

糖鎖工学進展を目指した新規酵素の発掘：海洋性生物由来のシアリダーゼの探索

Exploring sialidases from marine organisms toward the development of glycoengineering

藪 下 侑 平 山 口 真 範
Yuhei YABUSHITA Masanori YAMAGUCHI*
(和歌山大学教育学部化学教室)

2012年10月5日受理

Abstract

We have found two sialidases in the *Protoreaster nodosus* and *Ligia exotica*. The clarification of biological role, structure and biosyntheses of these two sialidases are important. Moreover, in the field of glycoengineering, sialidase is significant tool for the synthesizing of sialoglycans. To explore novel sialidase will surely accelerate the glycobiology and biochemistry.

はじめに

ヒトをはじめとする高等動物、植物、菌類などの細胞表面には多数の糖鎖が発現されている。糖鎖はその構成・結合様式・分岐構造の違いにより非常に多様な多様性を生み、複雑な生物の営みにおいて重要な役割を果たしている。例えば、生体内ではホルモンや細菌毒素、ウイルスなどの受容体として働き、さらに細胞間の認識や情報伝達、分化、免疫など様々な生命現象に深く関与している^{1)~4)}。そのため、糖鎖は核酸やタンパク質に次ぐ第三の生命鎖として注目され、重要な研究課題となっている。

それらの糖鎖を形成している構成糖の中でも、多くの生理機能発現に重要な役割を果たしているのがシアル酸である。シアル酸は9炭糖であり、化学的に多様性を持った構造をしており、生体内では糖鎖の非還元末端に結合したシアロ糖鎖という形で糖脂質や糖タンパク質として細胞表面に発現している。その構造の多様さにより、生体内では主に細胞間の認識や相互作用、酵素、ホルモン、ウイルスなどの機能分子のレセプターとして重要な機能を有している^{5),6)}。

シアリダーゼは細胞表面に発現したシアロ糖鎖からシアル酸を特異的に切り出す加水分解酵素であり、棘皮動物から哺乳動物まで広く存在し⁷⁾、微生物、細菌、ウイルスにも見られる^{8),9)}。

哺乳動物のシアリダーゼは、肝臓や脳、腎臓などに存在し、細胞内での異化分解だけでなく、生体内の機能分子を修飾することにより、細胞分化や細胞増殖、アポトーシスなどの生命現象に深く関与している。

細菌やウイルスのシアリダーゼは、宿主細胞への感染、自身のエネルギー生産に関わっている^{10)~12)}。

現在までに、哺乳類、細菌、ウイルスに関するシア

リダーゼの研究が多く報告なされてきたが、海産無脊椎動物由来のシアリダーゼにおいても、その構造、生合成、機能の研究における生物学的役割の解明が求められている。

さらに、糖鎖工学分野においてシアリダーゼを用いた有用糖鎖合成の報告例を鑑みると^{13),14)}、化学や医療分野の発展のためにはシアリダーゼの探索は非常に大きな意義を持つ。

本研究では、海産無脊椎動物からシアリダーゼを抽出し、様々な分野の研究用途として応用することを目的とした。

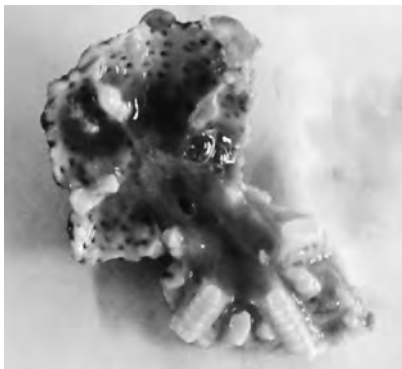
海産無脊椎動物からの酵素の抽出

◆*Protoreaster nodosus* (digestive organ, pyloric caecum) からの抽出

Protoreaster nodosus (Figure 1)の組織試料はdigestive organ (Figure 2)、pyloric caecum (Figure 3)に分割した。シアリダーゼの失活及びプロテアーゼの活性を抑えるため、抽出操作はすべて5℃にて行った。切り出し



Figure 1 *Protoreaster nodosus*

Figure 2 digestive organ of *Protoreaster nodosus*Figure 3 pyloric caecum of *Protoreaster nodosus*

たそれぞれの組織試料に、dithiothreitol (DTT)及びphenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)を添加したTris-HCl b. f. (10 mM, pH = 7.0, 3 mL)を加えた。次いで、それらをそれぞれホモジナイズし、5℃にて遠心分離(4000 r. p. m × 20 min)を行い、得られた上清を回収し、*Protoreaster nodosus*のdigestive organ, pyloric caecumからそれぞれ粗酵素液を得た。

◆ *Ligia exotica*からの抽出

Ligia exotica 5個体をそのまま試料として用い、ヒトデの時と同様の操作にて粗酵素液を抽出した。

シアリダーゼ活性測定の方法

シアリダーゼは糖鎖末端から α -グリコシド結合したシアル酸を遊離させる加水分解酵素である。シアリダーゼの活性を調べるための基質はシアル酸の2位の水酸基に発色基かつ脱離基として優れているPNPが α 結合した*p*-nitrophenyl sialic acid (PNP-SA)を用いることにした。PNP-SAを基質として*Protoreaster nodosus* (digestive organ, pyloric caecum)及び*Ligia exotica*からそれぞれ調製した粗酵素液との酵素反応を行い、次いで1 M 水酸化ナトリウム水溶液を加え、反応を停止させ、遊離したPNPの405 nmにおける吸光度を測定し、シアリダーゼの活性を有しているかを調査した (scheme 1)。

p-nitrophenyl sialic acid (PNP-SA)の合成

化合物1をスタート化合物として用い、メタノール溶媒下、Dowex (H⁺)を添加し、カルボキシル基のメチルエステル化を行うことで化合物2を得た。次いで、化合物2に塩化アセチルを作用させ、化合物3を得た。化合物3をジクロロメタンに溶解し、硫酸テトラブチルアンモニウム存在下1 M 水酸化ナトリウム水溶液に溶解した。*p*-ニトロフェノール (PNP)を作用させ、3段階30%の収率にて化合物4を得た。最後に化合物4にメタノール溶媒下でナトリウムメチラートを作用させ、すべてのアセチル基を脱保護し、水を作用させることにより、メチルエステルをケン化し、PNP-SA¹⁵⁾である化合物5を86%の収率で得た (scheme 2)。

シアリダーゼ活性の調査

先に合成したPNP-SA (化合物5)を基質として*Protoreaster nodosus* (digestive organ, pyloric caecum)及び*Ligia exotica*から調製した粗酵素液がシアリダーゼの活性を有しているかを調査した (scheme 2)。

PNP-SA 溶液 (29 mM : 1 μ L, 0.029 μ mol)をTris-HCl b. f. (10 mM, pH = 7.0, 1 mL)に溶解し、その混合溶液に粗酵素液 (40 μ L)を加え、室温にて16時間インキュベートした。反応終了後、1 M NaOHを加えて反応を停止させ、その結果、*Protoreaster nodosus* (digestive organ)及び*Ligia exotica*の吸光度はコントロールと比べて高い吸光度を示し、一方、*Protoreaster nodosus* (pyloric caecum)の吸光度はコントロールと同じ吸光度であった。以上の結果から、*Protoreaster nodosus* (digestive organ)及び*Ligia exotica*から調製された粗酵素液にはシアリダーゼが含まれていることを新たに明らかにした (table 1)。

まとめ

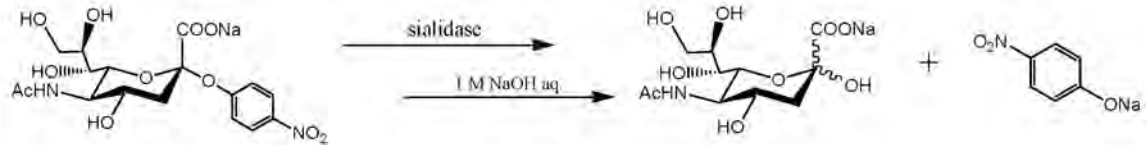
本研究では、*Protoreaster nodosus* (digestive organ)及び*Ligia exotica*から調製した粗酵素液にシアリダーゼの活性が有することを見出した。*Protoreaster nodosus* (digestive organ)、*Ligia exotica*に関するシアリダーゼの報告例はなく、今後、本研究で抽出したシアリダーゼの生化学的、化学的性質や機能を解明することで、生合成、機能の研究における生物学的役割の解明が望まれる。さらに、これら酵素の糖鎖工学的応用利用を行うことにより、シアロ糖鎖の効率的合成方法の開発が見込まれる。

実験の部

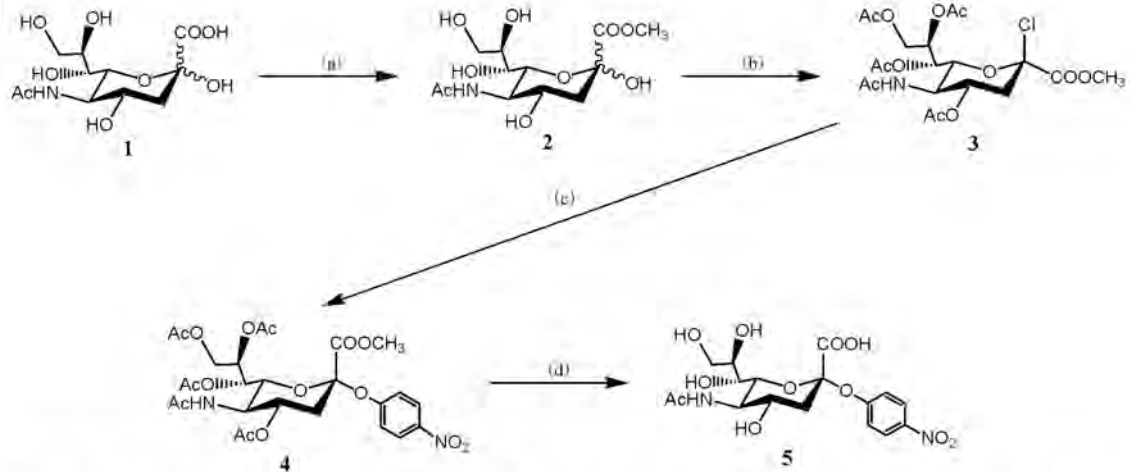
一般操作

N-アセチルノイラミン酸はナカライテスク株式会社製、有機合成試薬、反応溶媒、カラム溶媒は和光純薬工業株式会社製のものを使用した。

TLCはsilica gel 60 F254 (merck, aluminum



scheme 1



- a) MeOH, Dowex (H⁺), 40 °C., b) AcCl, r.t., c) *p*-nitrophenol, TBAHS, 1 M NaOH, CH₂Cl₂, r.t., 3 steps, 30 %.
 d) MeOH, NaOMe, r.t., then H₂O, 86 %.

scheme 2 synthesis of *PNP*-sialic acid

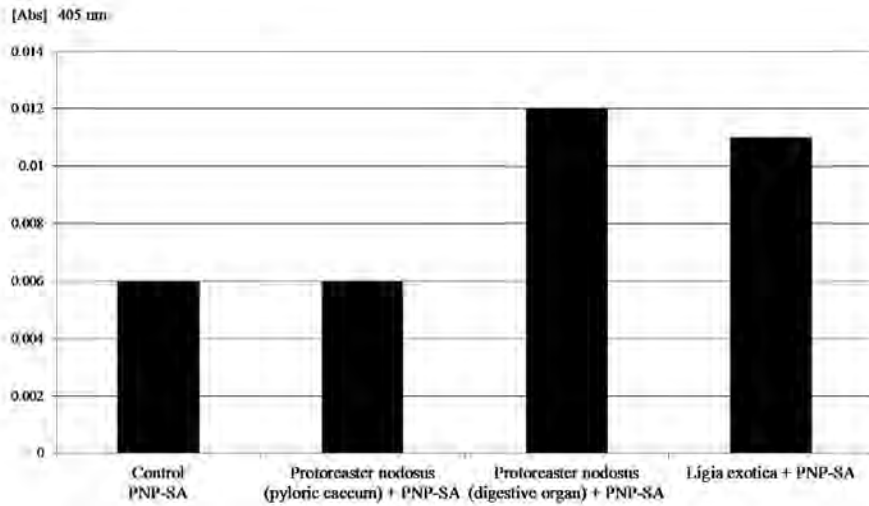


table 1 relative absorbance of three samples

sheets)を用い、検出は発色試薬 (10 % H₂SO₄-EtOH) によった。

吸光度は日本分光株式会社製V-630_{B10}を用いて測定した。

Ligia exotica は和歌山県加太海岸産、*Protoreaster nodosus* はフィリピン共和国マニラ湾産のものを使用した。

化合物 4 の合成

化合物 1 (1 g, 3.23 mmol) に MeOH (18 mL) と Dowex (H⁺) を加え、窒素雰囲気下、40°C にて 61 時間攪拌した。反応終了後、ガラスフィルターにて濾過し、MeOH 洗浄した。濾液と洗液を合わせ、減圧濃縮し、真空ポンプにて 3 時間乾燥させた。得られた残渣に AcCl (10 mL, 140.7 mmol) を加え、窒素雰囲気下、室温にて 17 時間攪拌した。反応終了後、toluene にて共沸し、真空ポンプにて 3 時間乾燥させた。得られた残渣

を CH_2Cl_2 (10 mL)に溶解し、TBAHS (500 mg, 1.61 mmol)、1 M NaOH (15 mL)に溶解したPNP (672 mg, 4.83 mmol)を加え、室温にて24時間攪拌した。反応終了後、 CHCl_3 にて抽出し、 H_2O にて洗浄した。 Na_2SO_4 にて乾燥後、減圧濃縮して得られたシラップをシリカゲルカラムクロマトグラフィー (Fuji Silysia 300 mesh, $\ell = 18$ cm)に供し、溶出液 (diethyl ether \rightarrow 2:1 AcOEt-hexane)にて化合物 4¹⁵⁾ (568.5 mg, 0.97 mmol, 30%)を得た。

化合物 5 の合成

化合物 4 (221.5 mg, 0.37 mmol)を MeOH (5 mL)に溶解し、触媒量のNaOMeを加え、室温にて24時間攪拌した。さらに、 H_2O を加え、室温にて1時間攪拌した。反応終了後、Dowex (H^+)にて中和し、MeOHで洗浄した。それを減圧濃縮して得られたシラップをゲルろ過カラムクロマトグラフィー (Sephadex LH-20, $\ell = 32$ cm)に供し、溶出液 (MeOH)にて化合物 5¹⁵⁾ (133.7 mg, 0.31 mmol, 83.7%)を得た。

酵素液の調製

*Protoreaster nodosus*の組織試料はdigestive organ及びpyloric caecumに分割し、それぞれ使用した。*Protoreaster nodosus*から切り出した組織試料、*Ligia exotica*それぞれに50 mM DTT, 25 mM PMSF含有 Tris-HCl b. f. (10 mM, pH = 7.0, 3 mL)を加え、0℃にてホモジナイズし、5℃にて遠心分離 (4000 r.p.m \times 20 min)を行い、得られた上清を用いてシアリダーゼ活性を測定した。

シアリダーゼ活性の測定

Tris-HCl b. f. (10 mM, pH = 7.0, 1 mL)、PNP-シアル酸溶液 (29 mM: 1 μL , 0.029 μmol)の混合溶液に粗酵素液 (40 μL)を加え、30℃にて3時間インキュベートした。反応終了後、1 M NaOH (1 mL)を加えて反応を停止させ、405 nmにおける吸光度をそれぞれ測定した。

謝辞

本研究は基盤研究(C) No. 24510297の助成を受けて行った。

参考文献

1. A, Varki. (1993) *Glycobiology*, **3**, 97-130.
2. Suzuki, Y.; Nakao, T.; Ito, T.; Watanabe, N.; Toda, Y.; Xu, G.; Suzuki, T.; Kobayashi, T.; Kimura, Y.; Yamada, A.; Sugawara, K.; Nishimura, H.; Kitame, F.; Nakamura, K.; Deya, E.; Kiso, M.; Hasegawa, A. (1992) *Virology*, **189**, 121-131.
3. Cuatrecasas, P. (1973) *Biochemistry*, **12**, 3547-3558.
4. Muramatsu, T. (1988) *J. Cell. Biochem.*, **36**, 1-14.
5. 鈴木康夫 (1990) 生化学、62巻、pp 231-260
6. 安藤進 (1988) 油化学、37巻、pp 923-933
7. Corfield, A.P.; Schauer, R. (1982) In Sialic Acids: Chemistry, Metabolism and Function Cell Biology Monographs, Vol. 10 (Schauer, R., ed.) Springer, Wien. pp. 5-50.
8. Rosenberg, A.; & Schengrund, C.-L. (eds.) (1976) Biological Roles of Sialic Acid. Plenum Press, New York.
9. Muller, H. E. (1974) *Behring Inst. Mitt.*, **55**, 34-56.
10. Saito, M.; Yu, R. K. (1995) in Biology of the Sialic Acids (Rosenberg A., ed.) Plenum Press, New York., pp. 261-313.
11. Monti, E.; Preti, A.; Venerando, B.; Borsani, G. (2002) *Neurochem. Res.*, **27**, 649-63.
12. Miyagi, T.; Wada, T.; Yamaguchi, K.; Hata, K. (2004) *Glycoconjugate J.*, **20**, 189-198.
13. Yamaguchi, M.; Urano, A.; Kawashima, Y.; Kimura, N.; Kanda, W. (2011). *Bull. Fac. Ed. Wakayama Univ. Natur. Sci.* **61**, 1-5.
14. Thiem, J.; Saubrey, B. (1991) *Angew. Chem. Int. Ed.*, **30**, 1503-1505.
15. Eschenfelder, V.; Brossmer, R. (1987) *Carbohydr Res.*, **162** (2): 294-297.