Large-scale Production of Oligosaccharides Using Bacterial Functions

微生物機能を利用したオリゴ糖の大量生産

Koizumi, Satoshi

Tokyo Research Laboratories, Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd., 3-6-6, Asahimachi, Machida, Tokyo 194-8533, Japan
FAX: 81-(0)3-3284-1839, E-mail: skoizumi@kyowa.co.jp

Key Words : *enzymatic synthesis, glycosyltransferase, oligosaccharide, genetic engineering*

Abstract

Oligosaccharides on the cell surface that play important roles in the biochemical recognition processes are potential pharmaceuticals. However it has been very difficult to synthesize these oligosaccharide structures. Recent identification of the genes for glycosyltransferases in bacteria and expression of the genes in *Escherichia coli* enabled the mass production of glycosyltransferases for enzymatic synthesis of oligosaccharides. Together with the improvements in the supply of sugar nucleotides, substrates of glycosyltransferases, using bacterial functions in genetically engineered bacteria, it became possible to produce a large amount of oligosaccharides.

要 約

細胞同士の認識過程などで重要な役割を果たしている細胞表面のオリゴ糖は医薬用途などへの応用が期待されている。しかし、このようなオリゴ糖の合成はこれまで非常に困難であった。近年、細菌に哺乳動物と同様な糖転移酵素が発見され、大腸菌での発現により酵素を大量に生産することができるようになってきている。また、糖転移酵素の基質である糖ヌクレオチドを遺伝子組換え手法を応用して効率的に供給する方法が開発されたことに伴って、様々なオリゴ糖が大量に合成できるようになってきている。

A. Introduction

Recent research has revealed that oligosaccharide structures on the cell surface possess important functions in the biochemical recognition processes (1, 2). Therefore the applications of oligosaccharides as pharmaceuticals in the fields of the prevention of infections by pathogens, neutralization of toxins, regulations of inflammation, and cancer immunotherapy have been widely recognized (2). However, it has been very difficult to synthesize oligosaccharides, and we can only obtain a limited amount of oligosaccharides produced by extraction or chemical synthesis.

A lot of chemical and enzymatic methods for the synthesis of oligosaccharides have been developed (3-5). Chemical synthesis of oligosaccharides requires multiple protection and deprotection steps, and this complexity does not render the chemical synthesis as realistic as an industrial method. On the other hand, enzymatic synthesis using glycosyltransferases of the Leloir pathway could circumvent the drawbacks of the chemical methods. Glycosyltransferases involved in the biosynthesis of such oligosaccharide structures showed highly stereo- and regiospecific bond formation, and almost no side products were formed during the reactions without protections.

Until recently the preparation of glycosyltransferases has been a big problem. However recent progress in genetic engineering has made several glycosyltransferases available in large

A. はじめに

細胞表面に存在するオリゴ糖は細胞同士の認識など重要な生理機能に深く関与していることが明らかになってきた(1,2)。そのため、これらのオリゴ糖は病原菌の感染防止、毒素の中和、炎症反応の制御、ガンの免疫療法などの分野での医薬品としての応用が精力的に検討されている(2)。しかしながら、生理活性オリゴ糖を大量に合成することは困難であり、細胞からの抽出や化学合成法により少量は製造されているが、非常に高価であり十分量のサンプルを確保することは難しいのが現状である。

これまでオリゴ糖の合成に関しては数多くの方法が開発されている(3-5)。しかし、化学合成法では多段階の保護・脱保護が必要であり、そのため工業的な生産方法にはなり得なかった。それに対して、糖転移酵素を用いた酵素合成法は化学合成法の欠点を克服することが可能である。生体内でオリゴ糖の合成に関与している糖転移酵素は、目的とする構造のオリゴ糖を高い立体・位置特異性をもって合成でき、保護基の導入なしでも目的とする生成物以外の副生物が生成しないという大きな長所がある。

最近まで糖転移酵素の調製は大きな問題であったが、いくつかの糖転移酵素は遺伝子組換え法により大量に供給できるよ

quantities. The other problem lay in the preparation of sugar nucleotides, substrates of glycosyltransferases. Although sugar nucleotides had been very expensive and not readily available, large-scale synthesis of sugar nucleotides could be possible by the use of bacterial activities.

This review focuses on the recent progress in the production of oligosaccharides using bacterial functions especially by genetically engineered bacteria.

B. Bacterial Glycosyltransferases

Many mammalian glycosyltransferases have been isolated and most of them were shown to be available for oligosaccharide synthesis. The substrate specificities against non-natural substrates were investigated, which made it possible to synthesize versatile oligosaccharide libraries on a preparative scale. However, most of the genes of mammalian glycosyltransferases were difficult to be expressed in *Escherichia coli* and that restricted the applications of glycosyltransferases for large-scale synthesis of oligosaccharides. Considering the expression of glycosyltransferase genes in *E. coli*, bacteria are supposed to be

うになった。もう一つの問題は、その基質として高価で入手が困難な糖ヌクレオチドを必要とすることであったが、細菌由来の活性を利用することにより、糖ヌクレオチドの大量合成も可能になっている。

本総説では、微生物由来の活性を利用することにより大量生産が可能となりつつあるオリゴ糖の生産について、最近の進展を紹介したい。

B. 細菌由来の糖転移酵素

オリゴ糖の生産に用いる糖転移酵素に関しては、これまでに哺乳類から多数の酵素が取得されており、これらの酵素が非天然の基質に対しても作用することを利用して、オリゴ糖ライブラリーも調製されている。ところが、大部分の哺乳類由来の糖転移酵素遺伝子は大腸菌などで活性型として発現させることが困難であるため、これらの酵素をオリゴ糖の大量合成に供するのは困難であった。大腸菌での発現を考えた場合には、細菌は魅力的な遺伝子源である。実際、細菌にも哺乳類に存在する

Table. Bacterial glycosyltransferase.

Enzyme	source	reference
GalT		
β1,4-galactosyltransferase	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> , <i>N. meningitidis</i>	6, 7, 8
β1,4-galactosyltransferase	<i>Helicobacter pylori</i>	9, 10
β1,4-galactosyltransferase	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	11
β1,4-galactosyltransferase	<i>Streptococcus agalactiae</i>	12
β1,3-galactosyltransferase	<i>Campylobacter jejuni</i>	13
β1,3-galactosyltransferase	<i>Streptococcus agalactiae</i>	14
α1,4-galactosyltransferase	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> , <i>N. meningitidis</i>	6, 7
GlcNAcT		
β1,3-GlcNAc transferase	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> , <i>N. meningitidis</i>	6, 7
β1,4-GlcNAc transferase	<i>Campylobacter jejuni</i>	13
GalNAcT		
β1,3-GalNAc transferase	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> , <i>N. meningitidis</i>	6, 7
β1,3-GalNAc transferase	<i>Campylobacter jejuni</i>	13
SiaT		
α2,3-sialyltransferase	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> , <i>N. meningitidis</i>	15
α2,3-sialyltransferase	<i>Campylobacter jejuni</i>	13
α2,3-sialyltransferase	<i>Haemophilus influenzae</i>	16, 17
α2,3-sialyltransferase	<i>Haemophilus ducrey</i>	18
α2,3-sialyltransferase	<i>Streptococcus agalactiae</i>	19
α2,3/8-sialyltransferase	<i>Campylobacter jejuni</i>	13
α2,6-sialyltransferase	<i>Photobacterium damsela</i>	20
α2,8/9-sialyltransferase	<i>Escherichia coli</i>	21
FucT		
α1,3-fucosyltransferase	<i>Helicobacter pylori</i>	22, 23
α1,2-fucosyltransferase	<i>Helicobacter pylori</i>	24
α1,3/4-fucosyltransferase	<i>Helicobacter pylori</i>	25

attractive sources for glycosyltransferase genes. In accordance with the continuous research for microbial genome analysis as well as the progress in screening and cloning techniques, various bacterial genes of glycosyltransferases have been cloned from mainly pathogenic bacteria and most of the genes could be expressed as soluble and active proteins in *E. coli*.

Examples of bacterial glycosyltransferases whose activities were detected in *E. coli* are shown in the Table. The genes of galactosyltransferase were cloned from *Neisseria gonorrhoeae* (6), *N. meningitidis* (7, 8), *Helicobacter pylori* (9, 10), *Streptococcus pneumoniae* (11), *S. agalactiae* (12) and *Campylobacter jejuni* (13). Galactosyltransferases of *N. gonorrhoeae* and *N. meningitidis* in particular, were highly expressed in *E. coli*, and utilized for the synthesis of oligosaccharides containing galactose. The genes of *N*-acetylglucosaminyl-transferases were also cloned from *N. gonorrhoeae* (6), *N. meningitidis* (7) and *C. jejuni* (13). The genes of sialyltransferase were cloned from *N. gonorrhoeae* (15), *N. meningitidis* (15), *C. jejuni* (13), *Photobacterium damsela* (20), and *E. coli* (21). The sialyltransferase from *C. jejuni* had a unique character that could transfer NeuAc to O-3 of Gal and O-8 of NeuAc that linked Gal with α 2, 3-linkage (13). Three sialyltransferases were identified in *Haemophilus influenzae* (16,17). Fucosyltransferases were cloned from *H. pylori* (22–25). A variety of glycosyltransferases will be cloned according to progress in the analysis of bacterial genomes.

In the α 2,3-sialyltransferase from *N. meningitidis*, substitution of the amino acids led to a novel enzyme that possessed both α 2,3-sialyltransferase and α 2,6-sialyltransferase activity (26).

C. Oligosaccharide Synthesis with Cofactor Regeneration

Oligosaccharides syntheses using bacterial glycosyltransferases have been intensively examined because the enzymes could be easily obtained through expression in *E. coli* (27–29). Glycosyltransferases from mammalian sources showed rigid substrate specificity, while bacterial glycosyltransferases showed broad specificity (29). Therefore, bacterial enzymes were widely used for the synthesis of carbohydrate derivatives.

Because UDP-glucose is a cheaper sugar nucleotide and easily available, oligosaccharide syntheses using a fusion enzyme composed of UDP-Gal 4'-epimerase and a galactosyltransferase from UDP-Glc have been examined (30–32).

For the preparation of oligosaccharides using glycosyltransferases, efficient enzymatic production systems were developed using *in situ* regeneration of sugar nucleotides with pyruvate kinase in order to escape from the product inhibition of the glycosyltransferases by the resulting nucleoside diphosphates or monophosphate (Fig. 1, 2) (33–35).

ようなオリゴ糖構造が存在することが明らかになり、効率的な遺伝子スクリーニング法の開発や細菌のゲノム解析の急速な進展に伴い、多くの糖転移酵素遺伝子が主に病原菌からクローニングされている。その多くは大腸菌で活性のある可溶性タンパク質として発現が可能であることが示されている。

これまでに取得された細菌由来の糖転移酵素を表に示す。*Neisseria gonorrhoeae* (6), *N. meningitidis* (7, 8), *Helicobacter pylori* (9, 10), *Streptococcus pneumoniae* (11), *S. agalactiae* (12), *Campylobacter jejuni* (13) などの細菌からガラクトース転移酵素遺伝子が取得されている。特に *Neisseria* 属細菌由来の酵素は大腸菌で大量発現され、ガラクトース含有オリゴ糖の合成に幅広く利用されている。また、*Neisseria* 属細菌 (6, 7) や *C. jejuni* (13) からは *N*-アセチルグルコサミン転移酵素遺伝子が取得されている。シアル酸転移酵素に関しては、*N. gonorrhoeae* (15), *N. meningitidis* (15), *C. jejuni* (13), *Photobacterium damsela* (20), *Escherichia coli* (21) などから遺伝子が取得されており、*C. jejuni* 由来の酵素においては、 α 2,3-シアル酸転移酵素活性とともに α 2,8-シアル酸転移酵素活性も併せ持つ α 2,3/8-シアル酸転移酵素の存在も明らかになっている (13)。また、*Haemophilus influenzae* においては 3 種類のシアル酸転移酵素遺伝子の存在が明らかになっている (16, 17)。また、*H. pylori* からはフコース転移酵素遺伝子が取得されている (22–25)。

今後、微生物のゲノム解析が進むに従って、ますます多くの多様性に富んだ糖転移酵素が取得されていくと考えられる。

一方、*N. meningitidis* の α 2,3-シアル酸転移酵素においては、アミノ酸置換により α 2,6-シアル酸転移酵素活性を併せ持つ酵素になることが示されており、立体構造や反応機構を解明するうえで興味深い (26)。

C. 糖ヌクレオチドの再生を伴うオリゴ糖合成

細菌由来の糖転移酵素遺伝子は大腸菌などでの発現が容易であることから、大腸菌で大量に発現させた酵素を用いたオリゴ糖の合成が盛んである (27–29)。哺乳類由来の糖転移酵素は基質特異性が非常に厳密であるため、酵素合成における応用範囲が限定されるのに対して、微生物由来の酵素は哺乳類由来の酵素に比べて基質特異性が広いため、各種誘導体の合成に広く用いられている (29)。

また、糖ヌクレオチドの中では比較的安価に入手できる UDP-グルコースを用いてガラクトース転移反応を行わせるため、UDP-Gal 4'-エピメラーゼとガラクトース転移酵素を融合させたタンパク質を造成し、この 1 種類の酵素を用いた酵素合成も行われている (30–32)。

糖転移酵素を用いた酵素合成においては、糖転移反応によって生じるヌクレオシド二リン酸 (NDP) または一リン酸 (NMP) が糖転移酵素の活性を阻害するため、この蓄積を回避しながら反応効率を上げることが重要である。そのため、NDP または NMP をピルビン酸キナーゼなどによりリン酸化してヌクレオシド三リン酸に変換し、糖ヌクレオチドを再生する効率的な方法が開発されている (図1, 2) (33–35)。

Moreover UDP-Gal recycling beads that were composed of four enzymes involved in the biosynthesis of UDP-Gal with His-tag were constructed (36).

For the synthesis of sialylated oligosaccharides, a fusion enzyme consisting of CMP-NeuAc synthetase and α 2,3-sialyltransferase was created (37). The fusion enzyme was more stable than the original enzyme and could be easily purified. 3'-sialyllactose that exists in human milk was synthesized on a scale of 100 g using the fusion enzyme (37).

Other than the recycling system using pyruvate kinase and phosphoenolpyruvate (PEP) (Fig. 1, 2), sugar nucleotide recycling systems using sucrose synthase (Fig. 3) (38, 39) or an inexpensive kinase system with polyphosphate kinase and polyphosphate were also developed (Fig. 4) (40)

Using bacterial glycosyltransferases that can be easily

さらに、UDP-ガラクトースの再生に必要となる4種類の酵素を His タグが付加した形で発現させることにより、UDP-ガラクトース再生ビーズとして回収することを可能にした方法も開発されている (36)。

また、CMP-シアル酸の生合成反応を触媒する CMP-シアル酸合成酵素と *Neisseria meningitidis* 由来の α 2,3-シアル酸転移酵素を融合させたタンパク質を創製することにより、酵素の安定性を向上させるとともに酵素精製操作を簡便にすることが可能になった。この2つの活性を有する酵素を利用して、母乳にも存在する3'-シアルラクトースを100 gスケールで合成することに成功している (37)。

糖ヌクレオチド再生においては、ピルビン酸キナーゼやホスホエノールピルビン酸 (PEP) を利用する方法 (図1,2) の他に sucrose synthase を利用する方法 (図3) (38,39) やポリリン酸キナーゼを用いる方法 (図4) (40) が開発されている。これらは安価で入手が容易なシュクロースやポリリン酸を用いることから、大量合成には適していると思われる。

このように大腸菌での発現により容易に入手できるように

Fig. 1. Synthesis of N-acetyllactosamine with UDP-Gal recycling (33). GalT, β 1,4-galactosyltransferase; PGM, phosphoglucomutase; PK, pyruvate kinase; UDPGE, UDP-Gal 4'-epimerase; UDPGP, UDP-Glc pyrophosphorylase; PEP, phosphoenolpyruvate.

Fig. 2. Synthesis of 6'-sialyllactose with CMP-NeuAc recycling (34). PK, pyruvate kinase; NMK, nucleoside monophosphate kinase; PEP, phosphoenolpyruvate.

obtained through the expression in *E. coli*, a large-scale synthesis of oligosaccharides can be carried out. However it might have a limitation because these methods require purified enzymes such as pyruvate kinase and expensive substrates such as PEP.

D. Production of Oligosaccharides by Bacterial Coupling

It was necessary to purify the enzymes for enzymatic synthesis of oligosaccharides. A novel production method using bacterial cells as enzyme sources that was free from enzyme purification was developed. In this system cells were permeabilized by the treatment with surfactants and used as enzyme bags. ATP that was necessary for the reaction was supplied from raw materials such as glucose.

For instance, UDP-Gal was efficiently produced by the combination of recombinant *E. coli* and *Corynebacterium ammoniagenes* (41). Recombinant *E. coli* overexpressed the UDP-Gal biosynthetic genes, and *C. ammoniagenes* contributed to the formation of UTP from orotic acid, an inexpensive precursor of UTP. 44 g/l of UDP-Gal accumulated after a 21 h reaction starting with orotic acid and galactose (41).

By coupling the recombinant *E. coli* overexpressing the

なった細菌由来の糖転移酵素を用いて、従来では考えられなかったオリゴ糖の大量合成が可能になっている。しかしながら、これらの方法では糖ヌクレオチドを再利用する際にピルビン酸キナーゼなどの酵素や PEP などの基質を必要とすることから大量合成には限界があると予想される。

D. 微生物共役によるオリゴ糖の生産

酵素を用いたオリゴ糖の合成においては、必要となる酵素を単離精製して用いる必要があった。そこで、煩雑な精製操作を必要としないで大量生産を可能とする方法として、細菌の菌体そのものを酵素の袋として利用する生産方法が開発された。この生産系は界面活性剤処理などにより、原料や生産物の膜透過性を付与した休止菌体を酵素源として、反応に必要な ATP などはグルコースなどの糖から供給するという特徴を有している。

例えば、ガラクトース転移酵素の基質となる UDP-ガラクトースの生合成に関与する酵素を発現する組換え大腸菌とヌクレオシド 5'-三リン酸の生産能が高い *Corynebacterium ammoniagenes* という細菌を酵素源として用い、ガラクトースと安価な核酸源であるオロト酸を主原料とした UDP-ガラクトースの生産系が構築され、21 時間で 44 g/l の UDP-ガラクトースの蓄積が認められている (41)。

この UDP-ガラクトース生産系に *N. gonorrhoeae* 由来の α 1,4-

Fig. 3. Oligosaccharide synthesis with sugar nucleotide recycling by sucrose synthase.

Fig. 4. Oligosaccharide synthesis with sugar nucleotide recycling by polyphosphate kinase.

α 1,4-galactosyltransferase gene from *N. gonorrhoeae* and the UDP-Gal production system, 188 g/l of globotriose (Gal α 1-4Gal β 1-4Glc), an oligosaccharide portion of the receptor of vero toxin produced by *E. coli* O157 accumulated for 36 h from orotic acid, galactose and lactose (Fig. 5) (41). When *E. coli* cells overexpressing β 1,4-galactosyltransferase gene of *H. pylori* were introduced to the above system, 60 g/l of N-acetylactosamine (Gal β 1-4GlcNAc) accumulated after 20 h (42).

Similarly, 17 g/l of CMP-NeuAc was produced after a 27 h reaction starting with orotic acid and NeuAc through the coupling of recombinant *E. coli* cells overexpressing the genes

ガラクトース転移酵素遺伝子を発現する大腸菌を組み込むことにより、病原性大腸菌 O-157 が生産するペロ毒素が認識するオリゴ糖構造であるグロボトリオース (Gal α 1-4Gal β 1-4Glc) を 36 時間で 188 g/l 蓄積させることができています (図5) (41)。この生産系において *H. pylori* 由来の β 1,4-ガラクトース転移酵素を用いた場合には、N-アセチルラクタサミン (Gal β 1-4GlcNAc) を 20 時間で 60 g/l 生成させることも可能であった (42)。

同様に、CMP-シアル酸の生合成に関する CMP-シアル酸合成酵素および CTP 合成酵素を発現する組換え大腸菌と *C. ammoniagenes* を酵素源として用い、オロット酸、N-アセチルノ

Fig. 5. Production of globotriose by bacterial coupling (41). galK, galactokinase; galT, Gal-1-P uridyltransferase; galU, UDP-Glc pyrophosphorylase; ppa, pyrophosphatase; lgtC, α 1,4-galactosyltransferase.

Fig. 6. Production of 3'-sialyllactose by bacterial coupling (43).

of CMP-NeuAc synthetase and CTP synthetase, and *C. ammoniagenes* (43). By the combination of CMP-NeuAc production system and *E. coli* overexpressing the α 2,3-sialyltransferase of *N. gonorrhoeae*, 33 g/l of 3'-sialyllactose was produced after 11 h starting with orotic acid, NeuAc, and lactose (Fig. 6) (43). In the same manner, 45 g/l of sialylTn oligosaccharide (NeuAc α 2-6GalNAc), one of the cancer associated antigens, accumulated in 25 h using the α 2,6-sialyltransferase of *P. damsela* (44).

By the combination of *E. coli* expressing the genes involved in the biosynthesis of GDP-Fuc and *C. ammoniagenes*, 18.4 g/l of GDP-Fuc was formed in 22 h from GMP and mannose (45). When *E. coli* cells overexpressing α 1,3-fucosyltransferase gene of *H. pylori* were introduced to the GDP-Fuc production system, 21 g/l of Lewis X (Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc) accumulated after 30 h (45).

By the coupling of the sugar nucleotide production system with a bacterial glycosyltransferase, an oligosaccharide production system that could be applied to industrial manufacture was successfully constructed. Oligosaccharide production by bacterial coupling is shown to be suitable for large-scale manufacture although it might be difficult to isolate the product from the reaction mixture.

E. Oligosaccharide Production by Fermentation

An alternative way to produce oligosaccharides is *in vivo* production in recombinant *E. coli* expressing glycosyltransferases. In this fermentation procedure, oligosaccharides could be produced extracellularly and intracellularly during cell growth using the machinery for sugar nucleotide synthesis in the cells.

When *E. coli* cells lacking the ability to degrade lactose and expressing β 1,3-GlcNAc transferase and β 1,4-Gal transferase of *N. meningitidis* were cultivated at a high density using glycerol as a carbon source, lacto-*N*-neotetraose (Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc) and lacto-*N*-neohexaose (Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc) accumulated a total of more than 5 g/l for 35 h (Fig. 7) (46). In addition, oligosaccharides containing fucose were formed by improvements in the biosynthesis of GDP-Fuc and the introduction of fucosyltransferase of *H. pylori* (47).

In a similar way, *E. coli* strain that was devoid of NeuAc aldolase and β -galactosidase activities and overexpressed the α 2,3-sialyltransferase and CMP-NeuAc synthetase of *N. meningitidis* efficiently produced 3'-sialyllactose, intracellularly 1.1 g/l, extracellularly 1.5 g/l (Fig. 8) (46).

In these cases oligosaccharides were produced inside the cells as well as in the culture broth, therefore isolations of oligosaccharides might be relatively complicated.

イラミン酸を主原料にして、27 時間で 17 g/l の CMP-シアル酸が蓄積した(43)。CMP-シアル酸生産系に *N. gonorrhoeae* 由来の α 2,3-シアル酸転移酵素遺伝子を発現する大腸菌を組み込むことにより、3'-シアルラクトース (NeuAc α 2-3Gal β 1-4Glc) を 11 時間で 33 g/l 蓄積させることができています (図6) (43)。また、*P. damsela* 由来の α 2,6-シアル酸転移酵素を用いることにより、ガン抗原として知られている sialyl-Tn オリゴ糖 (NeuAc α 2-6GalNAc) を 25 時間で 45 g/l 生成することも可能となった (44)。

さらに、GDP-フコース生合成に関与する遺伝子を高発現する組換え大腸菌と *C. ammoniagenes* との組み合わせにより、GMP とマンノースを主原料にして、22 時間で 18.4 g/l の GDP-フコースが蓄積した(45)。GDP-フコースの生産系に *H. pylori* 由来のフコース転移酵素遺伝子を発現する大腸菌を組み込むことにより、30 時間で 21 g/l のルイス X (Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc)を蓄積させることができています(45)。

微生物による糖ヌクレオチド生産系に微生物由来の糖転移酵素を組み合わせることにより、工業的なオリゴ糖の生産系が構築された。この方法は、細菌の菌体を利用していることから、生成したオリゴ糖を反応液から回収する点に課題が残るが、スケールアップが容易であり大量生産には適している方法であると考えられる。

E. 発酵法によるオリゴ糖の生産

糖転移酵素遺伝子を発現する組換え大腸菌を用いた発酵法によるオリゴ糖の生産法も開発されている。この方法は、細菌が有する糖ヌクレオチド生合成能を利用し、微生物の増殖を伴ってオリゴ糖を培地中または菌体内に蓄積させる方法であり、単に微生物を培地中に培養するだけで目的とするオリゴ糖を生産することが可能である。

例えば、ラクトースの分解活性を欠損させた大腸菌(ラクトースの取り込み能を有する)に、*N. meningitidis* 由来の β 1,3-GlcNAc 転移酵素および β 1,4-ガラクトース転移酵素遺伝子を発現するプラスミドを導入した菌株を造成し、炭素源としてグリセロールを用いて高密度に培養することにより、35 時間でラクト-*N*-ネオテトラオース (Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc) とラクト-*N*-ネオヘキサオース (Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc) を合計で 5 g/l 以上蓄積させることができています (図7) (46)。さらに、GDP-フコース生合成系の改良と *H. pylori* 由来のフコース転移酵素遺伝子を導入することにより、フコースを含有するオリゴ糖の蓄積も認められている(47)。

また、ラクトースおよび*N*-アセチルノイラミン酸の分解活性を欠損させた大腸菌(ラクトースおよび*N*-アセチルノイラミン酸の取り込み能を有する)に、CMP-シアル酸合成酵素およびシアル酸転移酵素遺伝子を発現するプラスミドを導入した菌株を用いることにより、22 時間で菌体内に 1.1 g/l、菌体外に 1.5 g/l の 3'-シアルラクトースを蓄積させることにも成功している (図8) (46)。

この生産方法においては、生産されたオリゴ糖が菌体内にも蓄積するため、オリゴ糖を精製する際に菌体破碎の必要性があるなど操作が煩雑であるかもしれない。

Fig. 7. LNNt production by fermentation (46). LacY, lactose permease; LacZ, β -galactosidase; LgtA, β 1,3-GlcNAc transferase; LgtB, β 1,4-galactosyltransferase.

Fig. 8. 3'-sialyllactose production by fermentation (46). LacY, lactose permease; NanT, N-acetylneuraminic acid permease; closed circle, intracellular concentration; open circle, extracellular concentration.

F. Future Perspective

Large-scale production of oligosaccharides became possible by the use of bacterial glycosyltransferases and improvements in the supply of sugar nucleotides. Especially whole-cell approaches for the production of oligosaccharides are attractive methods with high yields, time- and cost- effectiveness, and simple operations. Glycobiology research would be facilitated if a large amount of carbohydrates could be supplied at a lower cost.

F. 今後の展望

ここで示したように、微生物由来の糖転移酵素や糖ヌクレオチド生合成の活性を利用することにより、従来困難であったオリゴ糖の大量合成が可能になりつつある。特に微生物の菌体そのものを利用する方法は、原料供給の問題がないことやスケールアップも容易であることから、大量合成という意味では最も有望な生産方法であると考えられる。これらの方法で生理活性をもつオリゴ糖が安価に大量に供給されることにより、多くの糖鎖の機能が解明され、糖鎖生物学がますます発展することが期待される。

References

- Gagneux, P. and Valki, A. (1999) *Glycobiology* **9**, 747–755
- McAuliffe, J.C. and Hindsgaul, O. (2000) In: *Molecular and Cellular Glycobiology* (Fukuda, M. and Hindsgaul, O. eds.) pp. 249–285, Oxford University Press, New York
- Flowers, H.M. (1978) *Methods Enzymol.* **50**, 93–121
- Palcic, M.M. (1999) *Curr. Opin. Biotechnol.* **10**, 616–624
- Vic, G. and Crout, D.H.G. (1998) *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2**, 98–111
- Gotschlich, E.C. (1994) *J. Exp. Med.* **180**, 2181–2190
- Jennings, M.P., Hood, D.W., Peak, I.R.A., Virji, M., and Moxon, E.R. (1995) *Mol. Microbiol.* **18**, 729–740
- Wakarchuk, W.W., Martin, A., Jennings, M.P., Moxon, E.R., and Richards, J.C. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 19166–19173
- Logan, S.M., Conlan, J.W., Monteiro, M.A., Wakarchuk W.W., and Altman, E. (2000) *Mol. Microbiol.* **35**, 1156–1167
- Endo, T., Koizumi, S., Tabata, K., and Ozaki, A. (2000) *Glycobiology* **10**, 809–813
- Kolkman, M.A.B., Wakarchuk, W.W., Nuijten, P.J.M., and van der Zeijst, B.A.M. (1997) *Mol. Microbiol.* **26**, 197–208
- Yamamoto, S., Miyake, K., Koike, Y., Watanabe, M., Machida, Y., Ohta, M., and Iijima, S. (2000) *J. Bacteriol.* **181**, 5176–5184
- Gilbert, M., Brisson, J.R., Karwaski, M.F., Michniewicz, J., Cunningham, A.M., Wu, Y., Young, M., and Wakarchuk, W.W. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 3896–3906
- Watanabe, M., Miyake, K., Yanae K., Kataoka, Y., Koizumi, S., Endo, T., Ozaki, A., and Iijima, S. (2002) *J. Biochem.* **131**, 183–191
- Gilbert, M., Watson, D.C., Cunningham, A.M., Jennings, M.P., Young, N.M., and Wakarchuk, W.W. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 28271–28276
- Hood, D.W., Cox, A.D., Gilbert, M., Makepeace, K., Walsh, S., Deadman, M.E., Cody, A., Martin, A., Mansson, M., Schweda, E.K.H., Brisson, J.-R., Richards, J.C., Moxon, E.R., and Wakarchuk, W.W. (2001) *Mol. Microbiol.* **39**, 341–350
- Jones, P.A., Samuels, N.M., Phillips, N.J., Munson, R.S. Jr., Bozue, J.A., Arseneau, J.A., Nichols, W.A., Zaleski, A., Gibson, B. W., and Apicella, M.A. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 14598–14611
- Bozue, J.A., Tullius, M.V., Wang, J., Gibson, B.W., and Munson, R.S. Jr. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 4106–4114
- Chaffin, D.O., McKinnon, K., and Rubens, C.E. (1996) *Mol. Microbiol.* **45**, 109–122
- Yamamoto, T., Nakashizuka, M., and Terada, I. (1998) *J. Biochem.* **123**, 94–100
- Shen, G.J., Datta, A.K., Izumi, M., Koeller, K.M., and Wong, C.-H. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 35139–35146
- Martin, S.L., Edbrook, M.R., Hodgman, T.C., van den Eijnden, D.H., and Bird, M.I. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 21349–21356
- Ge, Z., Chan, N.W.C., Palcic, M.M., and Taylor, D.E. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 21357–21363
- Wang, G., Boulton, P.G., Chan, N.W.C., Palcic, M.M., and Taylor, D.E. (1999) *Microbiol.* **145**, 3245–3253
- Rasko, D.A., Wang, G., Palcic, M.M., and Taylor, D.E. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 4988–4994
- Wakarchuk, W.W., Watson, D., Michael, F.St., Li, J., Wu, Y., Brisson, J.-R., Young, N.M., and Gilbert, M. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 12785–12790
- Blixt, O., van Die, I., Norberg, T., and van den Eijnden, D.H. (1999) *Glycobiology* **9**, 1061–1071
- Johnson, K.F. (1999) *Glycoconj. J.* **16**, 141–146
- Izumi, M., Shen, G.-J., Wacowich-Sgarbi, Nakatani, T., Plettenburg, O., and Wong, C.-H. (2001) *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 10909–10918
- Fang, J., Chen, X., Zhang, W., Janczuk, A., and Wang, P.G. (2000) *Carbohydr. Res.* **329**, 873–878
- Yan, F., Wakarchuk, W.W., Gilbert, M., Richards, J.C., and Whitfield, D.M. (2000) *Carbohydr. Res.* **328**, 3–16
- Blixt, O., Brown, J., Schur, M.J., Wakarchuk, W.W., and Paulson, J.C. (2001) *J. Org. Chem.* **66**, 2442–2448
- Wong, C.-H., Haynie, S.L., and Whitesides, G.M. (1982) *J. Org. Chem.* **47**, 5416–5418
- Ichikawa, Y., Shen, G.-J., and Wong, C.-H. (1991) *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 4698–4700
- Ichikawa, Y., Look, G.C., and Wong, C.-H. (1992) *Anal. Biochem.* **202**, 215–238
- Chen, X., Fang, J., Zhang, J., Liu, Z., Shao, J., Kowal, P., Andreana, P. and Wang, P.G. (2001) *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 2081–2082
- Gilbert, M., Cunningham, A.M., DeFrees, S., Gao, Y., Watson, D.C., Young, N.M., and Wakarchuk, W.W. (1998) *Nat. Biotechnol.* **16**, 769–772
- Hokke, C.H., Zervosen, A., Elling, L., Joziase, D.H., and van den Eijnden. (1996) *Glycoconj. J.* **13**, 687–692
- Chen, X., Zhang, J., Kowal, P., Liu, Z., Andeana, P.R., Lu, Y., and Wang, P.G. (2001) *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 8866–8867
- Noguchi, T. and Shiba, T. (1998) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62**, 1594–1596
- Koizumi, S., Endo, T., Tabata, K., and Ozaki, A. (1998) *Nat. Biotechnol.* **16**, 847–850
- Endo, T., Koizumi, S., Tabata, K., and Ozaki, A. (1999) *Carbohydr. Res.* **316**, 179–183
- Endo, T., Koizumi, S., Tabata, K., and Ozaki, A. (2000) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **53**, 257–261
- Endo, T., Koizumi, S., Tabata, K., and Ozaki, A. (2001) *Carbohydr. Res.* **330**, 439–443
- Koizumi, S., Endo, T., Tabata, K., Nagano, H., Ohnishi, J., and Ozaki, A. (2000) *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **25**, 213–217
- Priem, B., Gilbert, M., Wakarchuk, W.W., Heyraud, and Samain, E. (2002) *Glycobiology* **12**, 235–240
- Dumon, C., Priem, B., Martin, S.L., Heyraud, A., Bosso, C., and Samain, E. (2001) *Glycoconj. J.* **18**, 465–474

Received on February 5, 2003, accepted on February 28, 2003

Profile of the Author

Satoshi Koizumi was born in Tokyo in 1960. He graduated from Tokyo University, School of Agriculture in 1984, and he received his master degree in 1986 from Tokyo University, Graduate school of Agricultural Chemistry. He obtained his Ph.D degree in 2001 from Tokyo University, Graduate school of Agricultural and Life Sciences. He has been working for Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd. at Tokyo Research Laboratories since 1986. He is a senior research scientist at Tokyo Research Laboratories. His research interests focus on the microbial production of useful compounds such as amino acids, nucleotides and oligosaccharides.