

論文の内容の要旨

論文題目： β 1,4-Galactosyltransferase-I(GalT-I)ノックアウトマウス

に見られる糖タンパク質糖鎖構造異常とその意味

氏名： 小谷 典弘

糖タンパク質糖鎖は従来から生体機能に重要な役割を果たしていると考えられているが、未だ未知な部分が多い。最近、これらの生合成を司る酵素群（糖転移酵素）が多数クローニングされ、様々な研究に用いられている。中でも、糖タンパク質糖鎖のガラクトシル化に重要な β 1,4-galactosyltransferase-I(GalT-I)は早くからその存在が明らかになっていたこともあり注目されてきた。

1997年に東京大学医科学研究所の浅野、岩倉らのグループによってGalT-Iノックアウトマウスが作成された。このマウスは糖タンパク質糖鎖の構造異常が原因であると考えられる複雑なphenotypeを呈していた。しかし、実際にこのノックアウトマウスでどのような糖タンパク質糖鎖構造異常が起きており、どうphenotypeに反映していくのかは不明である。

この点を解明するため、本研究ではまずGalT-Iノックアウトマウスの各組織における糖鎖構造変化を正確に把握し、GalT-I欠損により糖鎖生合成がどう変化するかについて解析した。さらに、GalT-I欠損により誘導される糖鎖構造異常とphenotypeの関係を検討する目的で、前述の研究より明らかになった赤血球表面糖鎖の構造異常とノックアウトマウスの生体機能異常の1つである貧血の間に何らかの関係があるか否かについても検討を進めた。

(1) GalT-I欠損と糖鎖生合成の変化

GalT-Iは糖タンパク質糖鎖生合成過程における β 1,4ガラクトシル化に主要に関与する糖転移酵素と考えられており、ほとんどの組織に発現が認められる。従って、このノックアウトマウスでは多くの組織上に糖鎖構造変化が起こっているものと予想される。実際、レクチン染色による血清タンパク質糖鎖分析ではN結合型糖鎖上の β 1,4Gal残基の欠損が示されている。本研究ではさらに詳細な分析を行い、ノックアウトマウス各組織に起こっている糖鎖構造変化の全体像を明らかにし、GalT-I欠損が

各組織での糖鎖合成過程にどのような影響を与えているかについて解析を進めた。まず、以下に示す4種類のGalT-1ノックアウトマウス由来糖タンパク質：

- a) 赤血球表面糖タンパク質
- b) 脾臓細胞表面糖タンパク質
- c) 肝細胞表面糖タンパク質
- d) 血漿糖タンパク質

を試料とし、詳細な糖鎖構造分析を行った。糖鎖構造分析は修士課程で開発したHPAEC(High-pH anion exchange chromatography)による方法^{1) 2)}を用いて行った。

a) 赤血球表面糖タンパク質糖鎖の構造変化

+/+ (wild-type mouse)、 +/- (heterozygous knockout mouse)、 -/- (homozygous knockout mouse)の赤血球表面のO結合型糖鎖及びN結合型糖鎖を分析した。その結果、 -/-のみO結合型糖鎖core 2構造及び複合型N結合型糖鎖にβ1,4Gal残基の部分欠損が認められた³⁾。さらに、N結合型糖鎖においては年齢依存的な分岐構造の変化が認められた(Fig.1)。

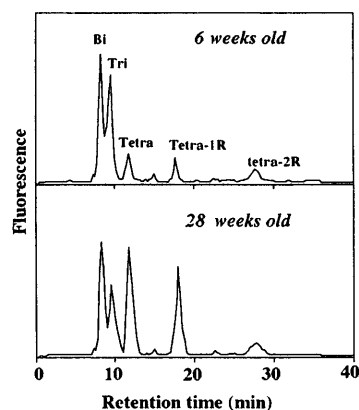


Fig.1 -/-における年齢依存的な分岐構造の変化

b) 脾臓細胞表面糖タンパク質糖鎖の構造変化

+/-及び-/-の脾臓細胞表面のO結合型糖鎖を解析した。その結果、赤血球の場合と同様に-/-のcore 2構造においてβ1,4Gal残基の部分欠損が認められた(Table 1)。

Proposed structure	Relative ratio (%)	
	+/-	-/-
(Core 1) Galβ1→3GalNAc-ol	70	72
Abnormal Core 2 <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: inline-block; margin: 5px;"> GlcNAcβ1 ↓ 6 Galβ1→3GalNAc-ol </div>	-	24
(Core 2) Galβ1→4GlcNAcβ1 ↓ 6 Galβ1→3GalNAc-ol	30	4

Table1 +/-, -/-のO結合型糖鎖コア構造と存在比

c)肝細胞表面糖タンパク質、d)血漿糖タンパク質の糖鎖構造変化

+/+及び-/-の肝細胞表面のN結合型糖鎖を分析した(Fig.2)。また、肝細胞の分泌タンパク質として血漿糖タンパク質のN結合型糖鎖についても解析した。その結果、興味深いことに両糖タンパク質N結合型糖鎖で β 1,4Gal残基の部分欠損の他、 β 1,3Gal残基の顕著な増加、シアル酸の結合様式の変化が認められた。しかし、分岐構造の変化は認められなかった。

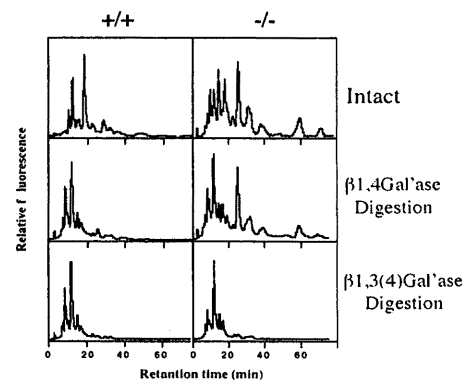


Fig.2 +/+, -/-のN結合型糖鎖構造分析

以上のことから、GalT-I欠損による糖鎖生成の変化は各組織で異なる上、当初予想されていた β 1,4ガラクトシル化の欠損だけでなく赤血球での年齢依存的な分岐構造の変化や肝細胞での β 1,3Gal残基の顕著な増加など、複雑な構造変化を誘導することも分かった。これらの結果は、生合成過程における糖転移酵素同士の協奏関係がvivoでも存在すること、また、協奏関係は各組織特異的であることを示唆している。本研究で得られた知見は将来的には糖鎖構造改変モデルの作製などに応用できると考えられ、さらなる検討が求められる。

(2) 貧血と赤血球表面糖鎖構造変化の関係

前述のようにGalT-Iノックアウトマウスのphenotypeは糖タンパク質糖鎖の構造変化によって誘導されていると考えられるが、実際のメカニズムは分かっていない。本研究ではノックアウトマウスのphenotypeの1つである貧血と赤血球表面糖鎖構造変化との関係について検討した。

+/+, +/-、-/- のヘマトクリット値を測定したところ、-/-のヘマトクリット値が有意に低下しており貧血であることが分かった。本研究では-/-赤血球表面糖鎖の β 1,4Gal残基が欠損することに注目し、GlcNAc残基が露出するという糖鎖構造異常が原因で赤血球が異物として認識され、排除(溶血)されることが貧血の原因ではないかという仮説を立てた。まず、+/-、-/-赤血球それぞれに補体

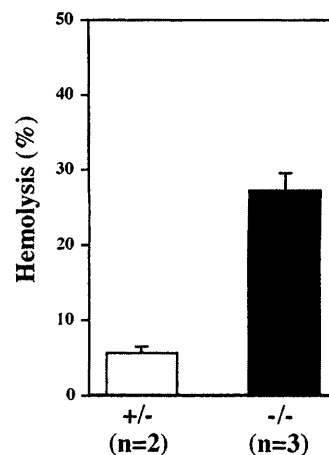


Fig.3 +/-、-/-赤血球の溶血率(マウス補体血清)

血清（モルモット、マウス）を加えてみると、*-/-*赤血球特異的に溶血が起こった(Fig.3)。さらに、この溶血反応の溶血素について検討した結果、*-/-*赤血球にマウス血清コレクチンが特異的に結合することがわかった(Fig.4)。これらの結果から、レクチン経路依存的な溶血反応が*-/-*における貧血の原因である可能性が示唆された。

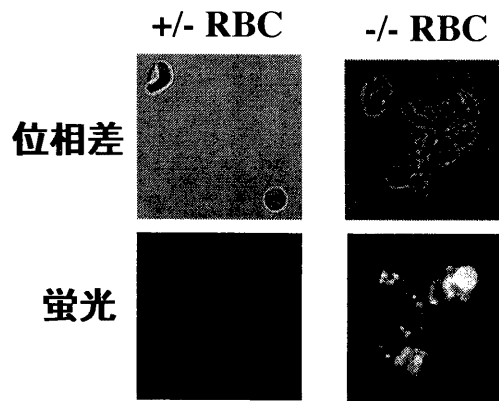


Fig.4 +/-, -/-赤血球への血清コレクチンの結合

この研究により、糖鎖構造が変化した組織が同様の異物排除機構により障害を受ける可能性が示唆された。今後、その他の組織におけるGlcNAc残基の露出と組織障害の関係について研究が進むことが期待される。

参考文献

- 1) Kotani, N. and Takasaki, S. (1997) *Anal. Biochem.* **252**, 40-47
- 2) Kotani, N. and Takasaki, S. (1998) *Anal. Biochem.* **264**, 66-73
- 3) Kotani, N., Asano, M., Iwakura, Y. and Takasaki, S. (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **260**, 94-98