

(論文内容の要旨)

糖鎖は主要な翻訳後修飾の一つであり、発生、分化、病態形成など様々な生物現象に関与することが明らかになっている。個々の糖鎖は、糖転移酵素と呼ばれる一群の酵素により生合成される。しかし近年、糖鎖の発現が糖転移酵素の発現量に単純に依存せず、様々な因子により調節されることが分かってきた。神経系に高発現し、シナプス可塑性や空間認識に重要な役割を果たす HNK-1 (human natural killer-1) 糖鎖に着目した本研究は、その生合成の律速段階を担うグルクロン酸転移酵素 (GlcAT-P、GlcAT-S) を中心とした HNK-1 糖鎖の発現調節機構の解明を目的として遂行された。以下に得られた知見について記す。

第一章 転移酵素群による HNK-1 糖鎖発現調節

HNK-1 糖鎖は、一般的な複合型糖鎖に共通して見られる N-アセチルラクトサミン構造 (Gal β 1-4GlcNAc-) の末端に、硫酸化グルクロン酸を持った特徴的な構造を有する (HSO₃-3GlcA β 1-3Gal β 1-4GlcNAc-)。グルクロン酸の転移は GlcAT-P あるいは GlcAT-S によって、また硫酸基の転移は HNK-1ST によって触媒される。これまでの構造研究により本糖鎖構造が決定されたが、その一方で脳において硫酸化されていない糖鎖の報告はない。これらの事実は、グルクロン酸転移酵素と硫酸基転移酵素が複合体を形成することにより、効率的な生合成を行っている可能性を示すものである。そこで、動物細胞株に両転移酵素を発現させ、共免疫沈降法によりその可能性を検証した結果、両酵素が相互作用することが示された。また、その相互作用が C 末端の触媒領域を介すること、また複合体形成により HNK-1ST の比活性が上昇することを明らかにした。

また、GlcAT-P の基質となる N-アセチルラクトサミン構造は、B4GalT と呼ばれるガラクトース転移酵素により合成される。B4GalT は哺乳類では七種類存在するが、生体内における機能分担は不明である。その中の B4GalT1 と B4GalT2 の遺伝子欠損マウスの脳を解析した結果、B4GalT2 欠損マウスにおいてほぼ全ての HNK-1 糖鎖の特異的な消失が認められた。さらに、細胞株を用いた実験より、GlcAT-P と B4GalT2 との相互作用が確認された。以上の結果は、HNK-1 糖鎖が幾つかの転移酵素群からなる複合体により生合成される可能性を示している。

第二章 N 末端細胞質領域による GlcAT-P の局在制御と細胞内における活性調節

ほとんどの糖転移酵素はゴルジ体に局在する一回膜貫通型の II 型タンパク質で、N 末端に短い細胞質領域を持つ。近年、糖転移酵素の細胞質領域が酵素の局在に重要であることが示され始め、その役割の重要性が認識されつつある。GlcAT-P には、選択的スプライシングにより細胞質領域の長さが 13 アミノ酸異なる二種のアイソフォーム (short form, long form) が存在するが、その役割は不明であった。そこで、この二種のアイソフォームの機能分担の解明を目的に実験を行った。二種のアイソフォームを発現させると、それらの比活性は同等であるにも関わらず、short form は long form よりもはるかに多くの HNK-1 糖鎖を細胞内で生合成していた。また、short form がゴルジ体に強く集積する一方、long form はゴルジ体と一部 ER にも局在していた。ER には GlcAT-P の基質となる N-アセチルラクトサミンを持った糖鎖が存在せず、本酵素はゴルジ体に局在して初めて機能を発揮でき

る。さらに、short form は long form に比べ、COPII 輸送小胞の形成に必須な Sar1 とより強く相互作用していた。このことから、GlcAT-P の細胞質領域の違いにより ER からゴルジ体への輸送速度が調節されていると考えられた。以上の結果は、GlcAT-P の局在における細胞質領域の重要性と、その長さの異なるアイソフォームによる HNK-1 糖鎖生合成調節機構の存在を示している。

第三章 GlcAT-P の酵素活性における flexible loop の役割

以前の研究により、GlcAT-P の触媒領域の X 線結晶構造解析がなされ、その触媒メカニズムが明らかにされた。ところが、GlcAT-P には結晶構造中で電子密度の見られない領域 (flexible loop) が触媒ポケットの近傍に存在していた。そこで、この構造未知の loop の機能解明を目的に研究を行った。loop を欠失させた変異酵素を細胞株に発現させたところ、その酵素活性は著しく減少していた。一方で、局在やプロセッシング、二量体形成など、GlcAT-P に見られる性質は野生型酵素とほぼ同じであった。さらに、触媒反応における供与基質である UDP-GlcA と受容基質である N-アセチルラクトサミンとの結合にも loop の欠失は影響を与えなかった。また、loop の一部に変異を導入して解析した結果、loop 内に存在する酸性アミノ酸が本酵素の活性発現に重要な役割を果たしていることが明らかになった。以上の結果は、GlcAT-P に存在する flexible loop が本酵素の活性発現に必須の役割を果たすことを示している。

以上、本研究はグルクロン酸転移酵素の活性とその生成物である HNK-1 糖鎖の発現が様々な因子により制御されることを示すものであり、糖鎖一般の生合成機構を理解する上で重要な知見である。

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、神経系に高発現する HNK-1 糖鎖の新たな発現制御機構を明らかにしたものである。近年、糖鎖生合成の異常が様々な疾患を引き起こすことや、糖タンパク質性医薬品の体内動態に糖鎖が大きな影響を与えることが示され、糖鎖の発現制御機構の理解は、基礎科学の進展のみならず医薬分野への応用面においてもその重要性が増していると考えられる。本論文は、神経系に特徴的に発現し、シナプス可塑性に重要な役割を果たす HNK-1 糖鎖に着目し、その生合成機構に関する研究成果を記したものである。

第一章は、HNK-1 糖鎖の生合成を担う B4GalT2, GlcAT-P, HNK-1ST の三種の転移酵素が細胞内で複合体を形成することを示したものである。この酵素複合体による糖鎖生合成機構の発見は、生体内で限られた糖タンパク質にのみ HNK-1 糖鎖が発現することの基盤となっている可能性がある。また、基質特異性が類似した七種の B4GalT 分子のうち B4GalT2 が主に HNK-1 糖鎖の生合成を担うという知見は、これまで不明であった糖転移酵素ファミリー分子間の生体内での機能分担の一端を明らかにしたものである。これらの結果は、HNK-1 糖鎖のみならず、その他の糖鎖の生合成も様々な転移酵素複合体により行われることを示唆しており、糖鎖一般の生合成機構を解明する上においても重要な知見であると考えられる。

第二章は、選択的スプライシングにより生じる GlcAT-P の二種のアイソフォームが細胞内で異なる生合成活性を有するメカニズムに関して記したものである。GlcAT-P はスプライシングにより細胞質領域の長さが異なる二種のタンパク質として翻訳されるが、その二種の機能の差についての知見はなかった。本論文では、この二種のアイソフォームの生合成活性が異なること、またその背景として、Sar1 を介する本酵素のゴルジ体への輸送速度に差があることを明らかにした。糖転移酵素の細胞質領域が酵素の局在に重要であることを示す報告は多いが、本論文のように細胞質領域のアミノ酸が細胞内での最終的な酵素活性の発揮にどのような影響を及ぼすかについての報告はほとんどなかった。本論文で示された知見は、鎖長の異なる細胞質領域により糖転移活性が調節され、生体内で最終的に生合成される糖鎖の発現量が制御されうることを初めて示したものである。

第三章は、構造・機能が未知の flexible loop が GlcAT-P の触媒活性に必須であること

を示したものである。以前行われた結晶構造解析により GlcAT-P には固定した構造をとらない領域が存在することが示され、その領域の持つ機能は不明であった。一般的に糖転移酵素は同様の flexible loop を持つことが知られており、基質との結合に重要な役割を果たすと考えられている。本論文は、GlcAT-P の flexible loop が本酵素の活性に必須であること、さらに flexible loop が基質との結合に関与しないことを示した。これらの知見は、flexible loop の機能として従来考えられていた定説を覆すものであり、各転移酵素の flexible loop がそれぞれ異なる役割を果たす可能性を示唆するものである。

以上、本論文は、HNK-1 糖鎖の新たな生合成調節機構を示し、糖鎖一般の生合成機構を理解する上で重要な知見を与えるものであると考えられる。

よって本論文は博士（薬学）の学位論文として価値あるものと認める。

さらに、平成21年 1月21日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。