

**2P-257 *Microbacterium*属細菌由来  $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase の精製および性質解析**

○喜多山 諒<sup>1</sup>, 日下 大士<sup>1</sup>, 橋本 賢一<sup>1</sup>, 川崎 寿<sup>1</sup>, 鯉坂 勝美<sup>2</sup>, 中松 亘<sup>1</sup>, 夏目 亮<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>電機大院・工, <sup>2</sup>新潟薬大・応生命)  
 natsume@mail.dendai.ac.jp

【背景・目的】微生物由来  $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase を用いた O 型糖ペプチド合成法を確立し、ペプチド糖鎖の機能解析を行うことを目的としている。当該酵素を生産する微生物を自然界からスクリーニングしたところ、*Microbacterium*属細菌 No.703.1a 株を取得した。本研究では、当該酵素を精製してその性質を明らかにするとともに、ペプチドの Ser 側鎖への糖転移反応を解析する。

【方法・結果】mucin 含有固体培地を用いて単離した微生物群から endo- $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase 活性を有する微生物を取得した。それらを mucin 含有液体培地で培養し、培養液上清中の当該酵素活性を Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$ -O-pNP に対する加水分解能を指標として評価した。これまでに、高い活性を示す菌株 No.802.1d と No.703.1a を得ている。No.703.1a は mucin またはポリペプトンを C 源とする培地で培養した場合でも酵素活性が確認できた。No.703.1a の生産する酵素は、Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$ -O-pNP だけでなく GalNAc  $\alpha$ -O-pNP, GalNAc $\beta$ -O-pNP, GlcNAc $\beta$ -O-pNP に対しても加水分解活性を示した。No.703.1a の生産する酵素について精製を進めたが、Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$ -O-pNP に対して活性を示す当該酵素と他の基質に活性を示す酵素の分離が悪い問題があった。培養条件から再検討した結果、当該酵素の生産性ならびに酵素の精製効率を上昇させることができた。本発表では No.703.1a の生産する酵素の諸性質と糖ペプチド合成反応について報告する。

**Purification and characterization of  $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase derived from *Microbacterium* sp.**

○Ryo Kitayama<sup>1</sup>, Taishi Kusaka<sup>1</sup>, Kenichi Hashimoto<sup>1</sup>, Hisashi Kawasaki<sup>1</sup>, Ryo Natsume<sup>2</sup>, Katsumi Ajisaka<sup>1</sup>, Tsuyoshi Nakamatsu<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>Grad. Sch. Eng., Tokyo Denki Univ., <sup>2</sup>Fac. Appl. Life Sci., Niigata Univ. Pharm. Appl. Life Sci.)

**Key words** sugar chain, glycosylation

**2P-258 ダンベル型四価配糖体：ECA に対する高親和性糖鎖リガンドの分子設計**

○安本 佳成<sup>1</sup>, 尾形 慎<sup>2</sup>, 小野田 崇司<sup>2</sup>, 碓氷 泰市<sup>1</sup>, 朴 龍洙<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>静大院・農・応生化, <sup>2</sup>福島高専・物質工)  
 acypark@ipc.shizuoka.ac.jp

【背景・目的】近年、ウイルス感染などに関与するレクチンに対して架橋複合体を形成可能な糖鎖クラスター材料の開発が盛んに行われている。従来の糖鎖クラスター材料は糖鎖がレクチンとの結合に全て利用されるように設計されており、これにより架橋能の獲得と親和性の向上が図られている。しかし、このような設計は  $\Delta H$  の増大が見込まれる一方で、大きな  $\Delta S$  の損失も伴う。本研究では、 $\Delta S$  損失を抑えた新規糖鎖クラスター材料の開発を目的とした。【方法】始めに、アルキル鎖長の異なるジカルボン酸を骨格部に用いた 4 種類 *N*-アセチラクトサミン含有四価配糖体 (Tet-LN-DBGs) を合成した。続いて、デイゴマメレクチン (ECA) を標的タンパク質とし、各種相互作用解析を行った。【結果】定量沈降試験では、全ての Tet-LN-DBGs で架橋複合体の形成が確認された。また、結合親和性は赤血球凝集阻害試験法及び等温滴定カロリーメトリー (ITC) により評価した。赤血球凝集阻害試験では、アルキル鎖長が一番長い Tet-LN-DBG-C<sub>18</sub> が最大阻害活性 (IC<sub>50</sub> = 188 nM) を示した。ITC 分析においても Tet-LN-DBG-C<sub>18</sub> が最も強い親和性 ( $K_d$  = 2.4  $\mu$ M) を示した。具体的には、 $\Delta H$  が他の化合物より低いものの  $\Delta S$  損失が最も少ないという特徴を有していた。また、化学量論比より Tet-LN-DBGs と ECA との結合比は全て 1 対 2 であった。結果として、Tet-LN-DBGs の骨格部改変により、ECA との結合様式を変化させることなく  $\Delta S$  損失を軽減し結合親和性を向上させることに成功した。

**Dumbbell-type tetravalent glycosides: Molecular design for high-avidity carbohydrate ligand to bind to ECA lectin**

○Yoshinori Yasumoto<sup>1</sup>, Makoto Ogata<sup>2</sup>, Takashi Onoda<sup>2</sup>, Taichi Usui<sup>1</sup>, Enoch Y Park<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>Dept. Appl. Biol. Chem., Fac. Agric., Shizuoka Univ., <sup>2</sup>Dept. Chem. Biochem., FNCT)

**Key words** sugar chain, lectin