

氏 名	か 角 た しな こ 田 品 子
学 位 の 種 類	博 士 (薬 学)
学 位 記 番 号	薬 博 第 538 号
学 位 授 与 の 日 付	平 成 16 年 3 月 23 日
学 位 授 与 の 要 件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研 究 科 ・ 専 攻	薬 学 研 究 科 生 命 薬 科 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	HNK-1糖鎖生合成に関わる2種のグルクロン酸転移酵素の基質認識に 関する生化学的、構造生物学的な研究

論文調査委員 (主 査) 教 授 川 岸 敏 祐 教 授 伊 藤 信 行 教 授 中 山 和 久

論 文 内 容 の 要 旨

タンパク質への糖鎖付加はその機能発現に極めて重要である。HNK-1糖鎖はN-アセチラクトサミン構造の非還元末端に3位が硫酸化されたグルクロン酸が結合した特徴的な構造を持っている。本糖鎖は神経系に存在する細胞接着分子、糖脂質、マトリックス分子などに特異的に発現していることから神経系における機能が注目されている。申請者の所属する研究室では、本糖鎖の生合成に関わるグルクロン酸転移酵素GlcAT-Pの精製及びcDNAクローニングに成功し、その後GlcAT-PのcDNAをプローブとして、第二のグルクロン酸転移酵素GlcAT-Sのクローニングにも成功している。本研究ではHNK-1糖鎖生合成に関わる2種のグルクロン酸転移酵素の基質認識機構について生化学的、構造生物学的手法を用いて解析を行った。

第一章 GlcAT-PとGlcAT-Sの酵素学的性質の比較

Type II 膜貫通タンパク質であるGlcAT-PとGlcAT-SのN-末端側（細胞内側）と膜貫通領域をプロテインAタンパク質のIgG結合ドメインに置換した分泌型protA-GlcAT-PとprotA-GlcAT-SをCOS-1細胞に発現させた。両酵素とも糖タンパク質性基質（アシアロオロソムコイド）と糖脂質性基質（パラグロボシド）に転移活性を有していた。GlcAT-Pの糖タンパク質に対する転移活性はスフィゴエミリンの存在下では比活性が約5倍上昇するのに対しGlcAT-Sはほとんど影響を受けなかった。一方、糖脂質に対する転移活性は両酵素ともリン脂質ホスファチジルイノシトールが必要であることが明らかとなった。種々のオリゴ糖を用いて両酵素の糖受容体特異性について調べた結果、GlcAT-Pは受容体基質の非還元末端に存在するN-アセチラクトサミン（Gal β 1-4GlcNAc）構造を特異的に認識するのに対し、GlcAT-SはGal β 1-4GlcNAcのほかGal β 1-3GlcNAc、Gal β 1-4GlcGlcに対しても転移活性を示した。また種々の複合型N-グリコシド型糖鎖に対する転移活性はGlcAT-Pは非還元末端に存在するN-アセチラクトサミンの数に比例した転移活性を示すのに対し、GlcAT-Sは三本鎖の複合型N-グリコシド型糖鎖に対してより高い基質特異性を示すことが明らかになった。

第二章 大腸菌を用いた2種のグルクロン酸転移酵素の大量発現と精製

これらの酵素の基質認識機構をX線結晶解析を用いて詳細に解析するため、両酵素のN末端から膜貫通領域までをFlagタグと結合した融合タンパク質を大腸菌で大量発現した。Flag-GlcAT-PはHeparinカラム及び受容体基質であるアシアロオロソムコイドを固定化したカラムにより均一に精製した。Flag-GlcAT-SはHeparinカラム及びCu²⁺イオンキレートカラムにより均一に精製した。5L培地で培養した大腸菌から精製Flag-GlcAT-Pは15mg、Flag-GlcAT-Sは6mgが得られた。両酵素はいずれも糖タンパク質性及び糖脂質性基質に対して高い転移活性を示し、Flag-GlcAT-Pはラット脳から精製したGlcAT-Pとはほぼ同程度の比活性を示した。また、表面プラズモン共鳴法を用いて解析した結果、糖タンパク質性基質（ASOR）に対しても、細胞接着分子NCAMに対してもGlcAT-PはGlcAT-Sより10倍ほど高い親和性を持つことが分かった。これらの酵素について様々な条件下で結晶化を検討したが両酵素とも良い結晶が得られなかった。そこで次に、膜貫通領域近傍のプロリンを多く含む領域を除き、タグを持たない触媒ドメインだけのGlcAT-PとGlcAT-Sを大腸菌に発現させ、

同様の方法を用いて精製し、再び結晶化を行った結果GlcAT-Pの結晶化に成功した。

第三章 GlcAT-Pの結晶構造に基づいた基質認識機構の解析

GlcAT-Pのアポ酵素、酵素とUDP（供与体）、 Mn^{2+} の複合体及びN-アセチラクトサミン（受容体）との複合体について約1.9Å分解能のX線結晶構造解析を行った。酵素は2量体を形成し、それぞれの単量体は、N末側の α/β Rossmann-like fold からなる供与体基質結合ドメインと、C末側の2つの β シートからなる受容体基質結合ドメインより成ることが明らかになった。GlcAT-Pの8つのアミノ酸残基がUDPと水素結合を形成すること及びTyr93がUridine環と相互作用をしていることが示された。Asp197、UDP及び2つの水分子が Mn^{2+} を中心として八面体の配位を取っていることが明らかとなった。酵素がUDP-GlcAと結合すると3つ塩基性アミノ酸残基、Lys153、Arg165、Arg313、のコンフォメーション変化によりGlcAT-P分子表面の電子分布が顕著に変わることが明らかになった。一方、受容体基質であるN-アセチラクトサミンとの結合については5つのアミノ酸残基とGalが4つのアミノ酸残基とGlcNAc環とが平行のコンフォメーションを取るにより強く作用すること、また二量体中の隣分子のAsn321がGlcNAcのアセチル基と相互作用することも明らかになった。これらによってGlcAT-Pが受容体性質の分子識別を行っているものと考えられる。

以上、本研究はHNK-1糖鎖生合成に関わる2種のグルクロン酸転移酵素の基質特異性の解明および糖転移酵素一般の基質認識機構の分子レベルにおける理解に有用な知見を得たものである。

論文審査の結果の要旨

神経系の回路形成や脳高次機能の調節には様々な糖タンパク質が関与している。このうち、HNK-1糖鎖はN-アセチラクトサミン構造の非還元末端に3位が硫酸化されたグルクロン酸が結合した特徴的な構造を持ち、神経系細胞接着分子、糖脂質、マトリックス分子などに発現しており、その働きが注目されている。HNK-1糖鎖の生合成には、神経系に特異的に発現する2種のグルクロン酸転移酵素、GlcAT-PとGlcAT-Sが律速酵素として関与していることが知られている。

申請者は、GlcAT-PとGlcAT-Sを遺伝子組換え体として調製し、その酵素学的性質およびタンパク質立体構造に関する研究を行い、次のような新しい知見を得た。

申請者はまず、HNK-1糖鎖生合成に関わる2種のグルクロン酸転移酵素の、GlcAT-PとGlcAT-Sの形でCOS-1細胞に発現させ、糖タンパク質性基質（アシアロオロソムコイド）と糖脂質性基質（パラグロボシド）に対する糖転移活性を測定した。その結果、GlcAT-Pの、糖タンパク質に対する活性はスフィンゴエミリンの存在を必要とするのに対しGlcAT-Sはほとんど影響を受けないこと、一方、糖脂質性基質に対する活性は両酵素ともリホスファチジルイノシトールを要求することが明らかとなった。また、GlcAT-PはN-アセチラクトサミン（Gal β 1-4GlcNAc）構造を特異的に認識するのにに対し、GlcAT-SはGal β 1-4GlcNAcのほかにGal β 1-3GlcNAc、Gal β 1-4GlcGlcに対しても転移活性を示すこと、また、種々の複合型N-グリコシド型糖鎖を基質とした場合、GlcAT-Pは非還元末端に存在するN-アセチラクトサミンの数に比例した転移活性を示すのに対し、GlcAT-Sは三本鎖の複合型N-グリコシド型糖鎖に対してより高い基質特異性を持つことが明らかになった。

次に、触媒領域のみのGlcAT-Pを大腸菌に大量発現させ、精製したGlcAT-Pのアポ酵素、酵素とUDP（供与体）、 Mn^{2+} の複合体及びN-アセチラクトサミン（受容体）との複合体についてX線結晶構造解析を行った。酵素は2量体を形成し、それぞれの単量体は、N末側の α/β Rossmann-like fold からなる供与体基質結合ドメインと、C末側の2つの β シートからなる受容体基質結合ドメインより成ることが明らかになった。UDP-GlcAの認識に関与する3個の塩基性アミノ酸残基、受容体基質であるN-アセチラクトサミンとの結合関与する6個のアミノ酸残基が明らかになった。また、Phe245の芳香環とGlcNAc環とが平行のコンフォメーションを取るにより強く相互作用すること、また二量体中の隣分子Asn321がGlcNAcのアセチル基と相互作用結合することが明らかになった。

以上、本研究はHNK-1糖鎖生合成に関わる2種のグルクロン酸転移酵素の基質特異性を決定し、基質認識機構の分子レベルで明らかにしたものであり、HNK-1糖鎖の機能を理解する上できわめて有用な知見を与えるものである。よって、本論文は博士（薬学）の論文として価値あるものと認める。

更に、平成16年3月1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。