

氏名	みうらとよかず 三浦豊和
学位の種類	博士(工学)
学位記番号	甲第190号
学位授与年月日	平成18年 3月17日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	細胞表層提示糖鎖修飾酵素に関する研究
学位論文審査委員	(主査) 築瀬英司 (副査) 和泉好計 古田武

学位論文の内容の要旨

細胞はその表層にタンパク質や脂質に結合した糖鎖構造を提示し、糖鎖の多くが分子間相互作用あるいは細胞間相互認識などに深く関与している。特に、微生物の宿主細胞への感染において、糖鎖構造をもった分子は感染における受容体として機能している。胃粘膜表層にも糖鎖構造が提示されているが、その中で糖タンパク質糖鎖に存在するルイス b 抗原や、糖脂質であるスルファチドは、難治疾患の一つである胃ガン誘発の原因とされている病原細菌 *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) が付着する分子として報告されている。

本論文では、胃粘膜表層に提示されるルイス b 抗原やスルファチドを、細胞を傷つけることなく選択的に分解あるいは修飾することにより、*H. pylori* の胃粘膜表層への付着阻害を最終目的としている。そこで、*H. pylori* の付着に関与する複合糖質、特に糖タンパク質糖鎖や糖脂質修飾に働く酵素を検索し、その特性を解明することにより、酵素製剤としての可能性を検討した。

1) 糖タンパク質糖鎖切断酵素の検索とその酵素化学的性質

糖タンパク質糖鎖に見出される末端 α -(1 \rightarrow 2)-L-フコシド結合含有ルイス b 抗原の切断に関わる酵素の検索は、まず、糖タンパク質であるブタの胃ムチン(PGM)を用いた集積培養により PGM 資化性菌を分離することにより行なった。分離菌について、フコース含有糖タンパク質である PGM と末端 α -(1 \rightarrow 2)-L-フコシド結合含有オリゴ糖である 2'-フコシルラクトースを基質にして、分離菌由来粗酵素液との酵素反応により遊離される L-フコースを定量する α -L-フコシダーゼ活性測定を行なった。両基質に対して強い活性を示した No. 521 株を選択し、*Bacillus cereus* (*B. cereus*) と同定した。次に、本菌が生産する酵素の生産条件と細胞内局在性を調べた。培地に添加した PGM は α -L-フコシダーゼ生産を誘導し、酵素は菌体外に分泌された。 α -L-フコシダーゼを電気泳動的に均一に精製し、酵素化学的諸性質を調べた結果、オリゴ糖鎖中末端 α -(1 \rightarrow 2)-L-フコシド結合に特異的に作用し、L-フコースを遊離することを明らかにした。すなわち、*B. cereus* の生産する α -L-フコシダーゼはルイス b 抗原内末端 L-フコース残基の遊離に有効であり、他起源の酵素とは基質特異性が異なることを明らかにした。

2) 糖脂質修飾酵素の検索とその酵素化学的性質

胃粘膜表層での *H. pylori* 付着の相乗的な阻害効果を目的として、*H. pylori* 付着ターゲットとされる糖脂質、すなわちスルファチドの修飾に関わる酵素を検索した。スルファチドは末端ガラクトース残基の3位が硫酸化されており、細胞表層に提示されている。そこで、硫酸基の遊離を行なうスルファターゼの検索を行なった。既に、哺乳類由来アリルスルファターゼ A はスルファチドとアリアル硫酸エステルを脱硫酸化するとされていることから、アリアル硫酸エステルを基質として用い、分離した PGM 資化性菌の中からアリルスルファターゼ A 活性をもつ微生物を検索した。その結果、土壌中から分離、同定したグラム陰性細菌 *Citrobacter braakii* からアリアル硫酸エステルに対して脱硫酸化反応を触媒する I 型アリルスルファターゼを、グラム陽性細菌 *Microbacterium* sp. から I 型と II 型、および非 I、II 型の特徴を合わせもつ新規なアリルスルファターゼを単離した。しかし、*C. braakii* および *Microbacterium* sp. 由来アリルスルファターゼにはスルファチドの脱硫酸化反応は認められなかった。

そこで、スルファチド分解酵素の検索を継続した。検索する酵素としては、スルファチドの糖-セラミド間を切断するエンドグリコシルセラミダーゼおよびセラミド部分の *N*-アシル結合の加水分解反応を触媒する酵素を対象とした。これら酵素のスクリーニングはブタ脳アセトン粉末(BAP)分解活性や、スルファチドと同じ単糖-セラミド構造を有するガラ系列スフィンゴ糖脂質であるガラクトシルセラミドのガラクトース切断・遊離活性を指標として、研究室保存の PGM 資化性菌、海洋性細菌、および Type culture に対して行ない、*Rhodococcus equi* ATCC 21107 を見出した。*R. equi* ATCC 21107 はガラクトシルセラミドからのガラクトース遊離を示したことから、エンドグリコシルセラミダーゼの生産が明らかとなった。これらの結果により、*H. pylori* の付着阻害に働く糖脂質分解酵素の単離を可能とした。

本論文で糖タンパク質糖鎖分解酵素として単離した *B. cereus* 由来 1,2- α -L-フコシダーゼおよび糖脂質分解酵素として単離可能とした *R. equi* 由来エンドグリコシルセラミダーゼは、ヒト胃粘膜表層に提示される複合糖質の糖鎖部分を切断することにより、*H. pylori* の付着を阻害する酵素として有用であると考えられる。今後は、ヒト胃ガン培養細胞を用いた *H. pylori* 付着阻害活性評価試験を実施することにより、これらの酵素の *H. pylori* 感染予防や除菌のための経口投与可能な酵素製剤としての利用が期待される。

審 査 結 果 の 要 旨

細胞表層にはタンパク質や脂質に結合した糖鎖構造が提示され、その糖鎖の多くが分子間相互作用あるいは細胞間相互認識などに深く関与している。特に、微生物の宿主細胞への感染において、糖鎖構造をもった分子は感染における受容体として機能している。胃粘膜表層に提示されているルイス b 糖タンパク質や、糖脂質であるスルファチドは、難治疾患の一つである胃ガン誘発の原因とされている病原細菌 *Helicobacter pylori* が付着する分子として報告されている。

本研究では、酵素を用いて胃粘膜表層に提示されるルイス b 糖タンパク質やスルファチドを選択的に分解あるいは修飾することにより、*H. pylori* 感染に対する抗付着療法の開発を最終目的

としている。本論文は、*H. pylori* の付着ターゲット分子の修飾に働く酵素を検索し、その特性を解明することにより酵素製剤としての可能性をまとめたものである。1) 付着ターゲットとされるルイスb糖タンパク質糖鎖を切断する酵素を検索して、*Bacillus cereus* から新規な α -(1→2)-L-フコシダーゼを取得した。2) もう一つの付着ターゲットとされるスルファチドの修飾に関わる酵素を検索して、*Citrobacter braakii* および *Microbacterium* sp. に新規なアシルスルファターゼを、さらに3) *Rhodococcus equi* にスルファチドの糖-セラミド間を切断するエンドグリコシルセラミダーゼを見出した。

以上のように、*H. pylori* 付着ターゲットを切断あるいは修飾する新規な酵素を精製・単離して、その特性を明らかにした。現在、ヒト胃ガン培養細胞を用いた*H. pylori* 付着阻害活性評価試験を実施しており、これら酵素は*H. pylori* 感染予防や除菌のための酵素製剤としての利用が期待される。

よって、本論文を博士（工学）の学位論文として価値あるものと認める。