

## 主論文の要約

論文題目

デアミノノイラミン酸の細菌由来新奇代謝酵素および哺乳類における輸送経路の解析

生命農学研究科 生命技術科学専攻 動物細胞機能研究分野

岩木 佑弥

シアル酸は糖鎖の非還元末端に存在する酸性 9 炭糖であり、受精、発生、免疫、神経形成など多様な生物学的機能に重要な役割を果たす。シアル酸には *N*-acetylneuraminic acid (Neu5Ac)、*N*-glycolylneuraminic acid (Neu5Gc)、deaminoneuraminic acid (KDN) の三大分子種が存在し、細菌から哺乳動物まで広く分布している。細菌の中には、シアル酸遊離酵素シアリダーゼによって宿主のシアル酸を利用する種が多数報告されている。この細菌シアリダーゼは糖鎖の非還元末端に存在するシアル酸を遊離させる酵素としてシアル酸研究に広く用いられている。細菌シアリダーゼのほとんどは、Neu5Ac および Neu5Gc の 2 種を遊離する。しかし、その一方で KDN を遊離することができない。そのため、KDN 含有糖鎖の機能解析は困難である。KDN 含有糖鎖は Neu5Ac、Neu5Gc と比較して存在量は少ないが、細菌から哺乳類まで幅広く分布しており、その機能のほとんどは不明なままである。そこで、本研究では KDN だけを遊離する酵素 KDNase が唯一報告されているグラム陰性菌 *Sphingobacterium* 属のシアリダーゼの探索を行った。その結果、*Sphingobacterium* sp. strain HMA12 のゲノム配列から 4 種のシアリダーゼ候補遺伝子が見つかり、これらが大腸菌で発現させ、シアリダーゼ活性を 4-methylumbelliferyl-sialic acid (4MU-Sia) を基質として解析した。その結果、4 種のうち 1 種が Neu5Ac、Neu5Gc、KDN 全てを基質にする KDN-sialidase であることを見出した。さらに、*Sphingobacterium* KDN-sialidase は  $\alpha$ 2,3-、 $\alpha$ 2,6-、 $\alpha$ 2,8-、 $\alpha$ 2,9-結合したシアル酸を基質にできる幅広い基質特異性を持ち、至適 pH を中性領域である pH 7.0 に持つ興味深い性質があることが明らかになった。この性質から、*Sphingobacterium* KDN-sialidase は生理的条件下でも効率的に作用することができ、*in vivo* でも用いることができる。また、シアリダーゼ阻害剤 2,3-didehydro-2-deoxy-*N*-acetylneuraminic acid (DANA) は Neu5Ac および KDN の両方の遊離反応を阻害した。さらに、酵素の立体構造の中でシアル酸炭素 2 位近傍の加水分解に重要だと予測されるチロシンを変異させた Y354H 変異体が Neu5Ac および KDN 両者に対し不活性化した。このことから、*Sphingobacterium* KDN-sialidase は同一の活性ポケットにより Neu5Ac および KDN を認識していることが示唆される。これに加え、活性ポケットのシアル酸炭素 5 位の置換基付近の空間を縮小させた変異体 T177W は、KDN よりも Neu5Ac への活性が高い野生型の基質特異性が変化し、Neu5Ac よりも KDN への活性が高くなった。これにより、シアル酸分子

種特異性は、活性ポケットのシアル酸炭素 5 位の置換基付近の空間の大きさによって制御されることが示唆される。

また、遺伝子が同定されていない KDNase を探索するため、KDNase 発現 *Sphingobacterium* 属菌株の全ゲノム解析を行った。細菌シアリダーゼの保存配列の一つである Asp box (S-X-D-X-G-X-T-W ; X は任意のアミノ酸) を持つ 6 種のシアリダーゼ候補遺伝子を大腸菌によりタンパク質発現を行い、4MU-Sia を用いてシアリダーゼ活性を測定した。その結果、そのうちの 1 つの遺伝子が KDNase 活性を示したため、本研究により世界で初めて KDNase の配列が同定された。*Sphingobacterium* KDNase の配列はデータベースに登録されていない新奇のものだった。さらに、*Sphingobacterium* KDNase の性質を調べた結果、興味深いことに、*Sphingobacterium* KDNase は至適 pH を 6.0 と 8.0 の 2 点で持つ性質があることを見出した。

これら KDN を基質にすることができる 2 つの新奇シアリダーゼを発見したことで、KDN 含有糖鎖の機能解析を容易にすることができる。また、*Sphingobacterium* KDN-sialidase は *in vivo* 条件下で用いることができる基質特異性の広いシアリダーゼとして、糖鎖上のシアル酸の研究に役立てることができる。

また、本博士論文では、哺乳類細胞の KDN 単糖の取込経路から代謝運命までについて解析を行った。シアル酸は親水性が高いため細胞膜を自由に通過できないが、哺乳類細胞によって細胞内へと取り込まれることが知られている。Neu5Ac、Neu5Gc 単糖の取込機構の報告はあり、マクロピノサイトーシスで主要に取り込まれ、カベオラ依存性エンドサイトーシスによっても取り込まれることが示唆されている (Bardor *et al.*, 2005)。しかし、KDN 単糖の取込機構について報告がされていない。そこで本研究では、各種取込阻害剤を用いて KDN 取込機構の解析を行った。また、同時に Neu5Gc 単糖の取込機構を解析することで、KDN と Neu5Gc の取込機構の違いを検証した。その結果、マウスメラノーマ B16 細胞において、KDN はトランスポーター、クラスリン依存性エンドサイトーシス、カベオラ依存性エンドサイトーシスによる選択的取込、マクロピノサイトーシスによる非選択的な取込がなされることが示唆された。また、Neu5Gc 単糖は、報告されているマクロピノサイトーシス、カベオラ依存性エンドサイトーシスに加え、トランスポーターによる取込が起こることが示唆された。これらの結果の比較から、KDN 単糖はクラスリン依存性エンドサイトーシスで取り込まれる独自の性質があることが示唆される。

また、取り込まれた KDN の代謝機構について解析を行った。KDN を代謝する酵素としてシアル酸ピルビン酸リアーゼ (SPL) が知られている。本研究室の小林隆史氏により、SPL は *in vitro* において KDN を Man とピルビン酸へ分解する活性、また、その逆反応である合成活性を持つことが示された (小林隆史, 2012)。しかし、細胞内における SPL の KDN に対する作用は明らかになっていない。また、哺乳類細胞は Man 含有培地で培養することで細胞内 KDN 量が増加することが知られている (Angata *et*

*al.*, 1999) 。しかし、増加した KDN がどのように代謝されていくかは不明である。そこで、SPL 発現が脆弱である B16 細胞に SPL 遺伝子を導入し、KDN 含有培地、または Man 含有培地によって増加した細胞内 KDN の代謝機構を解析した。その結果、B16 細胞は Man 添加により増加した細胞内 KDN は経時的に減少していく一方、KDN 添加により増加した細胞内 KDN は一定量が細胞内に残存した。その理由として、培地の KDN は多様なエンドサイトーシスによって取り込まれることから、細胞内 KDN の多くはエンドソーム、リソソームに存在しているからだと考えられる。しかし、SPL 導入細胞においては Man および KDN 添加により増加した細胞内 KDN 量は経時的に減少した。このことから、細胞内においても SPL による KDN の分解が行われることが示唆された。また、SPL はサイトゾルの KDN を分解することで、リソソーム内の KDN をサイトゾルへ輸送するのを促進していることが示唆される。リソソーム内にシアル酸が蓄積することで、個体レベルで精神発達遅延、運動失調といった重篤な症状を示すことから、SPL がリソソーム内のシアル酸量を制御することで毒性を回避していることが示唆される。また、B16 細胞を Man 添加培地で培養した後、通常培地に交換し、培地中の KDN 量を定量した。その結果、培地交換後 4 時間以内に KDN 量が急激に増加したことから、B16 細胞には KDN を細胞外へ排出する機構があることが示唆される。

以上のことから、B16 細胞には多様な取込経路で KDN を細胞内へと取り込まれ、取り込まれた後、SPL による分解を受けること、また、一部は細胞外へ排出する機構があることが示唆される。KDN の分解産物である Man とピルビン酸は糖鎖合成、ATP 合成に利用されるため、KDN は細胞にとって生存に有利な糖であると考えられ、医療分野への応用が期待される。本博士論文により、細胞における KDN の運命の一端が明らかにされたことで、今後の KDN の利用の拡大が期待される。