ、GDP-D-Man 濃度が上昇するとエピメリ化効率が徐々に低下する傾向にあった。この傾向は、反応後 5 min までで特に顕著だった。15 min 以上酵素反応を行った場合、エピメリ化効率は GDP-D-Man 濃度 1.0 mg/mL で 15.8%、7.5 mg/mL で 13.5 % であり、例えば 100 mg の GDP-D-Man を基質として反応を行った場合、GDP-D-Man 濃度 1.0 mg/mL で反応を行う方が、GDP-D-Man 濃度 7.5 mg/mL で反応を行う場合よりも GDP-L-Gal の最終生成量が多いと予測された（Fig. 2.3.3 C）。この結果より、mg ス

ケールでの酵素反応条件を、酵素濃度 500 μg/mL、GDP-D-Man 1.0 mg/mL、25˚C、30 min とした。

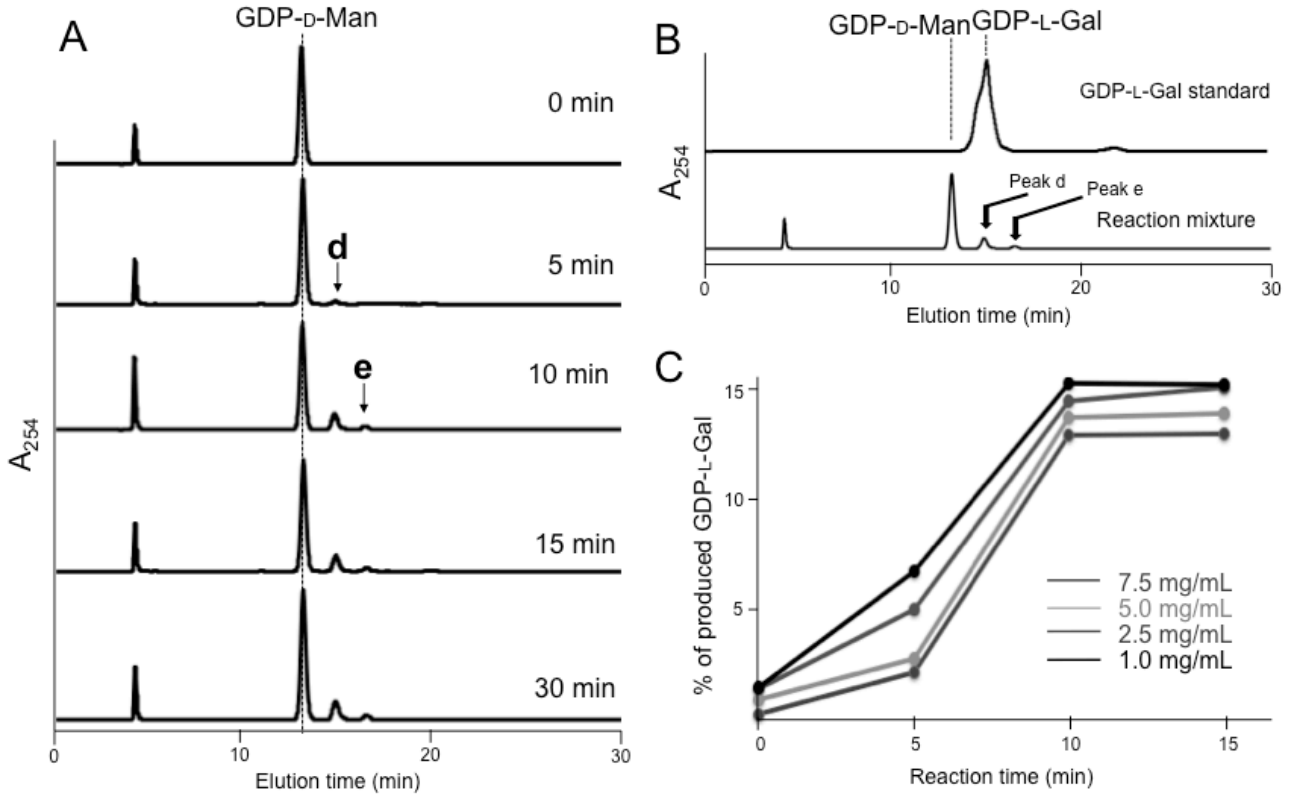

Fig. 2.3.3 酵素反応時間、基質濃度の違いによるエピメリ化効率の変化

A: GME 酵素反応の経時変化。酵素反応は、15-30 min で平衡に達した。B: T87 培養細胞破砕液を用いて調製した GDP-L-Gal のスタンダードと、*S.* pombe により異種発現した GME 酵素反応産物の比較。C: GDP-D-Man 濃度の違いによる、エピメリ化効率の変化。

2.3.4. 組換え GDP-D-Man-3',5'-エピメラーゼを用いた GDP-L-Gal 調製

mg スケールでの GME 酵素反応では、53 mg の GDP-D-Man と 29.8 mg の精製 His タグ融合 GME を使用し、50 mL の系で 25˚C、30 min 酵素反応を行った。酵素反応後、10 kDa MWCF メンブレンで His タグ融合 GME を除去し、逆相 HPLC（TSKgel ODS-100V）により計測したエピメリ化効率は基質として用いた GDP-D-Man の 17.2% だった（Fig. 2.3.4 A）。この酵素反応後溶液は TOYOPARL HW-40F（2.5 i.d. × 25 cm）にて脱塩を行い、GDP 糖が溶出したフラクションを凍結乾燥した。数百 μg から数 mg の GDP 糖を一度にインジェクションし、解析に使用した TSKgel ODS-100V を用いて GDP-L-Gal と考えられるピークの分取を行った

場合、サンプルのオーバーロードが原因となり、GDP-D-Man と酵素反応産物の分離が十分できないという問題点があった。そこで、オルタナティブリサイクル HPLC により精製を行った。オルタナティブリサイクル HPLC を使用することで、十分分離されていないピークを、流路にタンデムに設置した 2 本のカラム間を循環させることで、擬似的にカラム長を長くして理論段数をかせぎ、GDP 糖の分離の改善を期待した。オルタナティブリサイクル HPLC による分取に先立ち、Daiso-PAK BP（2.0 × 25 cm）を 2 本直列に接続し、10 mg ずつカラムに供し、GDP-L-Gal と予測されるピークの粗精製を行った。粗精製産物を凍結乾燥後、リサイクル HPLC を行った。リサイクル HPLC の分析条件を検討したところ、Millipore Q water : トリエチルアミン : 酢酸 = 1000 : 2 : 1 で分析すると GDP 糖の保持時間は長いが、GDP-糖の分離は悪いため、大量の溶媒が必要だとわかった。そこで、アセトニトリルを 2.5% 加え、GDP 糖と C_{18} カラムの相互作用を低減させ、保持時間を短くした。このことにより、カラム圧力が減少したため、コンベンショナル HPLC による分析時の線流速とリサイクル HPLC による分取時の線流速を近づけることができ、リサイクル HPLC 時の理論段数が分析時の結果をより良く反映することが期待された。また、リサイクル回数の上昇による分離度の向上も期待された。粗精製産物のリサイクル 1 回目で GDP-D-Man が分離されたため、その GDP-D-Man を分取し、それ以外の未分離サンプルを再度リサイクルした。リサイクル 2 回目で、GDP-Gul と考えられるピークがベースライン分離できたため、GDP-L-Gal と考えられるピークを再度リサイクルし、GDP-L-Gul と考えられるピークは分取した。3 回目のリサイクルで、GDP-L-Gal と考えられるピークは Peak 1、Peak 2 の 2 つのピークに分離された（Fig. 2.3.4 B）。Peak 1、Peak 2 をそれぞれ分取し、薄層クロマトグラフィー、質量分析法にて分析し、GDP 糖の同定を試みた。TLC により、酵素反応後サンプル、Peak 1、Peak 2 に含まれる糖残基を検出した。精製前サンプルからは D-Man のシグナルと、弱い D/L-Gal のシグナルが

検出された。また、Peak 1、Peak 2 からはともに D/L-Gal のシグナルが検出され、D-Man のシグナルは検出されなかった。この結果より、精製前サンプルには D-Man 残基が付加した物質と D/L-Gal 残基が付加した物質が含まれており、分取した Peak 1、Peak 2 には D/L-Gal 残基が付加した物質が含まれていることが分かった（Fig. 2.3.4 C）。さらに、Peak 1、Peak 2 を MALDI-TOF MS (Negative ion mode) により解析したところ、Peak 1 では *m/z* 604.085、*m/z* 626.114 が検出された。また、Peak 2 では、*m/z* 604.085、*m/z* 626.114、*m/z* 649.211、*m/z* 650.302 が検出された。[GDP-ヘキソース – H]$^-$は *m/z* 604.069、[GDP-ヘキソース – 2H + Na]$^-$は *m/z* 626.051、[GDP-ヘキソース – 2H + 2Na]$^-$は *m/z* 649.305、[GDP-ヘキソース – H + 2Na]$^-$は *m/z* 650.04 と予測されることから、Peak 1、Peak 2 でともに検出された *m/z* 604.085 は[GDP-ヘキソース – H]$^-$、*m/z* 626.114 は[GDP-ヘキソース – 2H + Na]$^-$と判断した。また、Peak 2 で検出された *m/z* 649.211 は[GDP-ヘキソース – 2H + 2Na]$^-$、*m/z* 650.302 は[GDP-ヘキソース – H + 2Na]$^-$と判断した。加えて、Peak2 では *m/z* 626.114 が最も強いシグナルとして検出された（Fig. 2.3.4 D）。このことより、Peak 2 には主に GDP-ヘキソースナトリウム塩が含まれていると考えられた。さらに、Peak 1 の NMR 解析を行ったところ、Table A に示すケミカルシフトが検出され、精製した Peak 1 が GDP-L-Gal に相当することがわかった（Table 2.3.4）。また、精製後の GDP-L-Gal（Peak 1）は 2.2 mg だった。この GDP-L-Gal の純度を HPLC で計測したところ、純度 96% だった (Fig. 2.3.4 A)。しかし、NMR 解析結果より純度を計測すると、リボース由来のケミカルシフト（5.95 ppm）、グアニン由来のケミカルシフト（8.13 ppm）が GDP-L-Gal 特有のケミカルシフト（4.97 ppm）の 142% あり、NMR 解析中に GDP-L-Gal が分解されたと考えられた（Fig. 2.3.4 E）。また、1.2 ppm（Fig.2.3.4 E 中※）に、ケミカルシフトが検出された。このケミカルシフトは、アミン類のケミカルシフトと一致した。つまり、移動層として用いたトリエチルアミンが残留していると予測される。

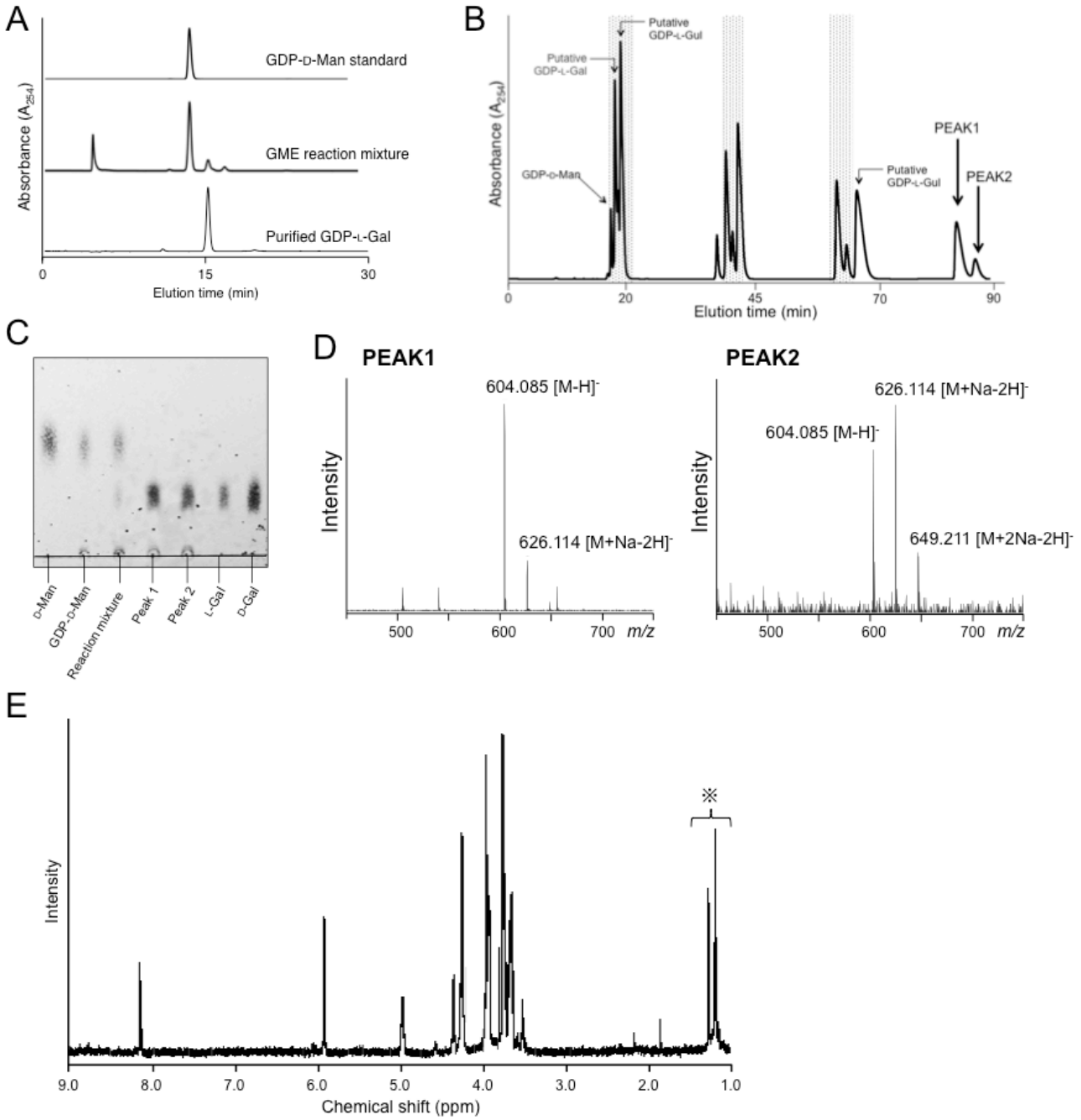

Fig. 2.3.4 GME 酵素反応溶液からの GDP-L-Gal の精製と、精製サンプルの解析

A: mg スケールでの GME 酵素反応サンプルと、精製 GDP-L-Gal の HPLC 解析結果。カラムは、TOSOH ODS-100V を使用した。B: オルタナティブリサイクル HPLC による予測 GDP-L-Gal サンプルの精製。Peak 1 及び Peak 2 を分取した。C: Peak 1 および 2 の TLC 解析結果。D: Peak a および Peak 2 の MALDI-TOF MS (Negative ion mode) 解析結果。E: Peak 1 の NMR スペクトル。^{1}H ケミカルシフトは、HDO（δ4.70 ppm）を基準とした。※は、GDP-L-Gal に由来しないケミカルシフト。

Table 2.3.4 Peak 1 の NMR 解析結果

	Chemical shifts, δ[a]						
Sugar residue	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6	H-8
β-D-Ribose	5.95	n.d.[b]	n.d.	4.37	4.23		
β-L-Galactose	4.97	3.62	3.69	3.93	3.75	3.75	
Guanine							8.13

[a] Chemical shifts (parts per million) of ^{1}H signals were referenced to the signal of HDO (δ 4.70 ppm).
[b] n.d., Signals were not detected due to the limited amounts and partial overlapping with HDO signal.

2.3.5. 組換え FKP の酵素学的解析

L-Gal に対する *B. fragilis* 由来 FKP の酵素活性は未知であるため、その酵素学的性質を調査した。*B. fragilis* 由来 FKP は、Engels *et al.*の手法[120]に従い、*E. coli* を用いて His タグ融合タンパク質として発現させた。*In vitro* での GDP-L-Gal 合成のため、Wahl *et al.* の手法[121]を参考に、マルチプレックスキャピラリー電気泳動（MP-CE）を用い、2 価カチオン要求性、基質濃度、酵素速度論的解析を行った。MP-CE は、96 穴プレートを用い、1 度に 96 サンプルの電気泳動を行うことで、ハイスループットな解析を可能にする、至適酵素反応条件の探索における強力なツールである。まず、FKP 酵素反応産物に関する MP-CE での解析系を構築するため、GDP-L-Fuc、ATP、ADP、GTP、GDP をスタンダードとし、各スタンダード溶出位置と、直線性を示す濃度範囲を決定した（Fig. 2.3.5-1 A and B）。このスタンダードの解析結果を元に、FKP の酵素反応により生成した産物の推測を行ったところ、L-Gal を基質として用いた酵素反応サンプルでは、新規 Peak F が GDP-L-Fuc 泳動時間の近傍に出現し、経時的に増加していたため、GDP 糖が生成していると考えられた（Fig. 2.3.5-1 C）。GME を用いて生成した GDP-L-Gal をスタンダードとして MP-CE で解析したところ、GDP-L-Gal は、Peak F の泳動時間と一致したため、Peak F は GDP-L-Gal と推定した（Fig. 2.3.5-1 D）。

まず、L-Fuc を基質とした場合、L-Gal を基質とした場合の、FKP による GDP 糖の生成速度を比較した（Fig. 2.3.5-2 A）。1.3 μg/mL の FKP を用い、L-Fuc を基質とした場合、FKP は

GDP-L-Fuc を 45.5 mM/min で生成した。一方、L-Gal を基質とした場合、FKP は GDP-L-Gal を 31.9 mM/min で生成した。つまり、FKP により、GDP-L-Gal は、GDP-L-Fuc の 70% の生成速度で生成されることがわかった。また、FKP の酵素活性 1 U を、第 2 章で示した酵素反応溶液中において、2 mM の基質から、1 μmol の GDP-L-Fuc を 1 min に生成する際に必要な酵素量と定義し、50 mU/mL の FKP を用い、以降の実験を行った。

次に、2 価金属イオンおよび pH の影響を調査した。FKP は、Mn^{2+}存在下、Mg^{2+}存在下で L-Gal に対する酵素活性を示したものの、Cu^{2+}、Ca^{2+}、Zu^{2+}や、金属イオンを含まない酵素反応条件では、GDP-L-Gal を生成しなかった。また、FKP は、Mn^{2+}存在下で最大活性を示し、Mg^{2+}存在下では、Mn^{2+}存在下の 40% の反応効率を示した（Fig. 2.3.5-2 B）。この結果より、FKP の L-Gal に対する反応は、金属イオンが必須であり、Mn^{2+}が至適な金属イオンであると考えられる。また、pH の影響を、pH 4.0 から pH 8.5 で pH 0.5 ずつ調査したところ、L-Gal に対する FKP 酵素反応の至適 pH は、pH 7.5 付近だった（Fig. 2.3.5-2 C）。また、pH 6.0 未満では、FKP は L-Gal に対する酵素活性を示さなかった。以上の解析結果を基に、FKP の L-Gal に対する至適反応条件下における酵素学的パラメーターを算出した（Fig. 2.3.5-2 D）。0.2 から 8.0 mM の L-Gal に対する FKP の反応の初速度を、pH 7.5、2 mM Mn^{2+}を含む溶液で計測し、Lineweaver-Burk プロットにより、酵素学的パラメーターを算出した。FKP の L-Gal に対する酵素学的パラメーターは、K_m: 2.03 mM、 k_{cat}: 0.195 sec^{-1} であり、Wang *et al.*により算出された L-Fuc に対する酵素学的パラメーター[115]を基にすると、FKP は L-Fuc よりも L-Gal に対する親和性が低く、複合体形成が起こりにくいと考えられた。

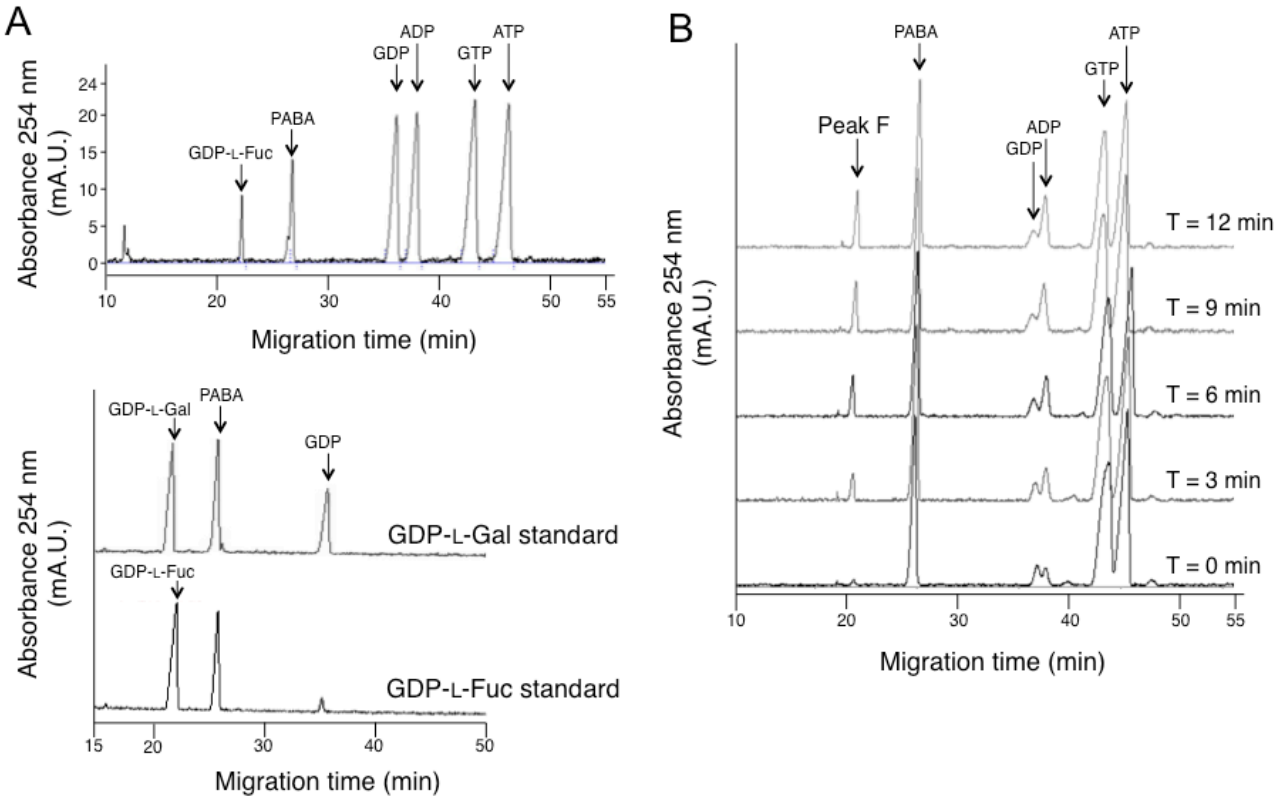

Fig. 2.3.5-1 L-Gal に対する FKP の酵素活性解析結果

A: 各種スタンダードの MP-CE エレクトロフェログラム。PABA を内部標準として用いた。GDP-L-Gal は、2.3.4 で精製した GME 由来の GDP-L-Gal を用いた。GDP-L-Gal と GDP-L-Fuc の泳動時間は類似していた。また、GDP-L-Fuc は、0.1-5.0 mM、ATP は 0.25-2.5 mM、GTP は 0.25-2.5 mM の範囲で直線性を示した。B: FKP の L-Gal に対する酵素活性。経時変化は MP-CE で解析した。時間依存的に泳動時間 20.2 min の Peak F が増加した。

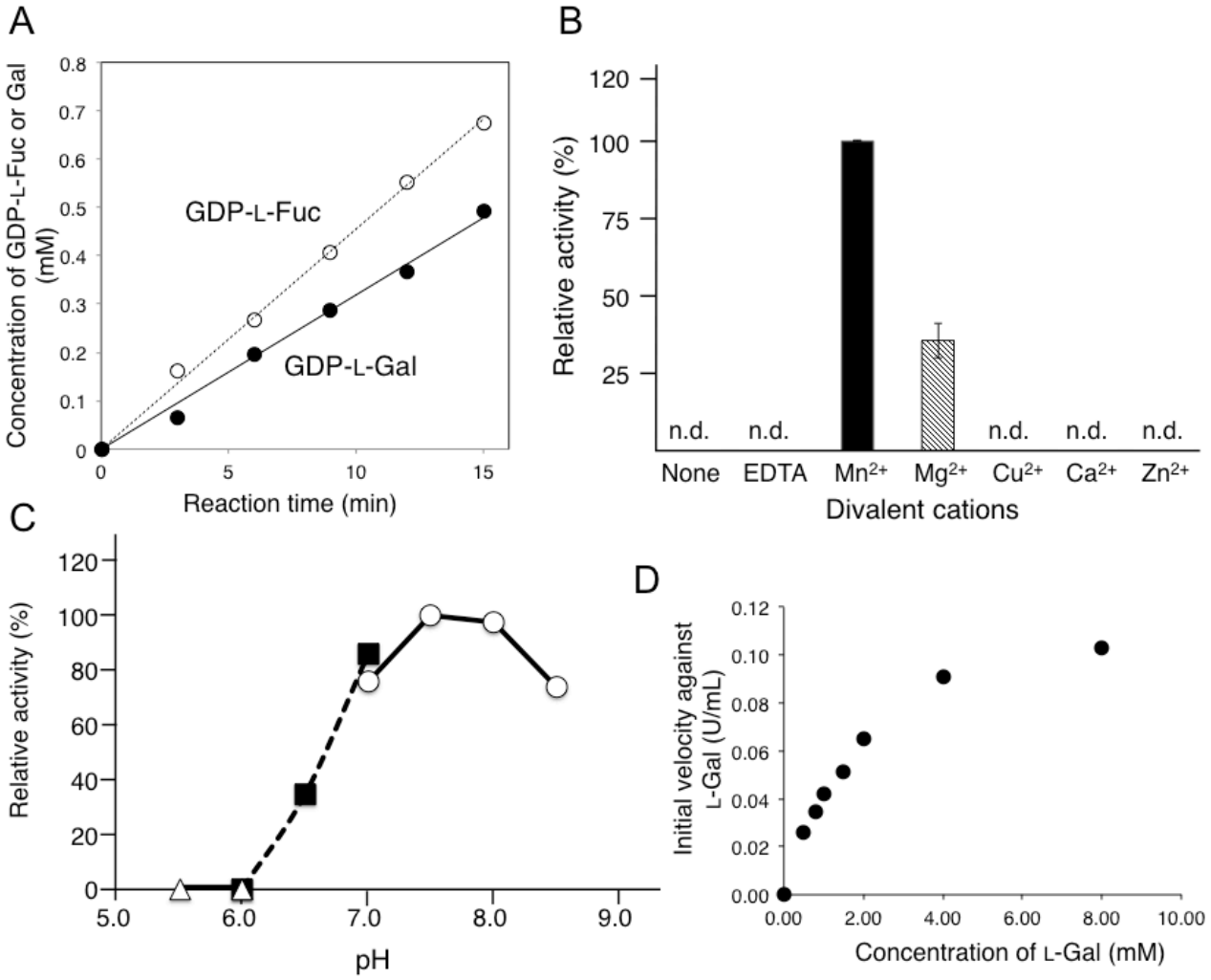

Fig. 2.3.5-2 L-Gal を基質とした FKP の酵素学的解析

A: L-Fuc（○）、L-Gal（●）を基質とした FKP の酵素反応初速度の比較。生成された GDP-糖は、MP-CE で計測し、ピークエリアより、GDP-L-Fuc の検量線を用いて算出した。B、C: 金属カチオン（B）および pH（C）の影響。B: 2 過カチオンは終濃度 4.0 mM で反応を行った。反応は、50 mM Tris-HCl pH 7.4、2 mM L-Gal、2 mM ATP、2 mM GTP、37˚C、10 min で行った。Mn^{2+}を用いた場合の活性を 100% として算出した。C: pH の影響は、次のバッファーを用いて反応を行った。MES-KOH（△）、HEPES-NaOH（■）、Tris-Hcl（○）。反応は、50 mM Tris-HCl pH 7.4、2 mM L-Gal、2 mM ATP、2 mM GTP、4 mM Mn^{2+}の反応溶液を用い、37˚C、10 min で行った。pH 7.5 における活性を 100% として各 pH における活性を算出した。D: L-Gal に対する FKP の酵素反応速度論的解析。反応は、50 mM Tris-HCl pH 7.5、 2 mM ATP、2 mM GTP、4 mM Mn^{2+} 50mU/mL FKP の反応溶液を用い、37˚C、10 min 反応を行った。

2.3.6.　　組換え FKP を用いた GDP-L-Gal 生産系の構築

GDP-L-Gal を生産する際、高い基質濃度で反応を行うことで、単位時間・単位容積当たりの生産性の向上が期待されるため、各基質を 10 mM 含む反応溶液において、GDP-L-Gal の生産効率を調査した（Fig. 2.3.6 A）。50 mU/mL の FKP を用い、3 hr 反応させた場合、収率 14% だった。一方、高濃度の FKP を用いた場合、収率 82%（250 mU/mL）、87%（300 mU/mL）と収率が改善した。以上の結果より、高濃度の基質を用いた場合でも、過剰酵素を用いることで、収率良く酵素反応を行うことが可能だと考え、FKP による分取スケール（数百 mg スケール）での GDP-L-Gal 生産を試みた。分取スケールでの反応は 2 段階に分けて行った。まず、250 mU/mL の FKP を用い酵素反応を行った後、さらに酵素を添加し、終濃度 300 mU/mL になるよう FKP を加え、さらに酵素反応を行うことで、さらに収率を向上させることが可能だと予測した。結果、収率 97% で、L-Gal 330 μmol（59.5 mg）より、GDP-L-Gal 319 μmol（193 mg）を得ることができた（Fig. 2.3.6 B）。

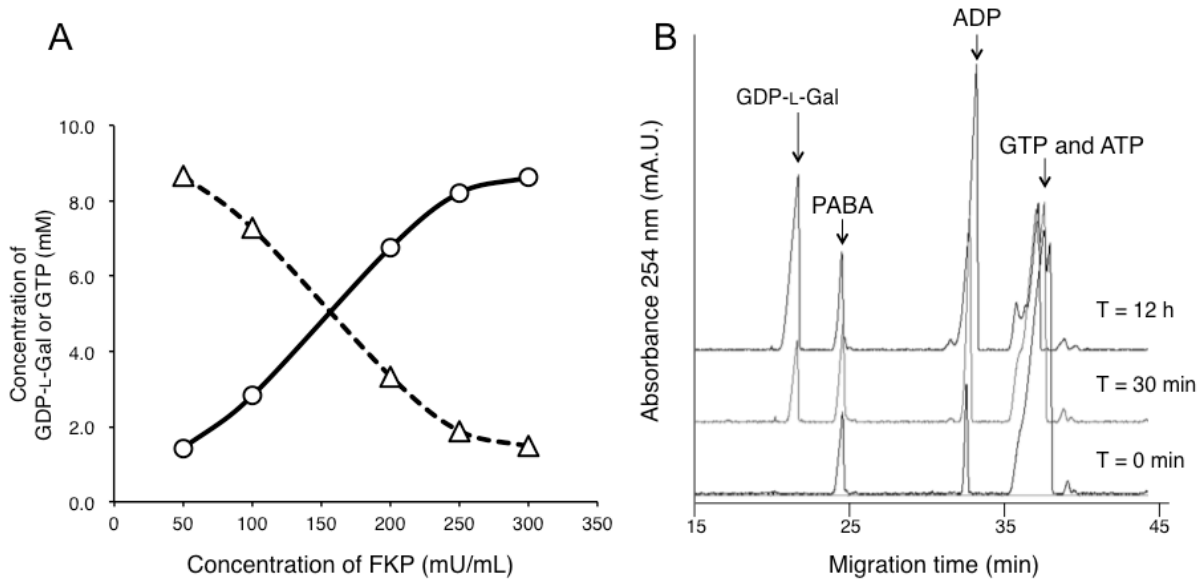

Fig. 2.3.6 *B. fragilis* FKP を用いた分取スケールでの GDP-L-Gal の調製

10 mM の基質を用いた酵素反応系における FKP 酵素濃度と生成物の関係。GDP-L-Gal（○）と GTP（△）の濃度は、37°C、3 hr 反応後、MP-CE を用いて計測した。B: GDP-L-Gal を分取スケールで調製したサンプルの MP-CE 解析結果。酵素反応は 12 hr 行った。FKP 濃度 250 mU/mL で 3 hr 反応を行った後、終濃度 300 mU/mL になるよう、さらに FKP を加え、9 hr 反応を行った。PP_iase は 10 U/mL 用い、各基質は 10 mM で酵素反応を行った。

2.3.7. GDP-L-Gal の精製

FKP 酵素反応溶液より GDP-L-Gal を精製する際、スケールアップが容易で、精製ステップの少ない系の構築を目指した。FKP 酵素反応産物には、未反応基質（L-Gal、ATP、GTP）と副生成物（ADP）、分解物（GDP）が含まれている。アルカリフォスファターゼは、有機リン酸エステル結合を加水分解し、無機リン酸まで分解する。ヌクレオチドに作用させた場合、ヌクレオシドまで分解される。一方、糖ヌクレオチドの有するリン酸ジエステル結合は分解しない。pH 8 付近において、糖ヌクレオチドは負電荷を有するが、ヌクレオシドは負電荷を有さないため、アルカリフォスファターゼにより ATP、GTP、ADP、GDP をアデノシン、グアノシンへ分解することで、陰イオン交換カラムによる GDP-L-Gal の精製が可能になると考えた。FKP の酵素反応溶液を、アルカリフォスファターゼで処理したところ、酵素反応溶液に含まれるヌクレオチドは、アデノシンもしくはグアノシンまで分解された（Fig. 2.3.7 A）。DEAE カラムに供したところ、GDP-L-Gal は DEAE 担体上に保持され、塩濃度勾配により溶出された（Fig. 2.3.7 B、C）。DEAE カラムのフロースルーにおいて、新規なピーク Peak G が検出されたが、このピークは MALDI-TOF MS の結果、*m/z* 122.072 が検出された（Fig. 2.3.7 D）ため、トリスヒドロキシアミノメタンに由来するピークだと考えられた。GDP-L-Gal 溶出フラクションは、凍結乾燥もしくは、有機溶媒による沈澱により濃縮した。凍結乾燥により濃縮した場合、濃縮後の GDP-L-Gal は、38.3% が分解されており、純度、収率それぞれ 61.7%、60% だった（Fig 2.3.7 E）。そこで、有機溶媒による沈澱により濃縮を試みた。予備実験として、300 mM NH_4HCO_3 を含む 100μL の 10 mM GDP-D-Man 溶液に、10 倍量のメタノール、エタノール、イソプロパノールを加え、沈澱を回収し、凍結乾燥した。それぞれの収率を、HPLC を用いて定量したところ、イソプロパノールにより沈澱させた場合、96.0 % の収率で GDP-D-Man を得ることができた（Table 2.3.7-1）。この結果を基に、

DEAE カラム溶出サンプルに 10 倍量のイソプロパノールを加え、GDP-L-Gal の濃縮を行った。得られた沈澱を凍結乾燥後、HPLC により純度、収率の定量を行ったところ、それぞれ 99% 以上、98% だった（Fig. 2.3.7 E）。有機溶媒による沈澱を用いることで、GDP-L-Gal の分解を抑制することができた。FKP による GDP-L-Gal 生成から、GDP-L-Gal 精製まで含めたトータルの収率は、92% だった（Table 2.3.7-2）。

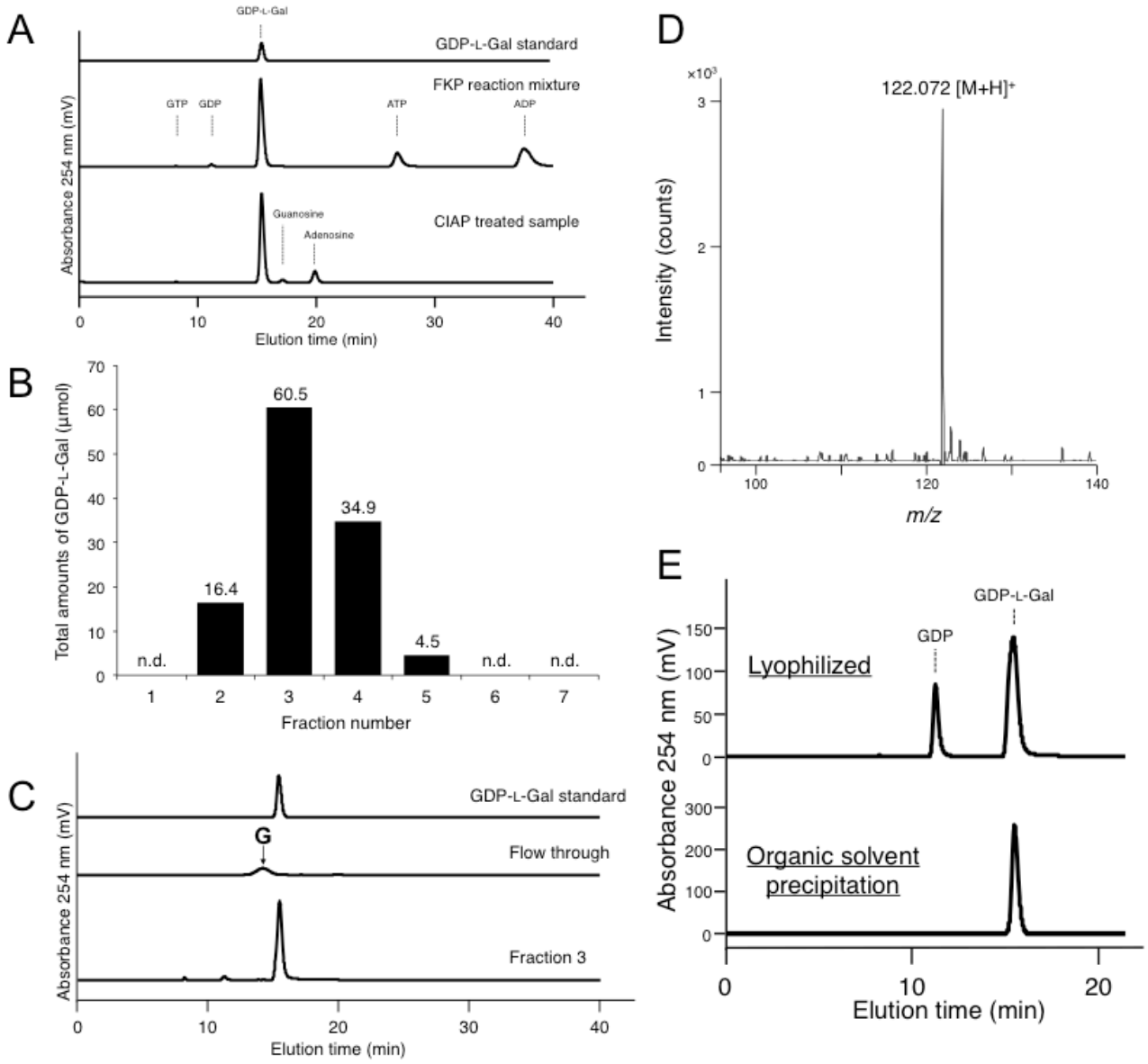

Fig. 2.3.7 GDP-L-Gal の精製

A: アルカリフォスファターゼ（CIAP）処理前後の、FKP 酵素反応産物の HPLC クロマトグラム。GDP-L-Gal スタンダードは、GME の酵素反応により調製し、HPLC で精製した。B、C: DEAE-Sephadex A-25 カラム（2.5 cm i.d. × 6.0 cm）を用いた GDP-L-Gal の精製。B: DEAE カラムの溶出フラクションに含まれる GDP-L-Gal 量。溶出した GDP-L-Gal 量は、HPLC クロマトグラムの面積値より算出した。C: GDP-L-Gal の DEAE カラムへの結合及び溶出フラクションの HPLC クロマトグラム。GDP-L-Gal スタンダードは、A と同様のものを用いた。G は、Flow through で検出された未同定の新規ピークを表す。D: Peak G の MALDI-TOF MS 解析結果。E: 凍結乾燥後の GDP-L-Gal の HPLC クロマトグラム。上段のクロマトグラムは、DEAE カラム溶出液を直接凍結乾燥した結果。下段のクロマトグラムは、DEAE カラム溶出液を、10 倍量のイソプロパノールと混合し、ペレットを回収した後、Millipore Q water で溶解後、凍結乾燥した結果。

Table 2.3.7-1　低級アルコールを用いた GDP 糖回収条件の検討

100 µL の 300 mM NH_4HCO_3 に溶解した 10 mM GDP-D-Man を用い、各低級アルコールでの回収率を調査した。回収したペレットを、250 µL の Millipore Q water に溶解し、3 回凍結乾燥した後、50 µL の Millipore Q water に溶解し、HPLC を用いて定量した。

Organic solvent	Concentration of GDP-D-Man (mM)	Yield (%)
Methanol	16.2	81
Ethanol	18.9	95
Isopropanol	19.4	96

Table 2.3.7-2　GDP-L-Gal の精製テーブル

GDP-L-Gal の精製は、72.3 mg の GDP-L-Gal を初発物質として行った。DEAE カラムによる精製後、サンプルを 2 つに分け、片方は直接凍結乾燥した。他方は、イソプロパノールにより沈澱を行った後、凍結乾燥を行った。

Purification step	Total GDP-L-Gal (mg)	Purity (%)	Yield of each step (%)
CIAP treatment	71.1	62.0	98
DEAE purification	70.3	93.3	99
Lyophilization	21.1	61.7	60[a)]
Isopropanol precipitation	34.3	99 以上	98[a)]

[a)] DEAE を用いた精製で得られた GDP-L-Gal の半量、35.2 mg を初発物質量として算出した

2.3.8. 精製 GDP-L-Gal の構造解析

精製し、得られた GDP-L-Gal の構造解析は、MALDI TOF-MS 及び ^{1}H NMR 分析により行った。MALDI TOF-MS による解析では、*m/z* 606.085、*m/z* 623.115 が検出され、それぞれ[GDP-ヘキソース+H]$^{+}$、[GDP-ヘキソース+NH_4]$^{+}$に相当した（Fig. 2.3.8 A）。^{1}H NMR 分析により得られた GDP-L-Gal のケミカルシフト（Fig. 2.3.8 B）は、先行研究により報告された GDP-L-Gal の ^{1}H ケミカルシフト[38, 46]と一致した。以下に計測された ^{1}H ケミカルシフトを示す。

^{1}H-NMR (600 MHz, D_2O), Guanine, δ 8.12 (s, 1 H; H-8) ppm; β-D-ribose, δ 5.95 (d, $J_{1,2}$ 6.1 Hz, 1 H; H-1), 4.77 (dd, $J_{2,3}$ 5.8 Hz, 1 H; H-2), 4.54 (m, 1 H; H-3), 4.37 (t, $J_{4,5}$ 2.6 Hz, 1 H; H-4), 4.23 (t, $J_{5,6}$ 4.9 Hz, 2 H; 2 × H-5) ppm; β-L-Gal, δ 4.97 (t, $J_{1,2}$ 7.8, 1 H; H-1), 3.93 (d, $J_{4,5}$ 3.3 Hz, 1 H; H-4), 3.82-3.73 (m, 3 H, H-5, 2 × H-6), 3.69 (d, $J_{3,4}$ 3.4 Hz, 1 H; H-3), 3.62 (dd, $J_{2,3}$ 10.6, $J_{2,1}$ 7.8 Hz, 1 H; H-2) ppm.

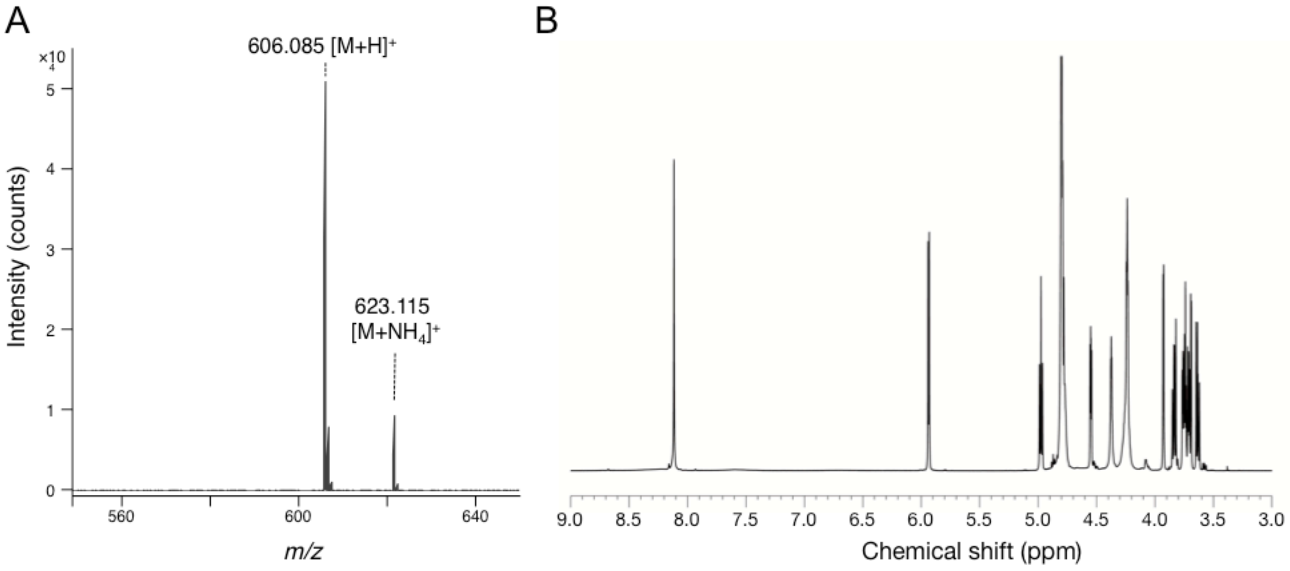

Fig. 2.3.8 精製した GDP-L-Gal の構造解析結果

A: 精製した GDP-L-Gal の MALDI-TOF MS 解析結果。B: 精製した GDP-L-Gal の ^{1}H-NMR スペクトル。ケミカルシフトは、HDO のシグナル (δ_H = 4.80) をリフェレンスとして使用した。

2.4 考察

本章では、GME 及び FKP を用い、GDP-L-Gal の分取スケールでの酵素合成を試みた。今回、植物培養細胞より調製した部分精製酵素、*S. pombe* により生産した 6 × His タグ融合 *At*GME、どちらを用いた酵素反応においても、エピメリ化効率は変化せず、基質として用いた GDP-D-Man に対し、約 15-18% の GDP-L-Gal が生成された。このエピメリ化効率は先行研究で報告された効率と同等だった[37, 38] (Fig. 2.3.3)。*S. pombe* により生産した 6 × His タグ融合 *At*GME の酵素速度論的解析を行ったところ、これらの値は Wolucka *et al.*により報告された、*E. coli* により生産した 6 × His タグ融合 *At*GME の酵素速度論的パラメーター[39]とほぼ同様の性質を示した。さらに、酵素濃度を減少、もしくは上昇させてもエピメリ化効率は変化しなかったことから、GME のエピメリ化反応は基質濃度に依存せず、おおよそ GDP-D-Man:GDP-L-Gal:GDP-L-Gul=75:20:5 で平衡に達すると考えられた（Fig. 2.3.3）。GME の酵素活性は、先行研究で報告されたように、NAD (P)$^+$を補因子として添加すると、エピメリ化効率の改善が期待される[40]が、リサイクル HPLC による分離精製の際、NAD$^+$/NADH の保持時間が、目的物をリサイクルした場合の保持時間とオーバーラップする可能性があったため、本研究では補因子を添加しなかった。その他エピメリ化効率を向上させる方法として、予測されるエピメリ化反応において、中間体として生成される GDP-β-L-4-keto-Gul の C’4 位の電子移動や、ring flip に関与するシステイン残基、アスパラギン酸残基を他のアミノ酸残基に置換することで、平衡を GDP-L-Gal に傾ける方法が考えられる。しかし、Major *et al.* らの先行研究[40]において、候補となるアミノ酸残基を置換したところ、GDP-L-Gul へ平衡が傾くものの、GDP-L-Gal の生成効率は変化しなかった。これらの結果より、GME による GDP-L-Gal の生産効率を大幅に上昇させることは困難だと考えられた。本研究において、糖ヌクレオチドの分離には、疎水性の低い ODS カラムが有用であることがわかった。これは、

ODS カラムの C18 導入率が低くなるほど（COSMOSIL C_{18}-AR II＞COSMOSIL C_{18}-PAQ＞TSKgel ODS-100V）顕著だった。ODS カラム充填剤表面の表面部位と親水性化合物である GDP-糖、移動層のイオンペア剤の相互作用が保持力に関与し、高極性化合物の分離が改善されたと考えられる[124]。mg スケールでの GDP-L-Gal の精製は、オルタナティブリサイクル HPLC を用いて行ったが、精製後の GDP-L-Gal は非常に安定性が悪かった。NMR 解析において、トリエチルアミンに起因するシグナルが検出されたことから、オルタナティブリサイクル HPLC による分取の際用いたトリエチルアミンなどの残存が、GDP-L-Gal の安定性の低下に影響していると考えられる。以上より、GME を利用し GDP-L-Gal を調製する場合、エピメリ化の平衡が基質となる GDP-D-Man 側に偏っている点や、構造が類似した GDP-D-Man、GDP-L-Gal、GDP-L-Gul の分離が簡便にはできないという点が問題点となり、収率の向上が困難だった。

GDP-L-Gal を効率良く調製するため、L-Gal と L-Fuc の構造類似性に着目した。FKP は L-Fuc を基質とし、87-92% という高い効率で GDP-L-Fuc を生成する[33, 115]。また、FKP により、L-Gal は 73% の転換率で生成された報告[115]があるが、FKP の L-Gal に対する酵素学性質や至適反応条件に関する報告はなかった。FKP の L-Gal に対する酵素学的解析を行ったところ、L-Fuc よりも親和性は低いものの、L-Fuc の 70% 程度の活性を示すことがわかった。FKP の L-Gal に対する酵素活性において、pH の影響は大きく、pH 6 未満では FKP はほとんど活性を示さなかった。*A. thaliana* FKP のフコキナーゼ活性とピロホスホリラーゼ活性は、至適 pH が異なっていると報告されている[33]。*A. thaliana* FKP のフコキナーゼ活性は、pH 10.5 付近で活性の最大値を示すが、pH 6 付近では最大値の 15% 以下に活性が低下する。一方、*A. thaliana* FKP のピロホスホリラーゼ活性の至適 pH は pH 6.5-8.0 であり、pH 6.0 付近では最大値の約 80% の酵素活性を保持している。このことから、pH 6.0 未満では、ホスホリラー

ゼ活性が低下したことで、L-Gal-1P の生成速度が低下したため、GDP-L-Gal の生成が検出できなかったと推察される。また、pH 7.5 付近は、フコキナーゼ活性、ピロホスホリラーゼ活性の均衡がとれる条件であり、FKP が L-Gal に対し最も高い活性を示したと考えられる。

GDP-L-Gal の、FKP 酵素溶液からの単離には、アルカリフォスファターゼ処理、DEAE カラムによる分離、有機溶媒による沈澱が有効だった。特に、有機溶媒による沈澱の有無で、凍結乾燥時の GDP-L-Gal の安定性が異なった。有機溶媒による糖ヌクレオチドの濃縮は、エタノールを用いた CMP-*N*-アセチルノイラミン酸の析出が報告されている[125]。本研究においても、イソプロパノールを使用した際、収率 98% で GDP-L-Gal が回収できた。有機溶媒により GDP 糖を濃縮する際、DEAE カラム溶出に用いた NH_4HCO_3 の一部が除去される[122]ため、凍結乾燥時の GDP-L-Gal の安定性が向上したと予測される。精製した GDP-L-Gal は純度 99% 以上（HPLC クロマトグラムより算出）だった。また、FKP 酵素反応から精製までの全体収率は 92%だった（Table 2.3.7-2）。

本研究で構築した GDP-L-Gal 生産系の収率は、GME を用いた酵素学的手法や、化学的手法による GDP-L-Gal 生産と比較し、132-170% の効率を示した。また、酵母菌体内では、FKP による GDP-D-Ara の生産も報告されていること、*B. fragilis* FKP は他の L-Fuc 類縁体への活性も報告されているため[32, 115]、この FKP 生産系を用いることで、新たなフコース類縁体を含む GDP 糖も効率よく生産できる可能性がある。

2.5 結言

本章では、入手が困難な GDP-L -Gal の入手を目的とし、*A. thaliana* GME、*B. fragilis* FKP を利用した、GDP-L-Gal 生産系の構築を試みた。GME を用いた場合、その酵素学的性質から、GDP-L-Gal の生産性は基質の 20% 未満であり、さらに、構造の類似した GDP 糖の分離が必要となる。一方、FKP を用いた場合、酵素反応による生成物は、GDP-L-Gal と ADP であり、3 ステップのみで、酵素反応溶液より、高純度 GDP-L-Gal が単離できる。FKP を用いた GDP-L-Gal 合成は、化学的手法と比較しても効率が高く、さらに、ワンポットで合成が完了する。本手法の利用により、GDP-L-Gal の簡便な GDP-L-Gal 合成が可能となり、L-Gal の転移に関わる酵素のドナー基質が供給できるため、L-Gal を含む糖化合物の生合成に関わる酵素の発見や、新規 L-Gal 転移酵素の探索に貢献できる。加えて、本手法は、L-Gal 以外の L-Fuc 類縁体にも応用可能だと考えられるため、新たな糖ヌクレオチド供給による、新規な糖化合物の合成に利用可能である。

第3章 L-ガラクトース転移活性の検出と機能解析

3.1. 緒論

1.11 で述べたように、*A. thaliana mur1* 変異体では、タンパク質 *N*-結合型糖鎖や植物細胞壁多糖類から L-Fuc 残基が欠失している。しかし、この変異株では、本来 L-Fuc 残基が付加している部位に、L-Fuc の分子アナログである、L-Gal 残基が付加していた。植物細胞に特徴的な、α1,3-L-Fuc 残基、および β1,2-Xyl 残基を有する糖鎖の合成に関わる、*FucTA*、*FucTB*、*XylT* を破壊した *A. thaliana* 変異株（*xylt fucta/fuctb*）では、*mur1* 変異株のような L-Gal 残基付加は検出されておらず、また、L-Gal を転移する *N*-結合型糖鎖生合成酵素は報告がない。さらに、Lewis X 型糖鎖の生合成に関与する α-L-Fuc 転移酵素は GDP-L-Fuc の分子アナログに対する幅広い基質特異性を有している[47, 115, 126]。これらの結果より、糖鎖生合成経路を構成する L-Fuc 転移酵素が GDP-L-Gal を基質とし、L-Gal 含有糖鎖の生合成に関与していると予測した。そこで、本章において、植物型糖鎖の生合成経路における α1,3-L-Fuc 転移酵素である *A. thaliana* 由来 FucTA（*At*FucTA）の L-Gal 転移活性を調査した。加えて、哺乳類型糖鎖生合成における α1,6-L-Fuc 転移酵素、*Mus musculus* 由来 FUT8（*Mm*FUT8）についても、L-Gal 転移活性等の解析を行い、新規 L-Gal 含有糖鎖の作出を試みた。

mur1 変異株、野生株の植物細胞壁多糖類の構造解析により、*mur1* 変異株の植物細胞壁からは、L-Fuc 残基が欠失しており、L-Fuc 残基付加部位の一部に L-Gal 残基が転移されていること、野生株においても、一部の L-Fuc 残基が L-Gal 残基に置換されていることが明らかにされた[106, 108]。しかし、現在まで L-Gal 残基を転移する植物細胞壁生合成の関連酵素は報告がない。そこで本章では、キシログルカン生合成経路における α1,2-L-Fuc 転移酵素、*A. thaliana* FUT1（AtFUT1）に関する L-Gal 転移活性等の解析を行い、*A. thaliana mur1* 変異体や *S. chinensis* で検出された L-Gal 含有キシログルカン生合成に関わる酵素の発見を試みた。

3.2. 実験材料及び方法

3.2.1. 使用した試薬・菌株

本研究では以下の試薬を使用した。

9-フルオレニルメチルオキシカルボニル(Fmoc)標識 asparagine-linked asialo-galacto-bi-antennary (Gal2GN2M3-Asn-Fmoc) 糖鎖は、大塚化学株式会社（Osaka, Japan）より購入した。Gal2GN2M3-Asn-Fmoc 糖鎖を基質とし、β1,4-ガラクトシダーゼ（Sigma）を作用させることで、Fmoc 標識 asparagine-linked asialo-agalacto-bi-antennary (GN2M3-Asn-Fmoc) を調製した。微生物培養用の Yeast extract は、Difco Laboratories (Detroit, MI) より入手した。基質として使用した GDP-D-Man は YAMASA Shoyu (Chiba, Japan)より入手した。使用した特級グレードの試薬は、和光純薬、ナカライテスク（Kyoto, Japan）より入手した。HPLC 分析で使用したアセトニトリルは、関東化学（Tokyo, Japn）より入手した。LC-MS、MALDI-TOF MS で使用した質量分析グレードのトリフルオロ酢酸（TFA）は、和光純薬より入手し、質量分析グレードのアセトニトリルは Thermo Fisher Scientific（Fair Lawn, NJ）より入手した。制限酵素は TOYOBO、TaKaRa、ニッポンジーン（Tokyo, Japan）、NEB（Ipswich, MA）のものを使用した。

Spodoptera frugiperda Sf9 細胞は、10% fetal calf serum（PAA Laboratories GmbH, Pashing, Austratia）を含む Sf-900 III^{TM} Serum-Free Media（Gibco）を用い、23˚C で培養した。*E. coli* は、DH5α [F^-, λ^-, *supE44*, Δ*lacU*169 (φ80*lcZ*Δ M15), *hsdR*17, *recA*1, *endA*1, *gyrA*96, *thi*-1, *relA*1, *phoA*] を用いた。また、*S. pombe* は、ARC039 株 (*h*$^-$ *leu1-32 ura4-C190T*) を用いた。*A. thaliana* 野生株（Col-0 株）は、Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC) から取り寄せた。*A. thaliana* 野生株は、Boyes *et al.* の手法[127]に従い、23˚C、長日条件（16 hr 明条件、8 hr 暗条件）で生育した。

3.2.2. His タグ融合マウス α1,6-L-Fuc 転移酵素（*Mm*FUT8）の発現及び精製

MmFUT8 遺伝子は、マウス RAW 264.7 細胞より調製した cDNA より取得し、バクミドを作成した[128]。2.3×10^7 個の Sf9 細胞に、*MmFUT8* を有するバクミドを導入したバキュロウイルスを感染させ、23˚C、5 days 培養した。3,000 × *g*、 3 min 遠心し、細胞と培養上清を分離し、培養上清を 300 mM NaCl を含む 50 mM Tris-HCl pH 7.5 で透析した。透析後のサンプルを 200 µL の TALON metal affinity resin（TaKaRa）に吸着し、カラムに充填した。組換え *Mm*FUT8 は、Wash buffer（50 mM Tris-HCl pH 7.5、300 mM NaCl）で洗浄した後、500 µL の Elution buffer（50 mM Tris HCl pH 7.5、300 mM NaCl、150 mM imidazole）で溶出した。溶出サンプルは、100 mM NaCl を含む 20 mM リン酸ナトリウムバッファー pH 7.5 で透析した。透析後の精製 *Mm*FUT8 は、終濃度 0.35% (w/v) 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]propanesulfonate (CHAPS)、50% (v/v) グリセロールになるよう、CHAPS、グリセロールを添加した。組換え *Mm*FUT8 は、10 mM リン酸ナトリウムバッファー pH 7.5、50 mM NaCl、0.35% (w/v) CHAPS、50% (v/v)グリセロール中で、-20˚C で保存した。

3.2.3. His タグ融合 *A. thaliana* α1,3-L-Fuc 転移酵素（*At*FucTA）の発現及び精製

A. thaliana α1,3-L-Fuc 転移酵素遺伝子を有するバクミドは、*A. thaliana* Col-0 株より調製した cDNA を元にクローニングし、作成されたもの[128]を用いた。2.3×10^7 個の Sf9 細胞に、*AtFucTA* を有するバクミドを導入したバキュロウイルスを感染させ、23˚C、5 days 培養した。3,000 × *g*、 3 min 遠心し、細胞を回収した。回収した細胞は、細胞破砕バッファー（50 mM Tris-HCl pH 7.0、2 mM $MgCl_2$、1 mM PMSF）で洗浄した後、超音波破砕機（UR-21P, TOMY）を用い、破砕した。その後、細胞破砕液上清を、100,000 × *g*、1 hr 遠心し、ペレットを回収

した。回収したペレットは、溶解バッファー（50 mM Tris-HCl pH 7.0、2 mM $MgCl_2$、1 mM PMSF、300 mM NaCl、0.2% (v/v) Triton X-100）に再懸濁し、氷上で 30 min インキュベートした。溶解後のサンプルを、5,000 × *g*、10 min 遠心した後、上清を 200 μL TALON metal affinity resin にロードした。組換え *At*FucTA は、0.1% (v/v) Triton X-100 を含む Wash buffer で洗浄した後、0.1% (v/v) Triton X-100 を含む Elution buffer で溶出した。溶出後のフラクションは、4 mM $MgCl_2$ を含む 100 mM Tris-HCl pH 7.0 で透析し、終濃度 50% (v/v) になるよう、グリセロールを添加した。組換え *Ar*FucTA は、50 mM Tris-HCl pH 7.0、4 mM $MgCl_2$、50% (v/v)グリセロール中で、-20°C で保存した。

3.2.4. *Mm*FUT8、*At*FucTA の酵素活性測定

バキュロウイルス発現システムを用い生産した His タグ融合 *Mm*FUT8 は、Yanagidani *et al.* の手法[129]を参考に、以下の酵素反応溶液を基本とし、酵素反応を行った。また、His タグ融合 *At*FucTA は、Wilson *et al.*の手法[58]を参考に、以下の酵素反応溶液を基本とし、酵素反応を行った。なお、1 U は、*Mm*FUT8、*At*FucTA が 1 min に 1.0 μmol の L-Fuc を GDP-L-Fuc から GN2M3-Asn-Fmoc へ転移する酵素量と定義した。

*Mm*FUT8 酵素反応溶液	
PBS pH 7.5	10 mM
GN2M3-Asn-Fmoc	0.5 mM
GDP-L-sugar	0.5 mM
*Mm*FUT8	1 mU/mL

*At*FucTA 酵素反応溶液	
MES pH 6.0	50 mM
GN2M3-Asn-Fmoc	0.5 mM
GDP-L-sugar	0.5 mM
$MnCl_2$	5 mM
*At*FucTA	1 mU/mL

3.2.5. *Mm*FUT8、*At*FucTA 酵素反応産物の解析

3.2.5.1. HPLC 解析条件

酵素反応産物は、以下に示す条件で HPLC による解析を行った。

【HPLC 解析条件】 Hitachi LaChrom 2000
Column: COSMOSIL C_{18}-AR II (4.6 × 250 mm, Nacalai)
Solvent: 20 mM 酢酸アンモニウム:アセトニトリル（80:20（v/v））
Flow rate: 0.7 mL/min (isocratic)
Detection: Absorbance 274 nm
Temperature: 30˚C

3.2.5.2. MALDI-TOF MS 分析条件

酵素反応産物は、サンプル中の塩や試薬を除去するため、コットンを用いた Hydrophilic Interaction Chromatography（HILIC）固相抽出法（SPE）により、前処理を行った[130]。以下に HILIC SPE の概要を示す。まず、コットン（化粧用コットンもしくは脱脂綿）約 3 mg を、200μL 用チップに詰め、Solvent A（90% (v/v) アセトニトリル, 0.1% (v/v) TFA）200 μL で洗浄し、Millipore Q water で 3 回洗浄した。終濃度 85%（v/v）以上になるよう、アセトニトリルを加えたサンプルをアプライし、ゆっくりとコットンを通過させた。濾液を再度アプライし、コットンを通過させた後、200 μL Solvent A で 2 回洗浄した。溶出は、100 μL Millipore Q water で行い、50 μL ずつ 2 回に分けて溶出した。溶出後のサンプルは凍結乾燥し、質量分析器 AutofLEX（Bruker Daltonics）を使用した MALDI-TOF MS 解析を行った。マトリクスには、0.1% TFA を含む 70% アセトニトリルに溶解した 20 μg/μL の DHB を用いた。マトリクスと酵素反応産物を 1:3 で混合し MTP384 target plate of polished steel T L（Bruker Daltonics）上にスポットした。MALDI-TOF MS 解析条件は以下の通り。

【MALDI-TOF MS 条件】	AutoFLEX
Calibration standard	: Peptide Standard II mono （Bruker Daltonics）
N_2 laser	
Frequency	: 5.0 Hz
Polarity	: Positive

3.2.5.3. グリコシダーゼ消化

酵素反応により生成した酵素反応産物 10 pmol を 0.5 U/mL の *Elizabethkingia miricola* 由来 α1,6-フコシダーゼ（Sigma）もしくは、*Xanthomonas manihoti* 由来 α1,3/4-フコシダーゼ（Sigma）で処理した。α1,6-フコシダーゼ消化は、20 mM リン酸バッファー pH 5.0 中、37°C で 1 hr 反応を行った後、100˚C、3 min ボイルして失活させた。α1,3/4-フコシダーゼ消化は、30 mM リン酸カリウムバッファーpH 6.0 中、37˚C で 1 hr 反応を行った後、1% (v/v) トリフルオロ酢酸溶液を等量加えて反応を止めた。グリコシダーゼ消化産物は 4.2.5.1.に示す HPLC 解析条件により解析した。

3.2.6. PA 標識キシログルカン断片の調製

PA 標識オリゴキシログルカンは、Xyloglucan from Tamarind seed（Megazyme）を *Trichoderma reesei* ATCC26921 由来セルラーゼ（Sigma）で部分分解し、調製した。まず、Xyloglucan from Tamarind seed (Megazyme) 5 mg を 1 mL 10 mM ギ酸-アンモニウム pH 4.8 に溶解し、終濃度 0.1 U/mL になるよう *T. reesei* セルラーゼを加え、37˚C、1 hr インキュベートした。酵素反応液は、5,000 × *g*、40 min 遠心した後、上清を DEAE Sepharose F.F. A-25 レジン（GE healthcare）200 μL に供し、素通り画分を回収した。回収した素通り画分は、コンセントレーターで濃縮した後、0.3 M NH_3aq で平衡化した HW-40F（1.6 cm × 60 cm: TOSOH）でサイズ排除クロマトグラフィー（2 mL/ min、4 mL/fraction）を行った。オリゴ糖溶出画分は、フェノール硫酸法[131]で決定し、エバポレーターで濃縮した。濃縮後、凍結乾燥した

サンプルは Hase *et al.*の手法[132]を参考に、2-アミノピリジン（PA）で標識した。PA 標識産物は、以下に示す HPLC 分析条件で分析した。

【HPLC 解析条件】 Hitachi LaChrom 2000
Column: Asahipak® NH2P-50 4E（4.6 mm i.d. × 250 mm, Shodex, Kawasaki, Japan）
Solvent A: 2% CH_3COOH/アセトニトリル
Solvent B: 5% CH_3COOH, 3% トリエチルアミン/Millipore Q water
Time: 0 → 5 → 40 → 41 → 50 (min)
Gradient: 20 → 20 → 55 → 20 → 20 (%B)
Flow rate: 0.7 mL/min (isocratic)
Detection: Fluorescence Ex: 310 nm, Em: 380 nm
Temperature: 30˚C

また、分離したピークを分取し、質量分析器 AutofLEX（Bruker Daltonics）を用いた MALDI-TOF MS 解析により *m/z* を決定した。MALDI-TOF MS 解析のマトリクスには、0.1% TFA を含む 70%アセトニトリルに溶解した 20 μg/μL の DHB を用いた。マトリクスと酵素反応産物を 1:1 で混合し、MTP384 target plate of polished steel T L（Bruker Daltonics）上にスポットした。MALDI-TOF MS 解析条件は 3.2.5.2.に示した条件に従った。

3.2.7. 細胞壁生合成に関わる L-Fuc 転移酵素の発現

A. thaliana キシログルカン L-Fuc 転移酵素 *At2g03220*（*AtFUT1*）は、30 days 長日条件で生育した野生型株のロゼッタ葉より、ReliaPrep™ RNA Tissue Miniprep System (Promega) を用いて調製したトータル RNA を、SuperScript IV VILO Master Mix (Invitrogen) を用いて逆転写し、調製した cDNA をテンプレートとし、PCR により増幅した。PCR には、KOD-Plus-Neo (TOYOBO) を用い、AtFUT1-Nde I (5’- GGGCATATGGATCAGAATTCGTACAGGAGAAG -3’、下線部は *Nde* I サイトを示す）、AtFUT1-Apa I (5’ – TTTGGGCCCTACTAGCTTAAGTCCCCAGCTGATA -3’、 下線部は *Apa* I サイトを示す) のプライマーペアで PCR を行った。PCR 後の産物は、pGEM T-easy に TA クローニングし、

pGEM T-easy-AtFUT1NA を作製した。シーケンス解析を行った後、pGEM T-easy-AtFUT1NA を、*Nde* I 及び *Apa* I で制限酵素処理を行い、目的バンドを精製した後、*Nde* I 及び *Apa* I で制限酵素処理した、*S. pombe* 発現用ベクターpREP1-*myc* His に、Ligation high Ver. 2 (TOYOBO) を用いてライゲーションし、pREP1-AtFUT1-MH を作製した。pREP1-AtFUT1-MH を用い、リチウムアセテート法[117]により、*S. pombe* ARC039 株を形質転換した。形質転換体の選抜は、MM-leu (+Thi) 培地 (MM-leu 培地に、終濃度 15 μM のチアミンを添加した培地。MM-leu 培地の組成については、3.2.5.参照。) で行った。得られた形質転換体を、MM-leu (+Thi) 培地 100 mL、120 rpm、30˚C で 36 hr 培養した後、MM-leu 培地 200 mL で洗浄した。洗浄後の菌体を、MM-leu 培地 100 mL に移し、120 rpm、30˚C で 20 hr 培養し、発現誘導を行った。誘導後の菌体を 3,000 × *g*、5 min 遠心し集菌した後、得られた菌体を氷冷した 100 mM HEPES-NaOH pH 7.0 で洗浄した。菌体と等量のガラスビーズを用い、3 mL の菌体破砕バッファー (100 mM HEPES-NaOH pH 7.0, 1 mM PMSF, 2 mM EDTA, プロテアーゼインヒビター EDTA free (Roche)) 中で 7.5 min ボルテックスし、破砕した。破砕溶液を、4˚C、8,000 × *g*, 20 min 遠心し、ガラスビーズ、未破砕細胞、細胞破砕片を除去した。破砕上清は、さらに 10,000 × *g*, 1 hr 遠心し、ミクロソーム画分を回収した。回収したミクロソーム画分は、菌体破砕バッファー300 μL に再度懸濁した後、終濃度 0.1% (v/v) になるよう、Triton X-100 を加え、氷上で 30 min 静置することで、permeabilized enzyme solution を調製した。

3.2.8. キシログル L-Fuc 転移酵素 AtFUT1 の活性測定

C 末端側に、c-*myc* タグ、6 × His タグを融合させ、*S. pombe* で発現させた *At*FUT1 は、Urbanowicz *et al.*の手法[82]を参考に、酵素反応を行った。基本的な酵素反応溶液組成を以下に示す。

AtFUT1 酵素反応溶液	
HEPES-NaOH pH 7.0	75 mM
GDP-L-Fuc/L-Gal	1 mM
XLLG	1 mM
Permeabilized enzyme solution	200 μL/mL

なお、XLLG は市販されているノナサッカリド（東京化成工業、Tokyo、Japan）を用いた。酵素反応は 25˚C、任意の時間行い、100˚C で 3 min ボイルし酵素反応を停止した。酵素反応停止後のサンプルは、15,000 × *g*、10 min 遠心した後、2.5 mL のメタノールで活性化し、Millipore Q water で平衡化した Sep-Pak C18 カートリッジ（360 mg Sorbent per Cartridge、Waters Associates, Milford Mass, USA）に上清をアプライした。その後、1.5 mL の Millipore Q water で洗浄し、素通り画分を回収し、凍結乾燥した。

3.2.9. 酵素反応産物の解析

酵素反応産物は、MALDI-TOF MS もしくは HPLC で解析した。MALDI-TOF MS による解析は、コットンを用いた HILIC SPE[130]により粗精製を行った後、3.2.5.2.にて述べた条件で解析を行った。HPLC による分析は、まず Dowex 50 (H^+ form) により脱塩を行った後、2-アミノピリジンで標識を行った。Dowex 50 (H^+ form) をサンプルが pH 2.0 以下になるまで懸濁した後、5 カラムボリュームの Millipore Q water で洗浄した。素通り画分を凍結乾燥し、Hase et al.の手法[132]を参考に、PA 化試薬 5 μL を用い、PA 標識した。水飽和フェノール/クロロホルム（1:1, v/v）を用い、余剰 PA 化試薬を除去し、HPLC により酵素反応産物を解析した。HPLC 分析条件は、3.2.6.に示した分析条件に従った。

3.2.10.　単糖組成分析

単糖組成分析は、Ohashi *et al.*の手法[133]を参考に行った。分取した酵素反応により生成されたピークを、100 μL 4 M HCl で酸加水分解した。酸加水分解を 100˚C、3 hr 行い、凍結乾燥した後、100 μL の Millipore Q water、30 pmol の D-リボースを内標準として加え、再度凍結乾燥した。凍結乾燥を 2 回繰り返した後、40 μL のピリジン/メタノール（1:9, v/v）、10 μL の無水酢酸を用い、室温 30 min インキュベートすることで、*N*-アセチル化を行った。*N*-アセチル化後のサンプルは、凍結乾燥し、Hase et al.の手法[132]を参考に、PA 化試薬 7μL を用い、PA 標識した。PA 標識したサンプルは、以下の条件で HPLC 分析を行い、各単糖-PA のピーク面積と比較することで、構成糖の比率を算出した。

【HPLC 解析条件】　Hitachi LaChrom 2000
Column:　TOSOH Sugar AXI (4.6 × 150 mm, TOSOH)
Solvent:　アセトニトリル:0.5 M H_3BO_3-KOH pH 9.0 (1:9, v/v)
Flow rate:　0.4 mL/min (isocratic)
Detection:　Fluorescence Ex: 310 nm, Em: 380 nm
Temperature:　65˚C

3.3. 実験結果

3.3.1. *N*-結合型糖鎖生合成に関わる L-Fuc 転移酵素の L-Gal 転移活性測定

gp67 バキュロウイルス分泌シグナル下流に融合した *Mm*FUT8 は、6 × His タグ融合タンパク質として培地中に分泌される。発現した *Mm*FUT8 は、Ni-IMAC カラムで精製した（Fig. 3.3.1 A）。GN2M3-Asn-Fmoc を基質とし、精製した C 末端 His タグ融合 MmFUT8 の L-Fuc 及び L-Gal 転移活性を測定した。HPLC で酵素反応産物を解析したところ、GDP-L-Fuc をドナー基質として使用した酵素反応溶液では、保持時間 12.5 min に新規ピーク、peak a が検出された。また、GDP-L-Gal をドナー基質として使用した酵素反応溶液では、保持時間 12.4 min に新規ピーク、peak b が検出された。なお、アクセプター基質として使用した GN2M3-Asn-Fmoc は、保持時間 13.5 min に溶出した（Fig. 3.3.1 B）。各酵素反応産物の生成速度を基に、*Mm*FUT8 の GDP-L-Fuc、GDP-L-Gal に対する反応初速度を求めたところ、それぞれ 1.4 mM/sec、0.64 mM/sec だった（Fig. 3.3.1 C）。

*At*FucTA は、C 末端 6 × His タグ融合膜タンパク質としてバキュロウイルス発現系を用いて発現させ、精製した（Fig. 3.3.1 D）。GDP-L-Fuc、GDP-L-Gal をアクセプター基質として用い、GN2M3-Asn-Fmoc に対する糖転移活性測定を行った。酵素反応後のサンプルを HPLC で解析したところ、それぞれの酵素反応溶液において、保持時間 11.9 min の新規ピーク peak c、保持時間 11.7 min の新規ピーク peak d が検出された。なお、アクセプター基質として使用した GN2M3-Asn-Fmoc は、保持時間 12.7 min に溶出した（Fig. 3.3.1 E）。各酵素反応産物の生成速度を基に、*At*FucTA の GDP-L-Fuc、GDP-L-Gal に対する反応初速度を求めたところ、それぞれ、0.86 mM/sec、0.26 mM/sec だった（Fig. 3.3.1 F）。

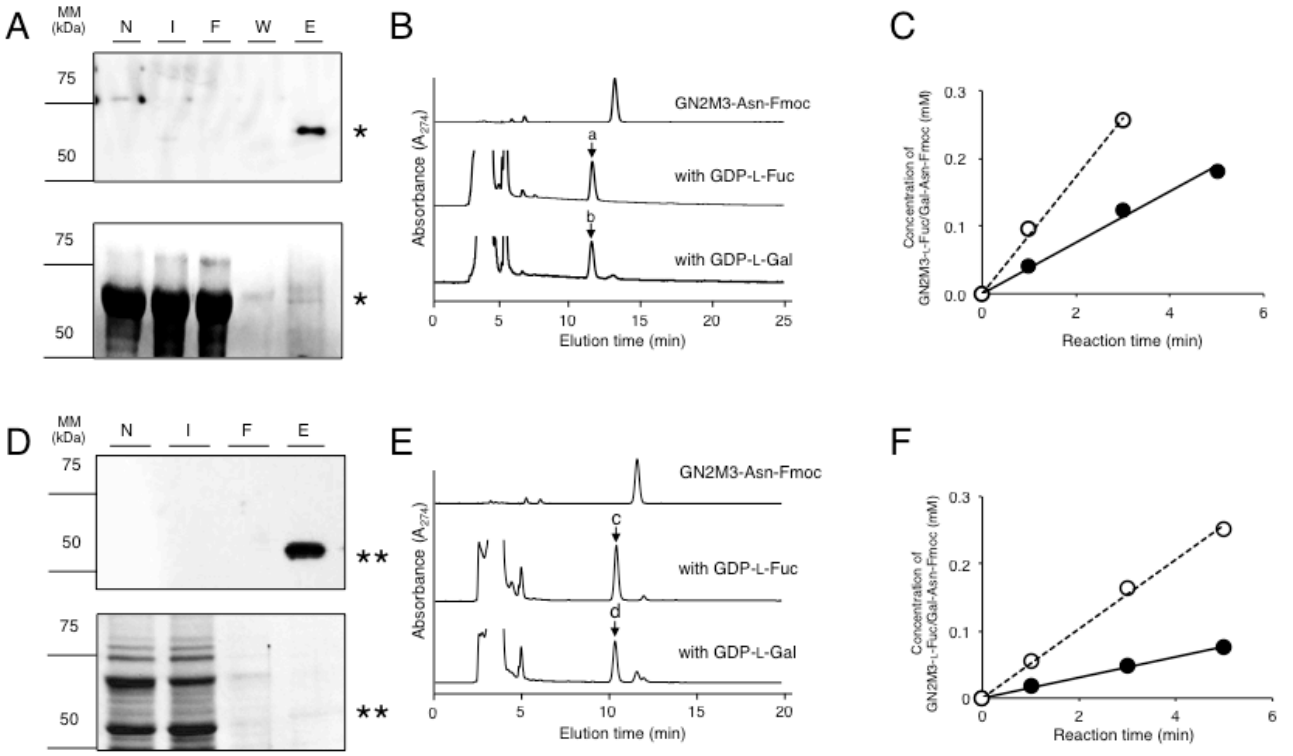

Fig. 3.3.1 *Mm*FUT8 及び *At*FucTA の GN2M3-Asn-Fmoc に対する L-Gal 転移活性

A、D: CBB 染色（下段）、ウエスタンブロッティング（上段）による *Mm*FUT8（A）、*At*FucTA（D）の発現、精製の確認。*、*Mm*Fut8 の予測分子量（64 kDa）; **、 *At*FucTA の予測分子量（55 kDa）; N、ネガティブコントロール（バキュロウイルス未感染細胞）; I、バキュロウイルス感染細胞; F、TALON レジンの素通り画分; W、洗浄画分; E、溶出画分。B、E: *Mm*FUT8（B）、*At*FucTA（E）の酵素活性測定結果。B: *Mm*FUT8、11 μg/mL を用い、37˚C、18 hr 酵素反応を行ったサンプルを、HPLC で解析した結果。Peak a、b はそれぞれ、GDP-L-Fuc および GDP-L-Gal をドナー基質とし、酵素反応を行った場合の予測反応生成物を示す。E: *At*FucTA、14 μg/mL、0.2% (v/v) Triton X-100 を含む酵素反応溶液[113]を用い、37˚C、12 hr 酵素反応を行ったサンプルを、HPLC で解析した結果。Peak c、d はそれぞれ、GDP-L-Fuc および GDP-L-Gal をドナー基質とし、酵素反応を行った場合の予測反応生成物を示す。C、F: *Mm*FUT8（C）、*At*FucTA（F）の GDP-L-Fuc（○）もしくは GDP-L-Gal（●）を基質とした場合の、反応初速度の比較。X 軸は反応時間、Y 軸は、GN2M3-And-Fmoc より算出した GN2M3-L-Fuc/Gal-Asn-Fmoc の濃度を示す。

3.3.2. *Mm*FUT8、*At*FucTA 生成産物の解析

*Mm*FUT8 酵素反応産物を MALDI TOF-MS 解析したところ、GDP-L-Fuc をドナー基質として使用した酵素反応溶液では、*m/z* 1822.459、GDP-L-Gal をドナー基質として使用した酵素反応溶液では、*m/z* 1838.376 が検出され、それぞれ[GN2M3-Asn-Fmoc + デオキシヘキソース + H]$^+$、[GN2M3-Asn-Fmoc + ヘキソース + H]$^+$に相当する *m/z* が検出された（Fig. 3.3.2 A）。また、*At*FucTA 酵素反応産物を MALDI TOF-MS 解析した場合も、GDP-L-Fuc をドナー基質として使用した酵素反応溶液では、*m/z* 1822.459、GDP-L-Gal をドナー基質として使用した酵素反応溶液では、*m/z* 1838.376 が検出され、それぞれ[GN2M3-Asn-Fmoc + デオキシヘキソース + H]$^+$、 [GN2M3-Asn-Fmoc + ヘキソース + H]$^+$に相当する *m/z* が検出された（Fig. 3.3.2 B）。分取した peak a、peak b を α1,6-フコシダーゼで処理したところ、peak a はフコシダーゼ消化されたが、peak b は消化されなかった（Fig 3.3.2 C）。この結果は、peak a が *N*-結合型糖鎖を構成するキトビオースに α1,6-L-Fuc が転移した構造を含有することを示している[54]。また、分取した peak c、d を、α1,3/4-フコシダーゼもしくは α1,6-フコシダーゼで処理した。Peak c は、α1,3/4-フコシダーゼで消化されたが、α1,6-フコシダーゼでは消化されなかった（Fig 3.3.2 D）。この結果は、Wilson *et al.*、Staudache*r et al.*らの結果[58, 113]と一致すること、使用した α1,3/4-フコシダーゼの基質特異性[134]から、peak c は *N*-結合型糖鎖を構成するキトビオースに α1,3-L-Fuc が付加した構造を含有すると考えられる。一方、peak d は、α1,3/4-、α1,6-フコシダーゼ、共に消化されなかった（Fig. 3.3.2 D）。

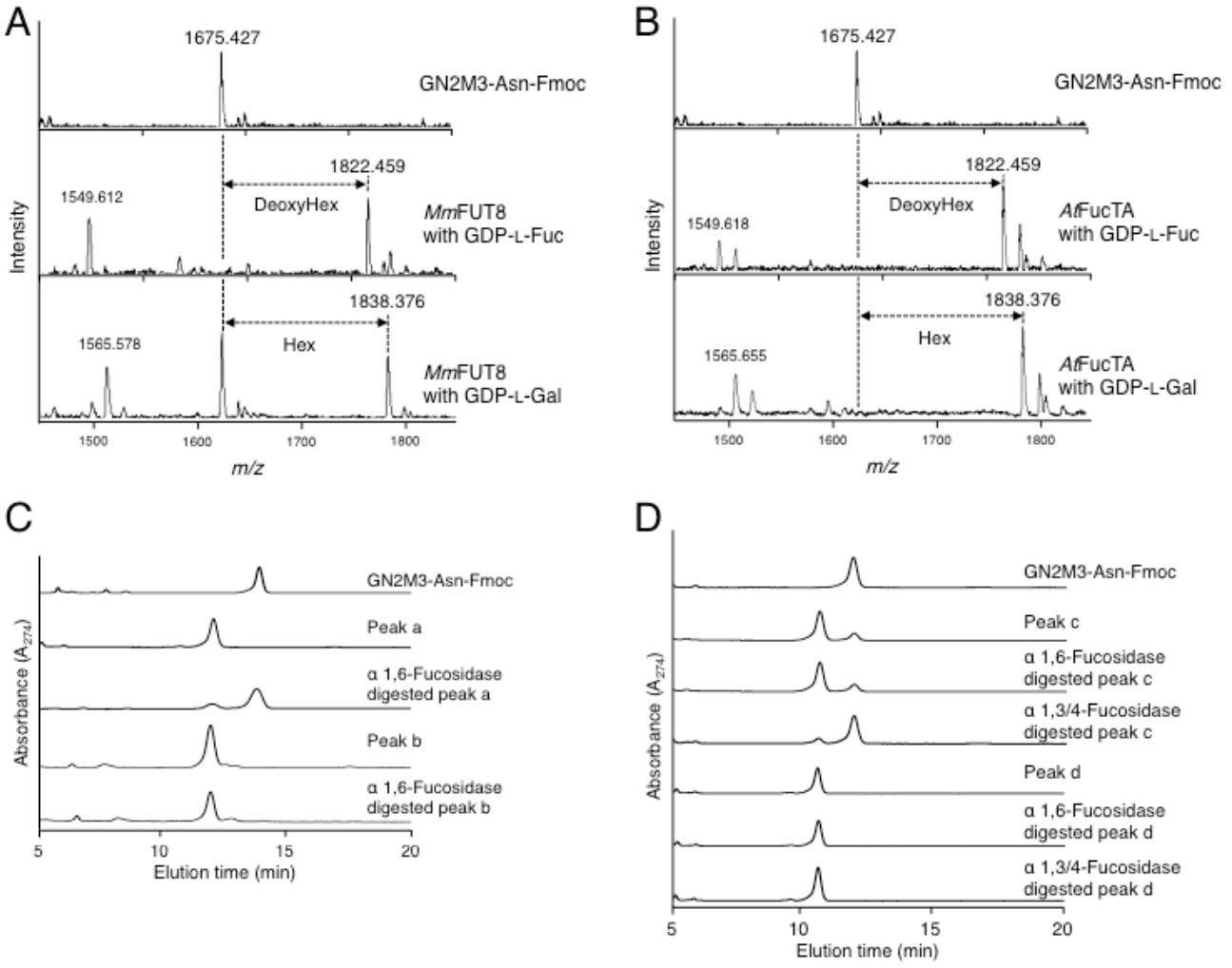

Fig. 3.3.2 *Mm*FUT8、*At*FucTA 転移酵素生成産物の解析

A、B: *Mm*FUT8（A）、*At*FucTA（B）酵素反応産物の MALDI-TOF MS 解析結果。*m/z* 1675.4 は基質として用いた GN2M3-Asn-Fmoc 由来のシグナル。*m/z* 1549.612、1565.578、1549.618、1565.655 は、レーザー照射により酵素反応産物より Fmoc 基が遊離した糖鎖に由来するシグナル。C: Peak a、b の α1,6-フコシダーゼ消化産物の HPLC 解析結果。D: Peak c、d の α1,6-、α1,3/4-フコシダーゼ消化産物の HPLC 解析結果。

3.3.3. L-Fuc 転移酵素の GDP-L-Gal に対する酵素学的パラメーターの算出

*Mm*FUT8 及び *At*FucTA の、GDP-L-Fuc 及び GDP-L-Gal に対する見かけ上の K_m 値は、5 μM-2 mM のドナー基質と、0.5 mM の GN2M3-Asn-Fmoc、1 U/L の酵素を用い、反応時間 3 min で 37°C にて計測した。酵素学的パラメーターは、Lineweaver-Burk プロットにより算出した。*Mm*FUT8 の GDP-L-Fuc 及び GDP-L-Gal に対する K_m 値は、それぞれ 0.117 mM 及び 0.229 mM だった。また、*At*FucTA の GDP-L-Fuc 及び GDP-L-Gal に対する K_m 値は、それぞれ 0.193 mM

及び 0.838 mM だった。これらの K_m 値より、*Mm*FUT8、*At*FucTA は、GDP-L-Gal よりも GDP-L-Fuc に高い親和性を示すことがわかった。

3.3.4. 2-アミノピリジン標識植物細胞壁多糖類の調製

*At*FUT1 は、Cicéron *et al.*の先行研究[79]により、キシログルカンオリゴ糖の最小単位である、XLLG に対する活性よりも、XLLGXLLG や更に長鎖のキシログルカンオリゴ糖への糖転移活性が高いことが示唆されている。長鎖キシログルカンオリゴ糖を入手し、AtFUT1 の候補基質として利用するため、Xyloglucan from Tamarind seed を *T. reesei* ATCC26921 由来セルラーゼで部分分解し、得られたキシログルカンオリゴ糖断片を PA 標識した。PA 標識したキシログルカンオリゴ糖を HPLC で分析したところ、Fig. 3.3.4 A に示すクロマトグラムが得られた。Peak F、J を分取し、MALDI-TOF MS で解析したところ、Peak F: *m/z* 1304.5（[XXLG-PA/XLXG-PA + H]$^+$に相当） 、Peak J: *m/z* 2837.8（[XLLGXLLG-PA + H]$^+$に相当）が検出された。さらに、分取した Peak J を *T. reesei* セルラーゼで処理し、各ピークに含有される構造の推定を行った（Fig3.3.4 B）。Peak J の *T. reesei* セルラーゼ分解物は、市販品として入手できる XLLG を PA 標識した、XLLG-PA の溶出時間と一致するピークが検出された（Fig3.3.4 C）。これらの結果より、Peak F: XXLG-PA もしくは XLXG-PA、Peak J: XLLGXLLG-PA と推測された。なお、Peak G は、XLLG-PA の HPLC での溶出位置と一致することから、XLLG-PA と推測される。また、Peak E は HPLC の溶出時間より、XXXG-PA と推測される。一方、Peak H、Peak I は構造推測に至っていない。

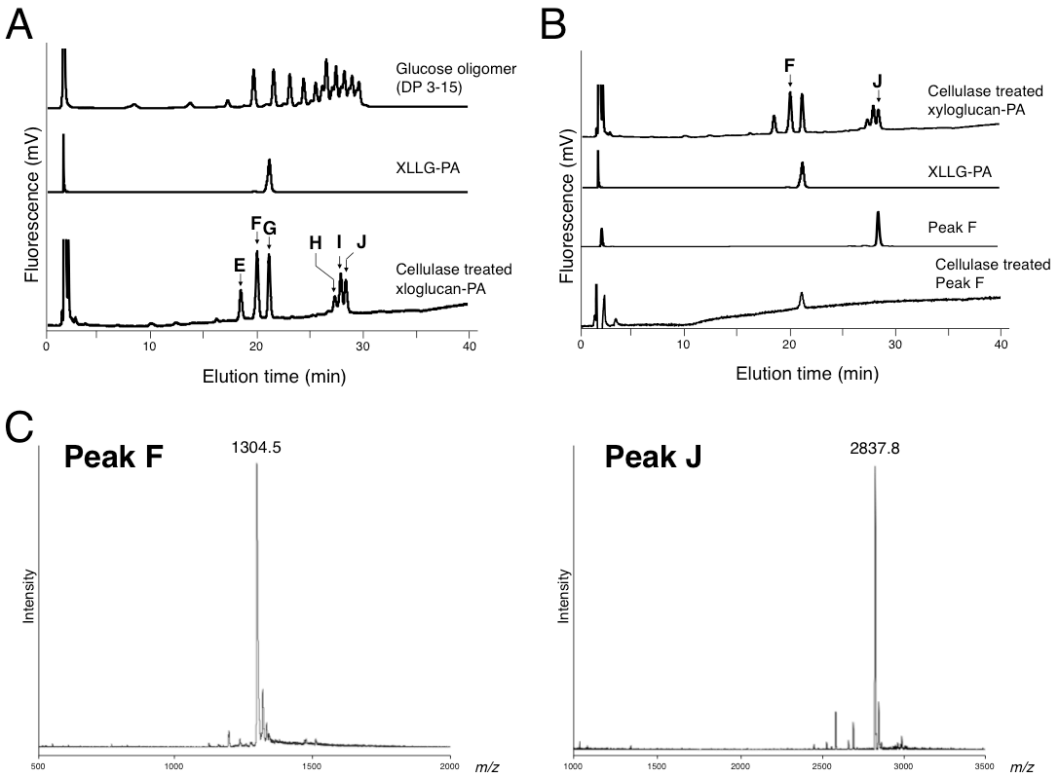

Fig. 3.3.4 PA 標識キシログルカン部分分解産物の解析

A: *T. reseii* セルラーゼで部分分解した Xyloglucan tamarind seed を PA 標識し、HPLC で分析した結果。XLLG-PA は、市販 XLLG を PA 標識したもの。Peak E-J は、分取したピークを示す。B: Peak J の *T. reseii* セルラーゼによる完全分解産物の解析。5 pmol に相当する Peak F をセルラーゼで分解し、HPLC で分析した。C: Peak F、Peak J の MALDI−TOF MS 解析。分取したピークは、5 回凍結乾燥を繰り返すことで脱塩し、10 pmol 相当量を MALDI-TOF MS で解析した。

3.3.5. キシログルカンオリゴ糖に対する L-Gal 転移活性の検出

nmt1 プロモーター下流に *AtFUT1* 遺伝子を挿入した pREP1-AtFUT1-MH ベクター（Fig. 3.3.5 A）を形質導入した *S. pombe* を用い、C 末端 *c*-myc タグ、6 × His タグ融合タンパク質として AtFUT1 を発現させた（Fig. 3.3.5 B）。培養菌体より調製した、permeabilized enzyme solution を用い、XLLG に対する AtFUT1 の活性測定を行った（Fig. 3.3.5 C）。酵素反応後、PA 標識を行い、HPLC により活性測定をしたところ、GDP-L-Fuc をドナー基質として用いたところ、溶出時間 22.1 min に Peak K が、GDP-L-Gal をドナー基質として用いたところ、溶出時間 22.6 min に Peak L が検出された。

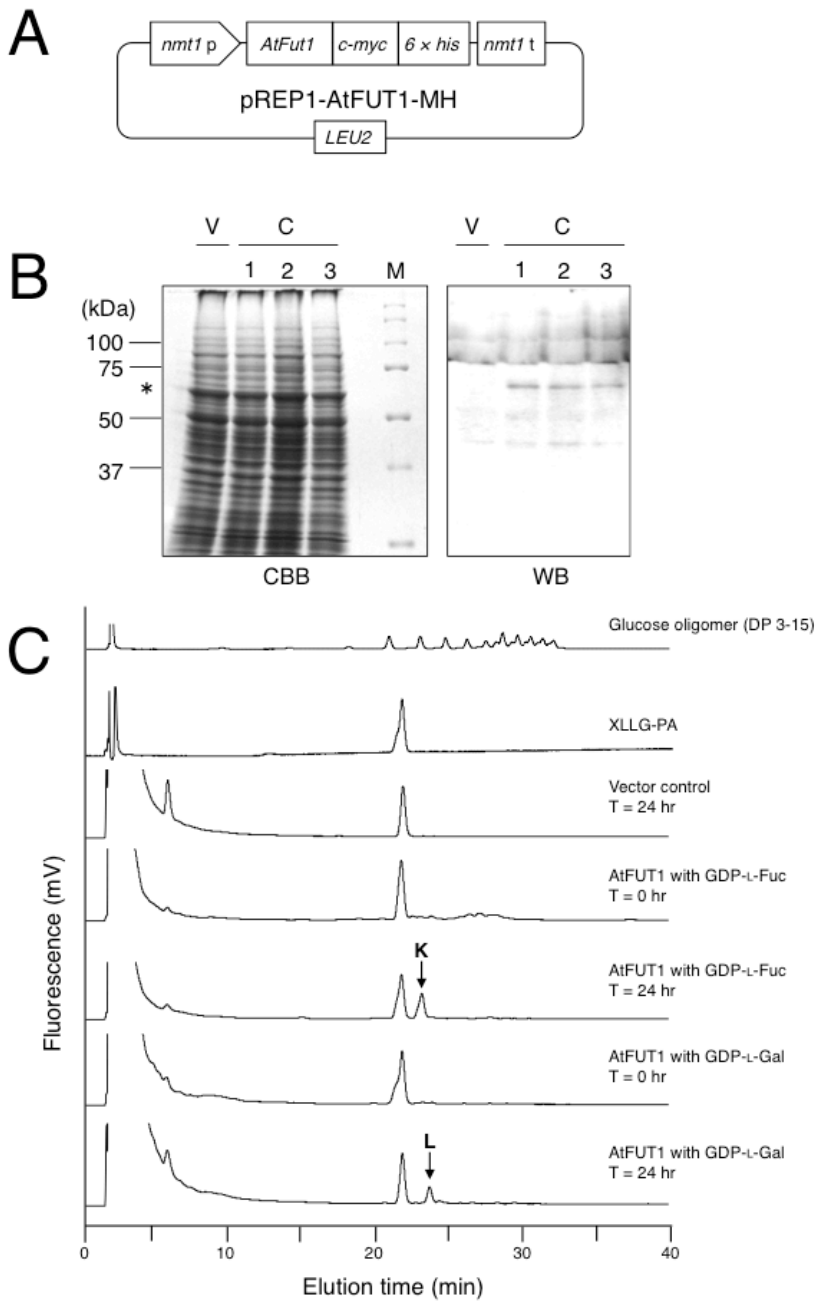

Fig. 3.3.5 AtFUT1 の酵素活性

A: *S. pombe* の形質転換に用いた発現ベクター、pREP1-AtFUT1-MH。*nmt1* プロモーター下流に、*AtFUT1* 遺伝子配列を挿入した。AtFUT1 は、C 末端側に *c-myc* タグ、6 × His タグが付加される。*LEU2*、ロイシン要求性マーカー遺伝子; *nmt1* p、nmt1 プロモーター配列; *nmt1* t、nmt1 ターミネーター配列。B: pREP1-AtFUT1-MH を形質導入した *S. pombe* 培養菌体の CBB 染色およびウエスタンブロッティング解析結果。ウエスタンブロッティングには、一次抗体として、Anti-His tag antibody (9C11, TaKaRa) を、二次抗体として、HRP-conjugated Anti-mouse IgG (Promega) を用いた。＊は AtFUT1 の予測分子量 69.4 kDa を示す。C: AtFUT1 活性測定の結果。Peak G、Peak H は酵素反応産物と予測されるピークを示す。

3.3.6. AtFUT1 により生成されたキシログルカンオリゴ糖の構造解析

MALDI-TOF MS 解析、単糖組成分析により、酵素反応産物生成の構造の推定を行った。酵素反応溶液を HILIC SPE により脱塩し、MALDI-TOF MS で解析したところ、GDP-L-Fuc をドナー基質として用いた場合、*m/z* 1410.2、*m/z* 1555.5 が検出された。GDP-L-Gal をドナー基質として用いた場合、*m/z* 1410.2、*m/z* 1571.5 が検出された (Fig. 3.3.6 A)。*m/z* 1410.2 は、$[XLLG + Na]^+$に相当する *m/z* である。*m/z* 1555.5 は$[XLLG +$ デオキシヘキソース $+ Na]^+$、*m/z* 1571.5 は$[XLLG +$ ヘキソース $+ Na]^+$に相当する *m/z* である。酵素反応産物を構成する糖を同定するため、Fig. 3.3.5 C で検出された Peak K 及び Peak L を分取し、単糖組成分析を行った (Fig. 3.3.6 B)。得られたクロマトグラムから、検出された糖の構成モル比を算出した。Peak G の構成糖は、Xyl、Glc、L-Fuc、Gal だった。それらの構成モル比は、Xyl:Glc:L-Fuc:Gal = 3:4:1:2 だった。また、Peak K の構成糖は、Xyl、Glc、Gal であり、それらの構成モル比は、Xyl:Glc: Gal = 3:4:1:3 だった。これらの結果より、Peak L は XLFG-PA もしくは、XFLG-PA、Peak H は XLJG-PA もしくは XJLG-PA と予測された。

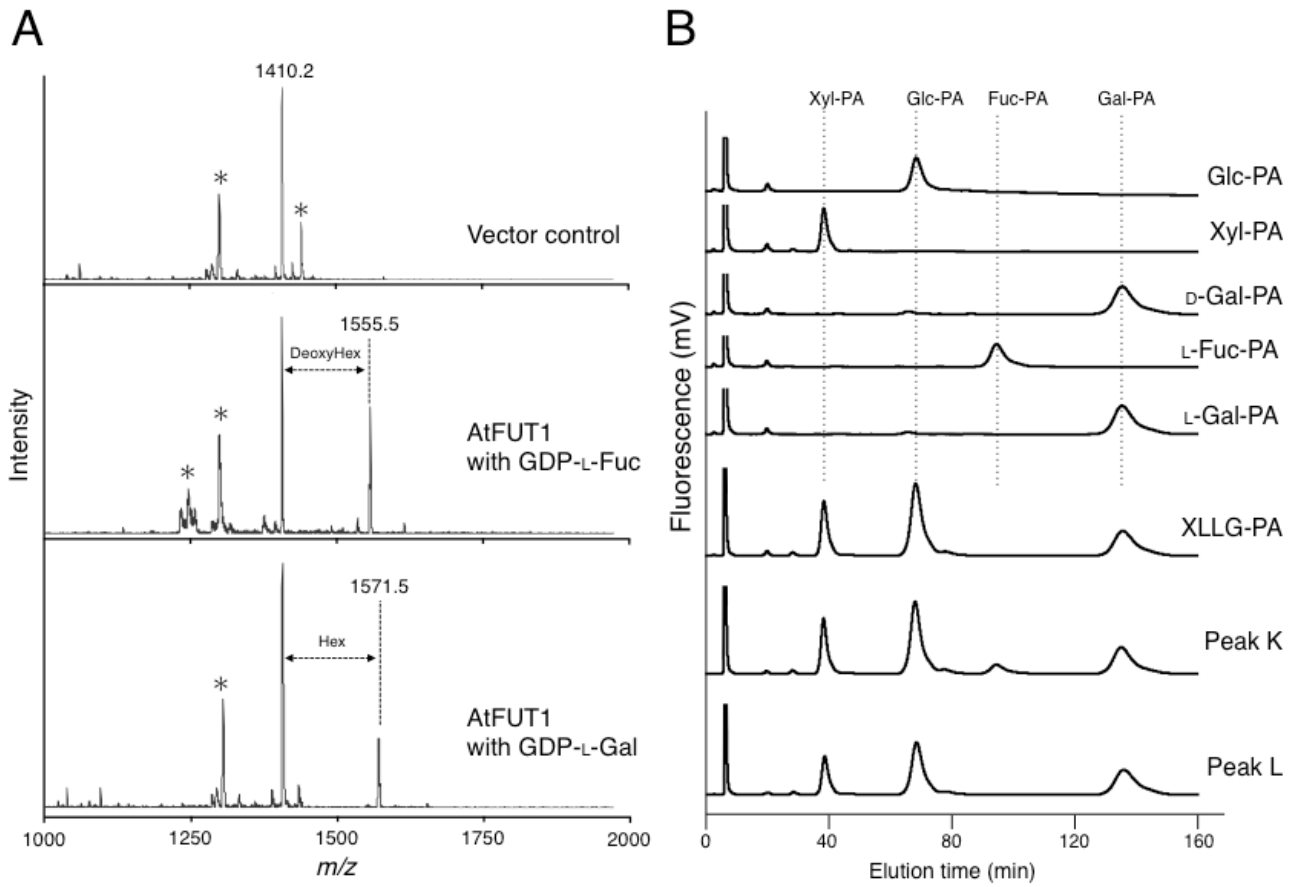

Fig. 3.3.6 AtFUT1 酵素反応産物の解析

A: AtFUT1 の酵素反応溶液を MALDI-TOF MS で解析した結果。*m/z* 1410.2 は、$[XLLG + Na]^+$に相当する。＊は酵素反応溶液由来と推測される未同定シグナル。B: 単糖組成分析結果。XLLG-PA は、XLLG を PA 標識した後､3 pmol 相当の XLLG-PA を用い､単糖組成分析用サンプルの調製を行った。Peak K および Peak L は、Fig3.3.5 C で分取し凍結乾燥したサンプルを、2.5 pmol 相当使用し、単糖組成分析用サンプルの調製を行った。HPLC での分析には、0.5 pmol 相当のサンプルを使用した。

3.3.7. AtFUT1 の酵素学的解析

AtFUT1 の、GDP-L-Gal を基質として用いた場合の反応初速度、2 価カチオンの影響、pH の影響、温度の影響、基質特異性を解析した。GDP-L-Fuc、GDP-L-Gal をドナー基質、XLLG をアクセプター基質として用いた場合の AtFUT1 酵素反応産物の生成速度を測定した。3.2.8 で述べた酵素反応条件において、GDP-L-Fuc を基質として酵素反応を行った場合、AtFUT1 は XLFG/XFLG-PA を 20.7 μM/hr で生成した。一方、GDP-L-Gal を基質として酵素反応を行った場合、AtFUT1 は XLJG/XJLG-PA を 6.7 μM/hr で生成した（Fig. 3.3.7-1 A)。

酵素反応溶液に、終濃度 2 mM、5 mM、10 mM の EDTA、$MgCl_2$、$CaCl_2$、$MnCl_2$、$ZnSO_4$を添加し、酵素反応への影響を調査した。EDTA 添加の有無で酵素活性は変化しなかった。また、Mg^{2+}、Ca^{2+}を 5 mM 以上添加すると、8-13% 酵素活性が向上した。一方、Mn^{2+}を添加した場合、Mn^{2+}濃度の上昇に伴い、酵素活性が強く阻害された。10 mM の Mn^{2+}を添加した場合、3.2.8 で述べた酵素反応条件で反応を行った場合と比較し、酵素活性は 16% まで低下した（Fig. 3.3.7-1 B）。

pH の影響は、pH 5.5 から pH 9.0 まで pH 0.5 刻みで測定した。pH 5.5-7.0、MES-NaOH; pH 7.0-8.5、HEPES-NaOH; pH 8.0-9.0 Bicine-NaOH、を用いた。GDP-L-Gal を基質として用いた場合、AtFUT1 の至適 pH は、pH7-7.5 だった（Fig. 3.3.7-1 C）。また、15-40 ˚C における酵素活性を 5˚C 刻みで測定した。GDP-L-Gal を基質として用いた場合、AtFUT1 は反応温度 20-25˚C で最大の酵素反応を示した。一方、40˚C では酵素反応産物が検出できなかった（Fig. 3.3.7-2 D）。基質特異性は、XLLG、XXLG-PA/XLXG-PA、XLLG-PA，XLLGXLLG-PA に対して調査した。XXLG-PA/XLXG-PA、XLLGXLLG-PA として、3.3.4 で分取した Peak F、Peak J をそれぞれ用いた。AtFUT1 は、XLLG、XLLGXLLG-PA に対して酵素活性を示したが、XXLG-PA/XLXG-PA，XLLG-PA に対しては、酵素活性を示さなかった（Fig. 3.3.7-2 A、B）また、XLLGXLLG-PA に対する AtFUT1 の反応初速度は 49.9 μM/hr であり、XLLG に対する反応初速度の 7 倍だった（Fig. 3.3.7-2 C）。なお、Peak M を MALDI-TOF MS で解析したところ、[(XLLGXLLG-PA+ヘキソース) + H]$^+$、[(XLLGXLLG-PA+ヘキソース) + Na]$^+$、[(XLLGXLLG-PA+ヘキソース) + 2Na - H]$^+$に相当する、*m/z* 2999.3、*m/z* 3021.3、*m/z* 3043.3 が検出された（Fig. 3.3.7-2 D）。以上の結果より、AtFUT1 により XLJGXLLG-PA または XJLGXLLG-PA が生成されたと推測される。

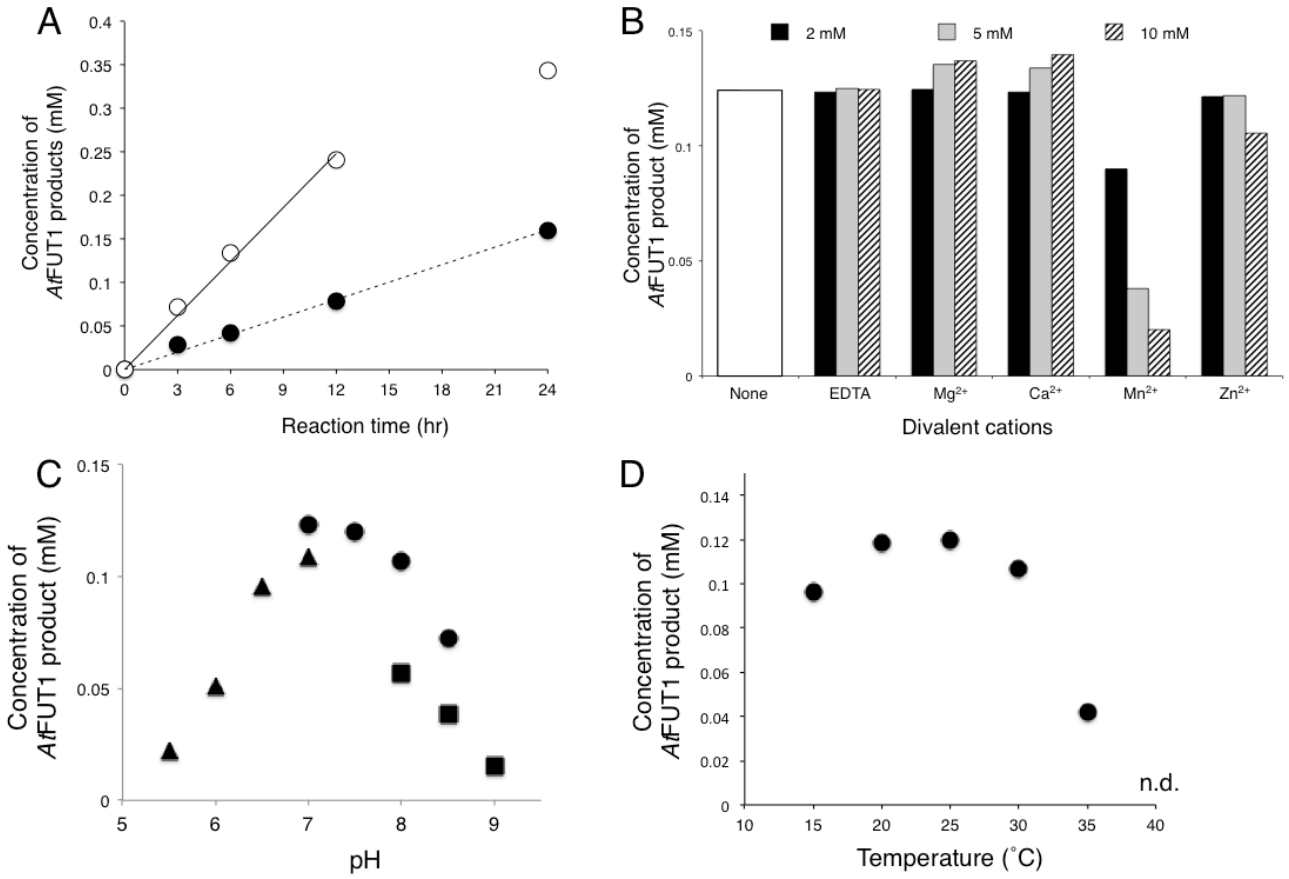

Fig. 3.3.7-1 AtFUT1 の GDP-L-Gal に対する酵素学的性質

A: GDP-L-Fuc（○）および GDP-L-Gal（●）を基質とした場合の、*At*FUT1 の反応初速度。実線は GDP-L-Fuc を基質とした場合の反応物生成速度を示す。破線は GDP-L-Gal を基質とした場合の反応物生成速度を示す。B: 2 価カチオンとその濃度の影響。酵素反応は、12 hr、25˚C で行った。C: pH の影響。酵素反応は 75 mM MES-NaOH（▲）、75 mM HEPES-NaOH（●）、75 mM Bicine-NaOH（■）を用い、12 hr、25˚C で行った。D: 温度の影響。75 mM HEPES-NaOH pH 7.0、23 hr 反応を行った。40˚C では、反応生成物が検出できなかった。

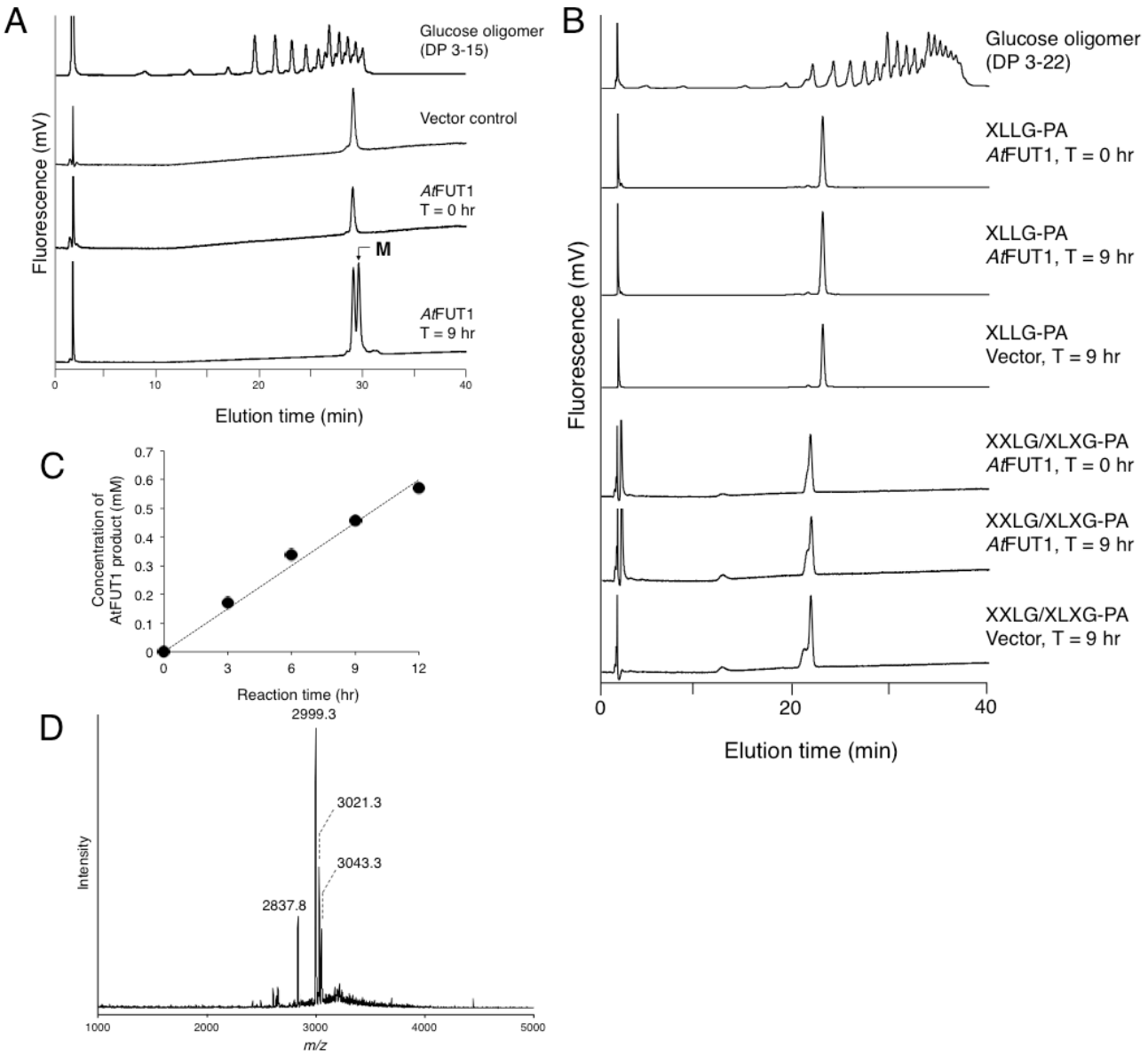

Fig. 3.3.7-2 AtFUT1 の基質特異性

GDP-L-Gal をドナー基質として用いた場合の AtFUT1 の基質特異性を調査した。A、B: XLLGXLLG-PA（A）、XLLG-PA 及び XXLG/XLXG-PA（B）に対する AtFUT1 の酵素活性。M は反応生成物ピークを示す。ベクターコントロールには、pREP1-*myc* His 空ベクターを形質導入した *S. pombe* より調製した酵素を用いた。C: XLLGXLLG-PA を基質とし、酵素反応を行った場合の反応物（Peak M）生成速度。D: Peak M の MALDI TOFMS 解析結果。

3.4. 考察

GDP-L-Gal をドナー基質に用いた *Mm*FUT8、*At*FucTA 酵素反応産物を、MALDI-TOF MS 解析により解析したところ、*N*-結合型糖鎖上への L-Gal の転移が検出された。しかし、本章で使用した α-フコシダーゼでは、転移された L-Gal 残基は遊離されなかった。L-Fuc と結合した海洋性超高熱耐性細菌 *Thermotoga maritima* や、プロバイオティクス細菌 *Bifidobacterium bifidum* 由来 α-フコシダーゼの結晶構造において、L-Fuc の C-6 位メチル基は、認識部位の疎水性部位に強固に固定されており、L-Gal 残基のように C-6 位に水酸基の付加した基質との結合スペースがない[135, 136]。本章で使用した α-フコシダーゼはどちらも結晶構造が明らかになっていないが、C-6 位の基質認識が原因となり、*N*-結合型糖鎖上に転移された L-Gal 残基が α-フコシダーゼで遊離されなかったと考えられる。*Mm*FUT8、*At*FucTA の α-L-Fuc 転移産物[113, 129]から類推すると、*Mm*FUT8 は α1,6-L-Gal 残基を、*At*FucTA は α1,3-L-Gal 残基を *N*-結合型糖鎖を構成するキトビオース構造の Asn 残基近傍の GlcNAc に転移したと考えられる。しかし、より正確に構造決定するためには、NMR 解析やメチル化分析などを行い、結合様式の解析を行うことが必要である。

Lewis X 型糖鎖への L-Fuc 分子アナログの転移を α-L-Fuc 転移酵素が行うように、*Mm*FUT8、*At*FucTA は L-Fuc 含有糖鎖のアナログを生成した。しかし、GN2M3-Asn-Fmoc への L-Gal 転移活性は、*Mm*FUT8、*At*FucTA で、それぞれ L-Fuc 転移活性の 44%、30% だった。ヒト由来 FUT8 の結晶構造は解明されている[137]が、植物の α1,3-L-Fuc 転移酵素の結晶構造の報告はない。また、基質認識部位、つまり L-Fuc の C-6 メチル基周辺で基質認識に関わっているアミノ酸はヒト由来 FUT8 においても正確な情報がない。より効率的な L-Gal 含有糖鎖の生成には、L-Fuc、L-Gal と結合した酵素の結晶構造解析データを基に、α-L-Fuc 転移酵素の基質認識部位の改変が必要だろう。

本章ではさらに、キシログルカン生合成に関わるα1,2-L-Fuc転移酵素がキログルカンオリゴ糖へのL-Gal転移活性を有することを証明した。GDP-L-Galをドナー基質に用いたAtFUT1酵素反応産物を、MALDI-TOF MS解析及び、単糖組成分析により解析したところ、キシログルカンオリゴ糖鎖XLLG上へのGal残基の転移が検出された（Fig. 3.3.5 C、Fig 3.3.6）。前述の*Mm*FUT1や*At*FucTA、Lewis X生合成に関わるα-L-Fuc転移酵素の基質特異性から推測すると、この酵素反応産物で転移されたGal残基はL体だと考えられる。酵素反応産物の構造決定にはさらに、Farkas *et al.*により報告された*Pisum sativum*、*Topaeolum majus*由来キシログルカンフコシダーゼ活性[138]や、Ishimizu *et al.*により同定されたユリの花（*Lilium longiflorum* Thumb. cv. Hinomoto）由来EBM IIが有するキシログルカンα1,2-フコシダーゼ活性などを用いた酵素反応産物のフコシダーゼ消化が必要である。加えて、酵素反応産物のメチル化分析や、NMR解析を行うことで、より詳細に構造決定ができる。

AtFUT1の、GDP-L-Galをドナー基質とし、XLLG上へL-Galを転移する速度は、GDP-L-Fucをドナー基質とし、XLLG上へL-Fucを転移する速度の32% だった（Fig. 3.3.7-1 A）。*mur1*変異体でにおける、キシログルカンのL-Fuc残基付加部位でのL-Gal残基への置換は約34%起こっている[106]ことから、前述のXLLGに対する反応初速度の違い（Fig. 3.3.7-1 A）との相関が示唆される。キシログルカン生合成においてL-Gal転移に関与する酵素がAtFUT1か否か、他の未知の酵素が関与しているのか解明するためには、Venzin *et al.*により作成された、*mur1*変異体からさらに*AtFut1*遺伝子を破壊した2重変異株（*mur1 mur2*変異株）[80]における、キシログルカンの構造をNMRなどにより解析し、L-Gal付加の有無をど雨亭する必要がある。

AtFut1の結晶構造はRocha *et al.*[81]、Urbanowics *et al.* [82]により解析されている。AtFUT1-GDP 複合体の結晶構造解析結果より、GDP-L-Fucのホスホジエステル結合は、

AtFUT1 の GDP 結合部位のアミノ酸残基と強固な水素結合を形成することがわかっている。本章で 2 価カチオンの影響を調査したところ、10 mM の Mn^{2+}を添加した場合、*At*FucTA の L-Gal 転移活性が 84% 低下した。結晶構造解析は行われていないが、*P. sativum* FUT1 においても、2 mM より高濃度な $MnCl_2$ を添加した場合、L-Fuc 転移活性が 60% 低下する[72]。AtFUT1 の GDP-L-Fuc 結合と、キシログルカンオリゴ糖上への L-Fuc 転移には、GDP-L-Fuc の L-Fuc 残基に結合したリン酸とのホスホジエステル結合が重要であることが、アミノ酸を置換した酵素の酵素活性測定結果より予測されている[81]。Mn^{2+}は、ADP や ATP の 2 つのホスホジエステル結合と強く配位することが知られている[139]ことから、GDP-糖と AtFUT1 の結合前に、Mn^{2+}が GDP-糖のホスホジエステル結合と配位し、GDP-糖と AtFUT1 との結合や L-Fuc 転移活性を阻害した可能性がある。一方、Mg^{2+}や Ca^{2+}は *P. sativum* FUT1 における報告[72]と同様に、酵素活性が上昇したが、その理由は不明である。また、L-Fuc の結合部位のうち、C-6 位メチル基周辺の結晶構造は詳細が報告されておらず、GDP-L-Fuc 上の L-Fuc 残基の基質認識機構は解明されていない。そのため、GDP-L-Fuc や、GDP-L-Gal と共結晶を作成し、構造解析することで、L-Fuc の認識に関わるアミノ酸残基が同定され、AtFUT1 における L-Gal 転移機構が解明されると考えられる。

AtFUT1 は、XLLG、XLLGXLLG-PA に糖転移活性を示すものの、XLLG-PA, XLXG/XXLG-PA には活性を示さなかった。さらに、XLLGXLLG-PA に対する AtFUT1 の活性は、XLLG に対するの活性の 7 倍だった。Cicéron *et al.*の結果[79]でも、同様の報告がされている。PA 標識を行うと、キシログルカンオリゴ糖還元末端側の Glc 残基は開環している。AtFUT1-XXLG/XLLG 複合体の結晶構造解析において、該当する Glc 残基は、基質認識への関与は示唆されていない。しかし、本章の結果において、XLLG 還元末端側の Glc が固定されている構造（XLLGXLLG-PA）では酵素活性が顕著に向上したことから、この Glc 残基が、

キシログルカンと AtFUT1 の基質認識部位との結合に関与している可能性が示唆された。

3.5. 結言

本章では、*mur1* 変異株の解析により示唆された、α1,3-L-Fuc 転移酵素、*At*FucTA の L-Gal 転移活性を *in vitro* で検出することができた。さらに、AtFUT1 は、キシログルカン XLLG に対する L-Gal 転移活性を有しており、構造解析により、XLJG もしくは XJLG が生成されたと推測した。XLJG 構造は、*A. thaliana mur1* 変異株や、*S. chinensis* 種子由来のキシログルカンで検出された構造であり、AtFUT1 が植物細胞内でキシログルカン上へ L-Fuc のみならず、L-Gal も転移している可能性が示唆された。L-Fuc 残基付加部位への L-Gal 残基付加や、L-Fuc 残基の L-Gal 残基への置換は、α-L-Fuc 転移酵素の幅広い基質特異性に起因すると考えられる。さらに、*Mm*FUT8 は *N*-結合型糖鎖に対し、L-Gal 転移活性を示した。GDP-L-Gal を用いた、希少糖を含有する新たな糖鎖生成の実例と L-Fuc 分子アナログを含有する新規糖化合物の生成の可能性を示した。

第4章　総括

糖化合物を、糖転移酵素を用いて合成する際、糖ヌクレオチドは糖の供与体として重要である。自然界にあまり存在せず、陸上生物や海洋生物にとって珍しい糖である、希少糖は、植物細胞において、細胞壁の構成成分などとして利用され、細胞成長や細胞壁構造の維持に関与していると考えられている。植物細胞内における、これらの希少糖を含む糖化合物や複合糖質の生合成には、希少糖を含む糖ヌクレオチドが利用されていると推測される。しかし、これらの糖ヌクレオチドはその多くが市販されておらず、入手が困難だった。こうした背景の中で、本研究では、L-Fuc の分子アナログである L-Gal に着目し、その糖ヌクレオチド、GDP-L-Gal の新規合成系を構築した。さらに、合成した GDP-L-Gal を用い、植物細胞内で発見された L-Gal 含有糖鎖、及び L-Gal を含有する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* で検出した。加えて、*M. musculus* 由来の α1,6-L-Fuc 転移酵素を用い、新規な L-Gal 含有糖鎖を作出した。

第 2 章では、まず、GDP-L-Gal の合成系を構築するため、植物細胞における GDP-L-Gal 生合成酵素、GME を用いた GDP-L-Gal の生成を試みた。分裂酵母を用いて発現させた GME 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、GDP-L-Gal の収率はわずか 15% 程度だった。そこで、L-Gal が、L-Fuc の分子アナログである点に着目し、L-Fuc 再利用経路を構成する、二機能性の酵素である FKP を用い、GDP-L-Gal の合成を行った。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を決定し、精製条件を検討することで、ワンポット合成と 3 つの精製ステップから、純度 99% 以上の GDP-L-Gal を収率 92% で生成することが可能となった。また、この FKP を用いた GDP 糖生成系は、他の L-Fuc 分子アナログにも応用可能だと予測される。そのため、L-Fuc 分子アナログを含有する新規糖化合物を合成する際に必

要な糖ヌクレオチドの供給に貢献できる。

第三章では、第二章で生成した 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 は、*N*-結合型糖鎖への L-Gal 転移活性を示した。このことから、*mur1* 変異体で検出された l-Gal を含有する *N*-結合型糖鎖の生合成には、*At*FucTA が関与していると考えられた。また、キシログルカンオリゴ糖生合成に関与する *A. thaliana* α1,2-L-Fuc 転移酵素 AtFUT1 の L-Gal 転移活性も調査したところ、AtFUT1 は、GDP-L-Gal を基質とし、キシログルカンオリゴ糖鎖上へ L-Gal 残基を転移した。加えて、AtFUT1 のアクセプター基質の認識には、XLLG/XXLG の非還元末端側の Glc 残基が関与していることが示唆された。これらの結果から、GDP-L-Fuc 欠乏変異体、*A. thaliana mur1* 変異体において報告されていた、L-Fuc 残基付加部位に L-Ga 残基が付加した糖鎖やキシログルカンオリゴ糖の生合成に α-L-Fuc 転移酵素が関与していることが明らかとなった。さらに、L-Gal 含有糖鎖は検出されていないものの、*M. muscus N*-結合型糖鎖生合成経路を構成する、*M. musculus* α1,6-L-Fuc 転移酵素 *Mm*FUT8 も、L-Gal 転移活性を有することを示し、新規な α1,6-L-Gal を含有する糖鎖を作出するとともに、L-Fuc 類縁体を含有する新規糖鎖生合成に、α-L-Fuc 転移酵素が利用であることを見出した。さらなる L-Gal 転移活性の向上には、酵素活性中心の基質認識に関わる部分の詳細な結晶構造データから、基質認識に関わるアミノ酸を決定し、その配列を改変することが必要だと考えられる。

参照論文

1. Yang L, Zhang L-M: **Chemical structural and chain conformational characterization of some bioactive polysaccharides isolated from natural sources**. *Carbohydrate polymers* 2009, **76**(3):349-361.
2. Dwek RA: **Biological importance of glycosylation**. In: *Molecular Recognition and Inclusion: Proceedings of the Ninth International Symposium on Molecular Recognition and Inclusion, Held at Lyon, 7-12 September 1996: 1998*. Springer Science & Business Media: 1.
3. Handford M, Rodriguez-Furlán C, Orellana A: **Nucleotide-sugar transporters: structure, function and roles *in vivo***. *Brazilian journal of medical and biological research* 2006, **39**(9):1149-1158.
4. Mishra A, Malhotra AV: **Tamarind xyloglucan: a polysaccharide with versatile application potential**. *Journal of Materials Chemistry* 2009, **19**(45):8528-8536.
5. Beneke CE, Viljoen AM, Hamman JH: **Polymeric plant-derived excipients in drug delivery**. *Molecules* 2009, **14**(7):2602-2620.
6. Harris PJ, Smith BG: **Plant cell walls and cell‐wall polysaccharides: structures, properties and uses in food products**. *International journal of food science & technology* 2006, **41**(s2):129-143.
7. Held MA, Jiang N, Basu D, Showalter AM, Faik A: **Plant cell wall polysaccharides: structure and biosynthesis**. *Polysaccharides: Bioactivity and Biotechnology* 2015:3-54.
8. Ünligil UM, Rini JM: **Glycosyltransferase structure and mechanism**. *Current opinion in structural biology* 2000, **10**(5):510-517.
9. Rademacher TW, Parekh RB, Dwek RA: **Glycobiology**. *Annual Review of Biochemistry* 1988, **57**(1):785-838.

10. Breton C, Šnajdrová L, Jeanneau C, Koča J, Imberty A: **Structures and mechanisms of glycosyltransferases**. *Glycobiology* 2006, **16**(2):29R-37R.

11. Rijcken WP, Hooghwinkel GJ, Ferwerda W: **Pyrimidine metabolism and sugar nucleotide synthesis in rat liver**. *Biochemical Journal* 1990, **266**(3):777-783.

12. Seifert GJ, Roberts K: **The biology of arabinogalactan proteins**. *Annu Rev Plant Biol* 2007, **58**:137-161.

13. Reiter WD: **Biochemical genetics of nucleotide sugar interconversion reactions**. *Current opinion in plant biology* 2008, **11**(3):236-243.

14. Kleczkowski LA, Decker D: **Sugar activation for production of nucleotide sugars as substrates for glycosyltransferases in plants**. *Journal of Applied Glycoscience* 2015, **62**(2):25-36.

15. Bar-Peled M, O'Neill MA: **Plant nucleotide sugar formation, interconversion, and salvage by sugar recycling**. *Annu Rev Plant Biol* 2011, **62**:127-155.

16. Mohnen D, Bar-Peled M, Somerville C: **Cell Wall Polysaccharide Synthesis**. In: *Biomass Recalcitrance.* Blackwell Publishing Ltd.; 2009: 94-187.

17. Feingold DS: **Aldo (and Keto) Hexoses and Uronic Acids**. In: *Plant Carbohydrates I: Intracellular Carbohydrates.* Edited by Loewus FA, Tanner W. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1982: 3-76.

18. Pabst M, Grass J, Fischl R, Léonard R, Jin C, Hinterkörner G, Borth N, Altmann F: **Nucleotide and Nucleotide Sugar Analysis by Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Mass Spectrometry on Surface-Conditioned Porous Graphitic Carbon**. *Analytical chemistry* 2010, **82**(23):9782-9788.

19. Ginsburg V: **Formation of guanosine diphosphate L-fucose from guanosine diphosphate D-mannose**. *J Biol Chem* 1960, **235**:2196-2201.

20. Liao TH, Barber GA: **The synthesis of guanosine 5'-diphosphate-L-fucose by enzymes of**

a higher plant. *Biochim Biophys Acta* 1971, **230**(1):64-71.

21. Overton K, Serif GS: **Synthesis of L-fucose in thyroid tissue**. *Biochim Biophys Acta* 1981, **675**(2):281-284.

22. Bulet P, Hoflack B, Porchet M, Verbert A: **Study of the conversion of GDP-mannose into GDP-fucose in Nereids: a biochemical marker of oocyte maturation**. *Eur J Biochem* 1984, **144**(2):255-259.

23. Roos C, Kolmer M, Mattila P, Renkonen R: **Composition of *Drosophila melanogaster* proteome involved in fucosylated glycan metabolism**. *J Biol Chem* 2002, **277**(5):3168-3175.

24. Tonetti M, Sturla L, Bisso A, Zanardi D, Benatti U, De Flora A: **The metabolism of 6-deoxyhexoses in bacterial and animal cells**. *Biochimie* 1998, **80**(11):923-931.

25. Bonin CP, Potter I, Vanzin GF, Reiter W-D: **The MUR1 gene of *Arabidopsis thaliana* encodes an isoform of GDP-D-mannose-4, 6-dehydratase, catalyzing the first step in the de novo synthesis of GDP-L-fucose**. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1997, **94**(5):2085-2090.

26. Reitman ML, Trowbridge IS, Kornfeld S: **Mouse lymphoma cell lines resistant to pea lectin are defective in fucose metabolism**. *J Biol Chem* 1980, **255**(20):9900-9906.

27. Kotake T, Hojo S, Yamaguchi D, Aohara T, Konishi T, Tsumuraya Y: **Properties and physiological functions of UDP-sugar pyrophosphorylase in *Arabidopsis***. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 2007, **71**(3):761-771.

28. Kotake T, Yamaguchi D, Ohzono H, Hojo S, Kaneko S, Ishida H-k, Tsumuraya Y: **UDP-sugar pyrophosphorylase with broad substrate specificity toward various monosaccharide 1-phosphates from pea sprouts**. *Journal of Biological Chemistry* 2004, **279**(44):45728-45736.

29. Kleczkowski LA, Decker D, Wilczynska M: **UDP-sugar pyrophosphorylase: a new old**

mechanism for sugar activation. *Plant physiology* 2011, **156**(1):3-10.

30. Ishihara H, Massaro DJ, Heath EC: **The metabolism of L-fucose. 3. The enzymatic synthesis of beta-L-fucose 1-phosphate**. *J Biol Chem* 1968, **243**(6):1103-1109.

31. Ishihara H, Heath EC: **The metabolism of L-fucose. IV. The biosynthesis of guanosine diphosphate L-fucose in porcine liver**. *J Biol Chem* 1968, **243**(6):1110-1115.

32. Liu TW, Ito H, Chiba Y, Kubota T, Sato T, Narimatsu H: **Functional expression of L-fucokinase/guanosine 5'-diphosphate-L-fucose pyrophosphorylase from *Bacteroides fragilis* in *Saccharomyces cerevisiae* for the production of nucleotide sugars from exogenous monosaccharides**. *Glycobiology* 2011, **21**(9):1228-1236.

33. Kotake T, Hojo S, Tajima N, Matsuoka K, Koyama T, Tsumuraya Y: **A bifunctional enzyme with L-fucokinase and GDP-L-fucose pyrophosphorylase activities salvages free L-fucose in *Arabidopsis***. *J Biol Chem* 2008, **283**(13):8125-8135.

34. Arrigoni O: **Ascorbate system in plant development**. *J Bioenerg Biomembr* 1994, **26**(4):407-419.

35. Linster CL, Clarke SG: **L-Ascorbate biosynthesis in higher plants: the role of VTC2**. *Trends Plant Sci* 2008, **13**(11):567-573.

36. Wheeler GL, Jones MA, Smirnoff N: **The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants**. *Nature* 1998, **393**(6683):365.

37. Wolucka BA, Persiau G, Van Doorsselaere J, Davey MW, Demol H, Vandekerckhove J, Van Montagu M, Zabeau M, Boerjan W: **Partial purification and identification of GDP-mannose 3",5"-epimerase of *Arabidopsis thaliana*, a key enzyme of the plant vitamin C pathway**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, **98**(26):14843-14848.

38. Watanabe K, Suzuki K, Kitamura S: **Characterization of a GDP-D-mannose 3'',5''-epimerase from rice**. *Phytochemistry* 2006, **67**(4):338-346.

39. Wolucka BA, Van Montagu M: **GDP-mannose 3',5'-epimerase forms GDP-L-gulose, a**

putative intermediate for the *de novo* biosynthesis of vitamin C in plants. *J Biol Chem* 2003, **278**(48):47483-47490.

40. Major LL, Wolucka BA, Naismith JH: **Structure and function of GDP-mannose-3 ', 5 '-epimerase: An enzyme which performs three chemical reactions at the same active site**. *Journal of the American Chemical Society* 2005, **127**(51):18309-18320.

41. Wierenga RK, De Maeyer MC, Hol WG: **Interaction of pyrophosphate moieties with alpha-helixes in dinucleotide-binding proteins**. *Biochemistry* 1985, **24**(6):1346-1357.

42. Barber GA: **The synthesis of L-glucose by plant enzyme systems**. *Arch Biochem Biophys* 1971, **147**(2):619-623.

43. Hebda PA, Behrman EJ, Barber GA: **The guanosine 5'-diphosphate D-mannose: guanosine 5'-diphosphate L-galactose epimerase of *Chlorella pyrenoidosa*. Chemical synthesis of guanosine 5'-diphosphate L-galactose and further studies of the enzyme and the reaction it catalyzes**. *Arch Biochem Biophys* 1979, **194**(2):496-502.

44. Barber GA: **Observations on the mechanism of the reversible epimerization of GDP-D-mannose to GDP-L-galactose by an enzyme from *Chlorella pyrenoidosa***. *J Biol Chem* 1979, **254**(16):7600-7603.

45. Richard JP, Amyes TL: **Proton transfer at carbon**. *Curr Opin Chem Biol* 2001, **5**(6):626-633.

46. Binch H, Stangier K, Thiem J: **Chemical synthesis of GDP-L-galactose and analogues**. *Carbohydrate Research* 1998, **306**(3):409-419.

47. Düffels A, Green LG, Lenz R, Ley SV, Vincent SP, Wong CH: **Chemoenzymatic synthesis of L-galactosylated dimeric sialyl Lewis X structures employing alpha-1,3-fucosyltransferase V**. *Bioorg Med Chem* 2000, **8**(10):2519-2525.

48. Rayon C, Cabanes-Macheteau M, Loutelier-Bourhis C, Salliot-Maire I, Lemoine J, Reiter WD, Lerouge P, Faye L: **Characterization of *N*-glycans from *Arabidopsis*. Application to**

a fucose-deficient mutant. *Plant physiology* 1999, **119**(2):725-734.

49. Wilson IB: **Glycosylation of proteins in plants and invertebrates**. *Current opinion in structural biology* 2002, **12**(5):569-577.

50. Brooks SA: **Appropriate glycosylation of recombinant proteins for human use: implications of choice of expression system**. *Mol Biotechnol* 2004, **28**(3):241-255.

51. Tomiya N, Narang S, Lee YC, Betenbaugh MJ: **Comparing *N*-glycan processing in mammalian cell lines to native and engineered lepidopteran insect cell lines**. *Glycoconjugate journal* 2004, **21**(6):343-360.

52. Pattison RJ, Amtmann A: ***N*-glycan production in the endoplasmic reticulum of plants**. *Trends Plant Sci* 2009, **14**(2):92-99.

53. Schwarz F, Aebi M: **Mechanisms and principles of *N*-linked protein glycosylation**. *Current opinion in structural biology* 2011, **21**(5):576-582.

54. Miyoshi E, Noda K, Yamaguchi Y, Inoue S, Ikeda Y, Wang W, Ko JH, Uozumi N, Li W, Taniguchi N: **The alpha1-6-fucosyltransferase gene and its biological significance**. *Biochim Biophys Acta* 1999, **1473**(1):9-20.

55. Strasser R: **Plant protein glycosylation**. *Glycobiology* 2016, **26**(9):926-939.

56. Veit C, Vavra U, Strasser R: ***N*-Glycosylation and plant cell growth**. *Methods Mol Biol* 2015, **1242**:183-194.

57. Leiter H, Mucha J, Staudacher E, Grimm R, Glossl J, Altmann F: **Purification, cDNA cloning, and expression of GDP-L-Fuc:Asn-linked GlcNAc alpha1,3-fucosyltransferase from mung beans**. *J Biol Chem* 1999, **274**(31):21830-21839.

58. Wilson IB, Rendić D, Freilinger A, Dumić J, Altmann F, Mucha J, Müller S, Hauser M-T: **Cloning and expression of cDNAs encoding α1, 3-fucosyltransferase homologues from *Arabidopsis thaliana***. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 2001, **1527**(1):88-96.

59. Strasser R: **Biological significance of complex N-glycans in plants and their impact on plant physiology**. *Front Plant Sci* 2014, **5**:363.

60. Al-Somali AM, Krueger KM, Falkner JC, Colvin VL: **Recycling size exclusion chromatography for the analysis and separation of nanocrystalline gold**. *Analytical chemistry* 2004, **76**(19):5903-5910.

61. Albersheim P, Darvill A, Roberts K, Sederoff R, Staehelin A: **Plant cell walls**: Garland Science; 2010.

62. Caffall KH, Mohnen D: **The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides**. *Carbohydr Res* 2009, **344**(14):1879-1900.

63. O'Brien JA, Daudi A, Butt VS, Bolwell GP: **Reactive oxygen species and their role in plant defence and cell wall metabolism**. *Planta* 2012, **236**(3):765-779.

64. Underwood W: **The plant cell wall: a dynamic barrier against pathogen invasion**. *Frontiers in plant science* 2012, **3**.

65. Haughn GW, Western TL: **Arabidopsis seed coat mucilage is a specialized cell wall that can be used as a model for genetic analysis of plant cell wall structure and function**. *Frontiers in plant science* 2012, **3**.

66. Kim JS, Awano T, Yoshinaga A, Takabe K: **Immunolocalization and structural variations of xylan in differentiating earlywood tracheid cell walls of *Cryptomeria japonica***. *Planta* 2010, **232**(4):817-824.

67. Showalter AM: **Structure and function of plant cell wall proteins**. *The Plant Cell Online* 1993, **5**(1):9-23.

68. Tsekos I: **The sites of cellulose synthesis in algae: diversity and evolution of cellulose-synthesizing enzyme complexes**. *Journal of phycology* 1999, **35**(4):635-655.

69. Schultink A, Liu L, Zhu L, Pauly M: **Structural diversity and function of xyloglucan sidechain substituents**. *Plants* 2014, **3**(4):526-542.

70. Scheller HV, Ulvskov P: **Hemicelluloses**. *Annual review of plant biology* 2010, **61**.

71. Albersheim P, Darvill A, Roberts K, Sederoff R, Staehelin A: **Plant Cell Walls.(New York: Garland Science, Taylor & Francis Group)**. 2011.

72. White AR, Xin Y, Pezeshk V: **Xyloglucan glucosyltransferase in Golgi membranes from *Pisum sativum* (pea)**. *Biochemical Journal* 1993, **294**(1):231-238.

73. Cocuron JC, Lerouxel O, Drakakaki G, Alonso AP, Liepman AH, Keegstra K, Raikhel N, Wilkerson CG: **A gene from the cellulose synthase-like C family encodes a beta-1,4 glucan synthase**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, **104**(20):8550-8555.

74. Faik A, Price NJ, Raikhel NV, Keegstra K: **An Arabidopsis gene encoding an α-xylosyltransferase involved in xyloglucan biosynthesis**. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2002, **99**(11):7797-7802.

75. Cavalier DM, Keegstra K: **Two xyloglucan xylosyltransferases catalyze the addition of multiple xylosyl residues to cellohexaose**. *Journal of Biological Chemistry* 2006, **281**(45):34197-34207.

76. Zabotina OA, van de Ven WT, Freshour G, Drakakaki G, Cavalier D, Mouille G, Hahn MG, Keegstra K, Raikhel NV: ***Arabidopsis XXT5* gene encodes a putative alpha-1,6-xylosyltransferase that is involved in xyloglucan biosynthesis**. *Plant J* 2008, **56**(1):101-115.

77. Madson M, Dunand C, Li X, Verma R, Vanzin GF, Caplan J, Shoue DA, Carpita NC, Reiter WD: **The *MUR3* gene of *Arabidopsis* encodes a xyloglucan galactosyltransferase that is evolutionarily related to animal exostosins**. *The Plant cell* 2003, **15**(7):1662-1670.

78. Faik A, Bar-Peled M, DeRocher AE, Zeng W, Perrin RM, Wilkerson C, Raikhel NV, Keegstra K: **Biochemical characterization and molecular cloning of an α-1, 2-fucosyltransferase that catalyzes the last step of cell wall xyloglucan biosynthesis in pea**. *Journal of Biological Chemistry* 2000, **275**(20):15082-15089.

79. Cicéron F, Rocha J, Kousar S, Hansen SF, Chazalet V, Gillon E, Breton C, Lerouxel O: **Expression, purification and biochemical characterization of AtFUT1, a xyloglucan-specific fucosyltransferase from *Arabidopsis thaliana***. *Biochimie* 2016, **128**:183-192.

80. Vanzin GF, Madson M, Carpita NC, Raikhel NV, Keegstra K, Reiter W-D: **The mur2 mutant of *Arabidopsis thaliana* lacks fucosylated xyloglucan because of a lesion in fucosyltransferase AtFUT1**. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2002, **99**(5):3340-3345.

81. Rocha J, Cicéron F, de Sanctis D, Lelimousin M, Chazalet V, Lerouxel O, Breton C: **Structure of *Arabidopsis thaliana* FUT1 Reveals a Variant of the GT-B Class Fold and Provides Insight into Xyloglucan Fucosylation**. *The Plant cell* 2016, **28**(10):2352-2364.

82. Urbanowicz BR, Bharadwaj VS, Alahuhta M, Peña MJ, Lunin VV, Bomble YJ, Wang S, Yang JY, Tuomivaara ST, Himmel ME: **Structural, mutagenic and in silico studies of xyloglucan fucosylation in arabidopsis thaliana suggest a water‐mediated mechanism**. *The Plant Journal* 2017.

83. Sarria R, Wagner TA, O'Neill MA, Faik A, Wilkerson CG, Keegstra K, Raikhel NV: **Characterization of a family of *Arabidopsis* genes related to xyloglucan fucosyltransferase1**. *Plant physiology* 2001, **127**(4):1595-1606.

84. O'Neill MA, York WS: **The composition and structure of plant primary cell walls**. *The plant cell wall* 2003:1-54.

85. Ridley BL, O'Neill MA, Mohnen D: **Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling**. *Phytochemistry* 2001, **57**(6):929-967.

86. Karr AL: **Isolation of an enzyme system which will catalyze the glycosylation of extensin**. *Plant physiology* 1972, **50**(2):275-282.

87. Atmodjo MA, Sakuragi Y, Zhu X, Burrell AJ, Mohanty SS, Atwood JA, Orlando R, Scheller

HV, Mohnen D: **Galacturonosyltransferase (GAUT) 1 and GAUT7 are the core of a plant cell wall pectin biosynthetic homogalacturonan: galacturonosyltransferase complex**. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2011, **108**(50):20225-20230.

88. Stoddart R, Northcote D: **Metabolic relationships of the isolated fractions of the pectic substances of actively growing sycamore cells**. *Biochemical Journal* 1967, **105**(1):45-59.

89. Peaucelle A, Braybrook S, Höfte H: **Cell wall mechanics and growth control in plants: the role of pectins revisited**. *Frontiers in plant science* 2012, **3**.

90. Wolf S, Mouille G, Pelloux J: **Homogalacturonan methyl-esterification and plant development**. *Molecular plant* 2009, **2**(5):851-860.

91. Lau JM, McNeil M, Darvill AG, Albersheim P: **Structure of the backbone of rhamnogalacturonan I, a pectic polysaccharide in the primary cell walls of plants**. *Carbohydrate research* 1985, **137**:111-125.

92. Pellerin P, Doco T, Vidal S, Williams P, Brillouet JM, O'Neill MA: **Structural characterization of red wine rhamnogalacturonan II**. *Carbohydr Res* 1996, **290**(2):183-197.

93. O'Neill MA, Ishii T, Albersheim P, Darvill AG: **Rhamnogalacturonan II: structure and function of a borate cross-linked cell wall pectic polysaccharide**. *Annu Rev Plant Biol* 2004, **55**:109-139.

94. Dick-Perez M, Zhang Y, Hayes J, Salazar A, Zabotina OA, Hong M: **Structure and interactions of plant cell-wall polysaccharides by two- and three-dimensional magic-angle-spinning solid-state NMR**. *Biochemistry* 2011, **50**(6):989-1000.

95. Takano J, Miwa K, Fujiwara T: **Boron transport mechanisms: collaboration of channels and transporters**. *Trends Plant Sci* 2008, **13**(8):451-457.

96. Date Y, Sakata K, Kikuchi J: **Chemical profiling of complex biochemical mixtures from various seaweeds**. *Polymer Journal* 2012, **44**(8):888.

97. Bar-Peled M, Urbanowicz BR, O'Neill MA: **The synthesis and origin of the pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II–insights from nucleotide sugar formation and diversity**. *Frontiers in plant science* 2012, **3**:92.

98. Keegstra K, Talmadge KW, Bauer WD, Albersheim P: **The Structure of Plant Cell Walls: III. A Model of the Walls of Suspension-cultured Sycamore Cells Based on the Interconnections of the Macromolecular Components**. *Plant physiology* 1973, **51**(1):188-197.

99. Oka T, Saito F, Shimma Y, Yoko-o T, Nomura Y, Matsuoka K, Jigami Y: **Characterization of endoplasmic reticulum-localized UDP-D-galactose: hydroxyproline *O*-galactosyltransferase using synthetic peptide substrates in *Arabidopsis***. *Plant physiology* 2010, **152**(1):332-340.

100. Liwanag AJ, Ebert B, Verhertbruggen Y, Rennie EA, Rautengarten C, Oikawa A, Andersen MC, Clausen MH, Scheller HV: **Pectin biosynthesis: GALS1 in *Arabidopsis thaliana* is a beta-1,4-galactan beta-1,4-galactosyltransferase**. *The Plant cell* 2012, **24**(12):5024-5036.

101. Qu Y, Egelund J, Gilson PR, Houghton F, Gleeson PA, Schultz CJ, Bacic A: **Identification of a novel group of putative *Arabidopsis thaliana* beta-(1,3)-galactosyltransferases**. *Plant Mol Biol* 2008, **68**(1-2):43-59.

102. Donnenfeld RS, Perry HD, Solomon R, Jensen HG, Stein J, Snyder RW, Wittpenn JR, Donnenfeld ED: **A comparison of gatifloxacin to ciprofloxacin in the prophylaxis of Streptococcus pneumoniae in rabbits in a LASIK model**. *Eye Contact Lens* 2006, **32**(1):46-50.

103. Lerouge P, Cabanes-Macheteau M, Rayon C, Fischette-Laine AC, Gomord V, Faye L: ***N*-glycoprotein biosynthesis in plants: recent developments and future trends**. *Plant Mol Biol* 1998, **38**(1-2):31-48.

104. Strasser R, Bondili JS, Vavra U, Schoberer J, Svoboda B, Glossl J, Leonard R, Stadlmann J,

Altmann F, Steinkellner H *et al*: **A unique beta1,3-galactosyltransferase is indispensable for the biosynthesis of *N*-glycans containing Lewis a structures in *Arabidopsis thaliana***. *The Plant cell* 2007, **19**(7):2278-2292.

105. Strasser R, Altmann F, Mach L, Glössl J, Steinkellner H: **Generation of Arabidopsis thaliana plants with complex *N*-glycans lacking β1, 2-linked xylose and core α1, 3-linked fucose**. *FEBS letters* 2004, **561**(1-3):132-136.

106. Zablackis E, York WS, Pauly M, Hantus S, Reiter WD, Chapple CC, Albersheim P, Darvill A: **Substitution of L-fucose by L-galactose in cell walls of *Arabidopsis mur1***. *Science* 1996, **272**(5269):1808-1810.

107. Reuhs BL, Glenn J, Stephens SB, Kim JS, Christie DB, Glushka JG, Zablackis E, Albersheim P, Darvill AG, O'Neill MA: **L-Galactose replaces L-fucose in the pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II synthesized by the L-fucose-deficient *mur1 Arabidopsis* mutant**. *Planta* 2004, **219**(1):147-157.

108. Hantus S, Pauly M, Darvill AG, Albersheim P, York WS: **Structural characterization of novel L-galactose-containing oligosaccharide subunits of jojoba seed xyloglucans**. *Carbohydr Res* 1997, **304**(1):11-20.

109. Pabst M, Fischl RM, Brecker L, Morelle W, Fauland A, Kofeler H, Altmann F, Leonard R: **Rhamnogalacturonan II structure shows variation in the side chains monosaccharide composition and methylation status within and across different plant species**. *Plant J* 2013, **76**(1):61-72.

110. Buffetto F, Ropartz D, Zhang XJ, Gilbert HJ, Guillon F, Ralet MC: **Recovery and fine structure variability of RGII sub-domains in wine (Vitis vinifera Merlot)**. *Ann Bot* 2014, **114**(6):1327-1337.

111. Gilbert L, Alhagdow M, Nunes-Nesi A, Quemener B, Guillon F, Bouchet B, Faurobert M, Gouble B, Page D, Garcia V *et al*: **GDP-D-mannose 3,5-epimerase (GME) plays a key role**

at the intersection of ascorbate and non-cellulosic cell-wall biosynthesis in tomato. *Plant J* 2009, **60**(3):499-508.

112. Voxeur A, Gilbert L, Rihouey C, Driouich A, Rothan C, Baldet P, Lerouge P: **Silencing of the GDP-D-mannose 3,5-epimerase affects the structure and cross-linking of the pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II and plant growth in tomato**. *J Biol Chem* 2011, **286**(10):8014-8020.

113. Staudacher E, Dalik T, Wawra P, Altmann F, Marz L: **Functional purification and characterization of a GDP-fucose: beta-*N*-acetylglucosamine (Fuc to Asn linked GlcNAc) alpha 1,3-fucosyltransferase from mung beans**. *Glycoconjugate journal* 1995, **12**(6):780-786.

114. Pauly M, Eberhard S, Albersheim P, Darvill A, York WS: **Effects of the mur1 mutation on xyloglucans produced by suspension-cultured *Arabidopsis thaliana* cells**. *Planta* 2001, **214**(1):67-74.

115. Wang W, Hu T, Frantom PA, Zheng T, Gerwe B, Del Amo DS, Garret S, Seidel RD, Wu P: **Chemoenzymatic synthesis of GDP-L-fucose and the Lewis X glycan derivatives**. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2009, **106**(38):16096-16101.

116. Yamada H, Koizumi N, Nakamichi N, Kiba T, Yamashino T, Mizuno T: **Rapid response of *Arabidopsis* T87 cultured cells to cytokinin through His-to-Asp phosphorelay signal transduction**. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 2004, **68**(9):1966-1976.

117. Kanter-Smoler G, Dahlkvist A, Sunnerhagen P: **Improved method for rapid transformation of intact *Schizosaccharomyces pombe* cells**. *Biotechniques* 1994, **16**(5):798-800.

118. Hagan IM, Carr AM, Grallert A, Nurse P: **Fission Yeast: A Laboratory Manual**: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2016.

119. Bruckner J: **Estimation of monosaccharides by the orcinol-sulphuric acid reaction**.

Biochem J 1955, **60**(2):200-205.

120. Engels L, Elling L: **WbgL: a novel bacterial α1,2-fucosyltransferase for the synthesis of 2'-fucosyllactose**. *Glycobiology* 2014, **24**(2):170-178.

121. Wahl C, Hirtz D, Elling L: **Multiplexed Capillary Electrophoresis as Analytical Tool for Fast Optimization of Multi-Enzyme Cascade Reactions - Synthesis of Nucleotide Sugars: Dedicated to Prof. Dr. Vladimir Křen on the occasion of his 60(th) birthday**. *Biotechnol J* 2016, **11**(10):1298-1308.

122. Bloomfield VA: **Condensation of DNA by multivalent cations: considerations on mechanism**. *Biopolymers* 1991, **31**(13):1471-1481.

123. Ayorinde FO, Keith QL, Wan LW: **Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of cod liver oil and the effect of analyte/matrix concentration on signal intensities**. *Rapid Commun Mass Spectrom* 1999, **13**(17):1762-1769.

124. Nakajima K, Kitazume S, Angata T, Fujinawa R, Ohtsubo K, Miyoshi E, Taniguchi N: **Simultaneous determination of nucleotide sugars with ion-pair reversed-phase HPLC**. *Glycobiology* 2010, **20**(7):865-871.

125. Shames SL, Simon ES, Christopher CW, Schmid W, Whitesides GM, Yang LL: **CMP-*N*-acetylneuraminic acid synthetase of Escherichia coli: high level expression, purification and use in the enzymatic synthesis of CMP-*N*-acetylneuraminic acid and CMP-neuraminic acid derivatives**. *Glycobiology* 1991, **1**(2):187-191.

126. Stangier K, Palcic MM, Bundle DR, Hindsgaul O, Thiem J: **Fucosyltransferase-catalyzed formation of L-galactosylated Lewis structures**. *Carbohydrate research* 1997, **305**(3-4):511-515.

127. Boyes DC, Zayed AM, Ascenzi R, McCaskill AJ, Hoffman NE, Davis KR, Gorlach J: **Growth stage-based phenotypic analysis of *Arabidopsis:* a model for high throughput**

functional genomics in plants. *The Plant cell* 2001, **13**(7):1499-1510.

128. Ohashi H, Ohashi T, Kajiura H, Misaki R, Kitamura S, Fujiyama K: **Fucosyltransferases produce *N*-glycans containing core L-galactose**. *Biochem Biophys Res Commun* 2017, **483**(1):658-663.

129. Yanagidani S, Uozumi N, Ihara Y, Miyoshi E, Yamaguchi N, Taniguchi N: **Purification and cDNA cloning of GDP-L-Fuc:*N*-acetyl-beta-D-glucosaminide:alpha1-6 fucosyltransferase (alpha1-6 FucT) from human gastric cancer MKN45 cells**. *Journal of biochemistry* 1997, **121**(3):626-632.

130. Selman MHJ, Hemayatkar M, Deelder AM, Wuhrer M: **Cotton HILIC SPE Microtips for Microscale Purification and Enrichment of Glycans and Glycopeptides**. *Analytical chemistry* 2011, **83**(7):2492-2499.

131. Saha AK, Brewer CF: **Determination of the concentrations of oligosaccharides, complex type carbohydrates, and glycoproteins using the phenol-sulfuric acid method**. *Carbohydrate Research* 1994, **254**:157-167.

132. Hase S, Hara S, Matsushima Y: **Tagging of sugars with a fluorescent compound, 2-aminopyridine**. *Journal of biochemistry* 1979, **85**(1):217-220.

133. Ohashi T, Nakakita S-i, Sumiyoshi W, Yamada N, Ikeda Y, Tanaka N, Takegawa K: **Structural analysis of α1, 3-linked galactose-containing oligosaccharides in *Schizosaccharomyces pombe* mutants harboring single and multiple α-galactosyltransferase genes disruptions**. *Glycobiology* 2010, **21**(3):340-351.

134. Wong-Madden ST, Landry D: **Purification and characterization of novel glycosidases from the bacterial genus *Xanthomonas***. *Glycobiology* 1995, **5**(1):19-28.

135. Sulzenbacher G, Bignon C, Nishimura T, Tarling CA, Withers SG, Henrissat B, Bourne Y: **Crystal structure of *Thermotoga maritima* alpha-L-fucosidase. Insights into the catalytic mechanism and the molecular basis for fucosidosis**. *J Biol Chem* 2004,

279(13):13119-13128.

136. Nagae M, Tsuchiya A, Katayama T, Yamamoto K, Wakatsuki S, Kato R: **Structural basis of the catalytic reaction mechanism of novel 1, 2-α-L-fucosidase from *Bifidobacterium bifidum***. *Journal of Biological Chemistry* 2007, **282**(25):18497-18509.

137. Ihara H, Ikeda Y, Toma S, Wang X, Suzuki T, Gu J, Miyoshi E, Tsukihara T, Honke K, Matsumoto A *et al*: **Crystal structure of mammalian alpha1,6-fucosyltransferase, FUT8**. *Glycobiology* 2007, **17**(5):455-466.

138. Farkas V, Hanna R, Maclachlan G: **Xyloglucan oligosaccharide α-L-fucosidase activity from growing pea stems and germinating nasturtium seeds**. *Phytochemistry* 1991, **30**(10):3203-3207.

139. Smithers GW, Sammons RD, Goodhart PJ, LoBrutto R, Reed GH: **Stereochemical control over manganese (II)-thio versus manganese (II)-oxy coordination in adenosine 5'-*O*-(1-thiodiphosphate) complexes at the active site of creatine kinase**. *Biochemistry* 1989, **28**(4):1597-1604.

本報に関する論文

Ohashi H, Ohashi T, Kajiura H, Misaki R, Kitamura S, Fujiyama K,

Fucosyltransferases produce *N*-glycans containing core L-galactose

Biochem Biophys Res Commun 2017, **483**(1): 658-663.

Ohashi H, Wahl C, Ohashi T, Elling L, Fujiyama K,

Effective Synthesis of Guanosine 5′-Diphospho-β-L-galactose Using Bacterial L-Fucokinase/Guanosine 5′-Diphosphate-L-fucose Pyrophosphorylase

Advanced Synthesis & Catalysis 2017, **359**(23): 4227-4234.

謝辞

本研究を遂行し、博士学位論文を提出するにあたって、多くの方々のご指導とご助力をいただきました。大阪大学生物工学国際交流センター　応用微生物領域　藤山 和仁 先生、三﨑 亮 先生、大橋 貴生 先生には、時に応じて厳しくご指導賜ると共に、終始激励を賜り、深く感謝しております。特に、大橋先生には、研究に向かう姿勢や課題解決のための方策など、細部まで丁寧に指導していただきました。心より御礼申し上げます。

本論文作成にあたり、審査委員として多くのご助言を頂ました、福崎 英一郎 教授、村中 俊哉 教授、 仁平 卓也 教授、渡邉 肇 教授、紀ノ岡 正博 教授、大政 健史 教授、内山 進 教授、永井 健治 教授に深くお礼申し上げます。また、工学研究科生命先端工学専攻の教職員の皆様には、日頃より教育及び研究における多大なご協力とご支援をいただきました。深く感謝いたします。研究のブラッシュアップや補助など様々な部分で、研究室の先輩、同期、後輩を始めとする生命先端工学専攻の皆様にお世話になりました。深く感謝しております。

GDP-L-Gal の精製において、貴重な意見やご支援を賜りました、大阪府立大学　北村 進一 教授、小谷口 美代子 様、アーヘン工科大学 Lothar Elling 教授、Claudia Wahl 様に、深く御礼申し上げます。アーヘン工科大学での研究活動費をご支援いただきました、日本学術振興会 大阪大学・アーヘン工科大学 日独共同大学院プログラムプログラム、及び、Deutsche Forschungsgemeinschaft “Selectivity in Chemo- and Biocatalysis” には、貴重な機会を賜り大変感謝しております。

最後に、これまで自分の進路に対し、辛抱強く、そして温かく見守り、いつも支援をしてくださった家族と友人に、深い感謝の意を表して、謝辞といたします。