

|           |                                                     |
|-----------|-----------------------------------------------------|
| 氏 名       | おお 大 坪 和 明                                          |
| 学位(専攻分野)  | 博 士 (薬 学)                                           |
| 学 位 記 番 号 | 薬 博 第 440 号                                         |
| 学位授与の日付   | 平成 12 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 糖鎖抗原の機能とその生合成に關与するグルクロン酸転移酵素の構造<br>活性相関に関する研究 |

論文調査委員 (主 査) 教 授 川 寄 敏 祐 教 授 伊 藤 信 行 教 授 市 川 厚

### 論 文 内 容 の 要 旨

胚発生において神経上皮から神経系が形成される一連の過程は、細胞分裂、分化、移動さらに軸索の伸長による適切な標的へのガイド、またシナプス形成やミエリン形成といったダイナミックなイベントの連続といえる。それら現象は細胞間または細胞と細胞外マトリックス間における情報の交換により厳密に制御されている。近年、細胞表面の糖タンパク質、糖脂質、プロテオグリカンといった糖鎖修飾を受けた分子群がこれら情報交換において重要な役割を果たしていることが明らかになりつつある。神経系に発現する細胞接着分子の多くに共通する特徴として HNK-1 (human natural killer) 糖鎖抗原を持つことがあげられる。この HNK-1 糖鎖抗原は末端に硫酸化グルクロン酸を持つ極めて特徴的な構造を持ち、神経回路網形成時に領域特異的に高発現する。様々な研究より、HNK-1 糖鎖抗原が神経冠細胞の移動、神経細胞とグリア細胞との接着、運動神経からの軸索伸長といった現象に關与することが示唆されている。近年、申請者の所属する研究室において HNK-1 糖鎖抗原生合成の律速酵素であるグルクロン酸転移酵素 (GlcAT-P) の精製・クローニングに成功している。本酵素は UDP-GlcA を糖供与体とし、糖受容体である N-アセチルラクタサミン構造のガラクトース末端に GlcA を特異的に転移する。この様な背景の中、申請者は細胞接着分子を介する細胞間相互作用と細胞突起伸長の 2 つの面から HNK-1 糖鎖抗原の機能を解析した。加えて、GlcAT-P の構造活性相関についても解析した。

#### 第一章グルクロン酸転移酵素 (GlcAT-P) の構造活性相関の解析

GlcAT-P とその構造類似タンパク質のシーケンスアライメントにより、4 つの高い相同性を示す領域 (モチーフ I~IV) が見つかった。これらモチーフの構造的・機能的意義を解明するためモチーフ内外のプロトン解離性アミノ酸を標的にアラニン置換を行い、転移活性の変化を測定した。その結果、モチーフ内の置換体のほとんどが活性を消失した。このことは、これら 4 つのモチーフが、いずれも活性発現に重要であることを示している。さらに、コンピューターモデリングにより、GlcAT-P の三次元構造モデルを推測・構築し、モチーフと酵素活性機能との関係を解析した。その結果、触媒部位は 4 つのモチーフにより形成され、また活性発現に必要なアミノ酸が触媒ポケット周辺に位置することが示された。特に R 222, S 228 は UDP-GlcA への結合に、F 258 は糖受容体への結合に働き、D 267 は活性中心であることが示唆された。このことはアラニン置換体の糖受容体への結合活性測定の結果からも裏付けられた。

#### 第二章 HNK-1 糖鎖抗原による細胞間相互作用の制御機構の解析

HNK-1 糖鎖抗原の細胞間相互作用における機能を調べるため、C6 glioma 細胞を用いて GlcAT-P 遺伝子の安定型形質転換細胞を樹立した。樹立株を用いて細胞の凝集性を測定した結果、親細胞と比べ著しく凝集性が低下している事を見いだした。この現象は HNK-1 糖鎖抗原の末端硫酸基を除去すると消失した。また、糖脂質性の HNK-1 糖鎖抗原はこの様な現象を示さなかった。このことより、糖タンパク質性の HNK-1 糖鎖抗原が細胞間相互作用の低下に關与していることが予想された。HNK-1 糖鎖抗原を発現する糖タンパク質を解析したところ、神経系の細胞接着分子である NCAM, L1 上に HNK-1 糖鎖抗原が発現することが分かった。また、C6 glioma 細胞の凝集性は NCAM, L1 に対するポリクローナル抗体の Fab

フラグメントで細胞を処理することにより著しく低下した。これらの結果は、この細胞間接着には NCAM, L1 が関与しており、これら分子上の HNK-1 糖鎖抗原がそれらの接着性を低下させていることを示唆している。また、NCAM の融合タンパク質を用いた NCAM 同士の結合実験より、HNK-1 糖鎖抗原が NCAM 上に発現することでそのホモフィリックな結合が弱められることが明らかとなった。以上より、HNK-1 糖鎖抗原は細胞接着分子上に発現することで、その接着性を低下させ細胞間相互作用を弱める機能があることが明らかとなった。

### 第三章 HNK-1 糖鎖抗原発現による細胞の形態変化のメカニズムの解析

まず、C6 glioma 細胞を用いて GlcAT-P 遺伝子の誘導型形質転換細胞を樹立した。その細胞の解析により、HNK-1 糖鎖抗原の誘導発現に伴い細胞の突起が著しく伸長することが示された。この突起伸長は HNK-1 抗体により著しく阻害されることから、HNK-1 糖鎖抗原に特異的な現象である。また、L1 に対するポリクローナル抗体の Fab フラグメントによっても突起伸長の阻害が観察されることから、突起の伸長には L1 が関与していると考えられた。L1 はその活性化に伴い細胞質ドメインのチロシンがリン酸化される事が知られている。これを指標として、突起の伸長時における L1 の活性化を解析した。その結果、突起の伸長に伴いチロシンのリン酸化の上昇が観察された。C6 glioma 細胞は、HNK-1 糖鎖抗原と結合することが知られている細胞外マトリックスタンパク質である、ラミニンを分泌していた。そこで、ラミニンコートプレート上で発現誘導を行ったところ突起の伸長と L1 のチロシンのリン酸化が促進された。以上の結果は、細胞表面 L1 上に発現した HNK-1 糖鎖抗原がラミニン分子と結合することで L1 を活性化し、細胞の突起伸長を促すことを強く示唆している。

以上、本研究は HNK-1 糖鎖抗原による細胞接着分子の活性制御とそれによる細胞機能制御に関して重要な新規知見を得るとともに、未だほとんど明らかにされていない糖転移酵素の構造活性相関に関する新しい知見を得たものである。

## 論文審査の結果の要旨

近年、細胞表面の糖タンパク質、糖脂質などの糖鎖が、細胞と細胞あるいは細胞と細胞外マトリックスのシグナル伝達に重要な働きを持つことが明らかになりつつある。なかでも HNK-1 (human natural killer-1) 糖鎖抗原は、神経性組織に時期および部位特異的に発現し、神経細胞の移動、神経細胞と神経細胞、神経細胞とグリア細胞の接着などに関与することが示唆されている。HNK-1 抗原は硫酸化グルクロン酸が N-アセチルラクタサミンの非還元末端に結合した特異な化学構造を持つ。本研究ではこの HNK-1 抗原の生合成を担うグルクロン酸転移酵素 (GlcAT-P) に着目し、本酵素の構造機能相関および本酵素遺伝子を用いた細胞工学的研究により HNK-1 抗原の生理的役割を調べたものである。

本酵素は短い細胞内ドメインをもつ II 型膜貫通タンパク質であるが、触媒活性を有する細胞外ドメインには、GlcAT-P ファミリータンパク質に共通に見られる高い相同性を示す領域 (モジュール I~IV) をもつ。まず、種々の部位特異的突然変異体を作成しこれらのモジュール構造と触媒活性発現との関係を調べた。モジュール I~IV 領域内に含まれる極性アミノ酸 16 個をアラニンに置換すると、ほとんどの場合活性はほぼ完全に消失した。一方、領域外のアミノ酸の置換では活性の消失はほとんど見られなかった。この結果は、触媒活性発現にはモジュール I~IV がいずれも必要であることを示している。この考えは、コンピューターによる立体構造モデル構築により確かめられた。本モデルは Rothman fold 型の高次構造をしめし、モジュール I~IV が触媒ポケットを構成しているものと推定された。

次に、細胞間相互作用に及ぼす HNK-1 糖鎖抗原の役割を、GlcAT-P 遺伝子を C6 グリオーマ細胞にトランスフェクトして作成した安定型形質転換細胞をもちいてを解析したところ、HNK-1 抗原は同種細胞間の接着性を著しく低下させることが明らかとなった。この細胞間接着は NCAM, L1 などのホモフィリックな細胞接着因子の働きによるものであり、これらの分子上に発現した HNK-1 抗原は、接着分子間のホモフィリックな結合を阻害した。また、HNK-1 抗原の発現により細胞が形態変化を示すことが知られている。そこで、GlcAT-P 遺伝子の誘導型形質転換細胞を用いてその作用機構を調べたところ、細胞接着分子上に発現した HNK-1 糖鎖抗原が細胞外マトリックスであるラミニンと相互作用し、細胞接着分子 L1 を活性化することにより、細胞突起の伸長をもたらすことを見いだした。

以上の研究は、HNK-1 抗原合成酵素である GlcAT-P の構造と機能の相関性を明らかにし、また、HNK-1 抗原の生理的役割を in vitro で明らかにすることにより、神経回路形成における糖鎖シグナルの重要性を示したものである。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 12 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。