

論文の内容の要旨

論文題目 ムチン型糖鎖の生合成の制御機構と糖鎖認識分子との相互作用に関する研究

氏名 竹内 英之

序論

ムチンはO-結合型糖鎖の付加したセリンやスレオニン含量の高いペプチド鎖の繰り返し構造(タンデムリピート)を含む特徴をもつ糖蛋白質である。糖鎖を細胞外に提示することを分子機能として、生物によって進化の過程でデザインされた分子であると思われる。組織の保護、潤滑はもとより、感染、炎症、組織形成、癌の悪性化などにおける細胞間の認識との関連が注目される。しかし、構造的な多様性と個々の構造に対応する機能が明らかにされているわけではなかった。

ムチンコア蛋白質をコードする遺伝子とこれに糖を付加する遺伝子が多数明らかにされているが、最終産物の“かたち”がいかにか構築され、それらの多様性がいかにして認識されるかは不明であった。そこで私はムチンの最も小さな単位のモデルとして、3個の連続するスレオニン残基に、N-アセチルガラクトサミン(GalNAc)が付加したものの生合成の制御機構を明らかにすることを主目的として研究を行った。生合成が厳密に制御されていることが明らかになったので、その結果生成される構造および類似の構造が、糖鎖認識分子によっていかに見分けられるかを解析した。

1. O-結合型糖鎖生合成の最初の段階における法則性：UDP-GalNAc:ポリペプチド N-アセチルガラクトサミン転移酵素の連続するスレオニン残基を含むペプチドに対する受容基質特異性

1-1. 連続するスレオニン残基を含むペプチド (PTTTPLK) への GalNAc の取り込み

連続する 3 つの Thr 残基への O-グリコシレーションの制御機構の解明を目的とし、MUC2ムチンタンデムリピートの一部の配列に相当する P¹T²T³T⁴P⁵L⁶K⁷ ペプチドを受容基質として、これらの基質に対するUDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase (pp-GalNAc-T) 1、2、3、および 4 の作用を調べた。Fmoc 固相法によって合成したペプチドの N 末端の α-アミノ基を FITC 標識し、受容基質とした。pp-GalNAc-Ts は膜貫通ドメインを欠失させたりコンビナント体を用いた。反応産物を逆相 HPLC において分画し、MALDI-TOF MS にて分子量 (糖の付加数) を解析し、プロテインシーケンサーにて付加した糖の位置を決定した。

pp-GalNAc-T1 は、最大 2 個を Thr-2、4 に、T2 は、最大 1 個を Thr-2 に、T3 は、最大 3 個を Thr-4、3、2 の順に付加することが判明した。T4 は最大 3 個を付加したが、Thr-2 に 1 個付加したのも最終産物として得られた (Fig. 1)。O-グリコシレーションの法則性が、アイソザイムの種類

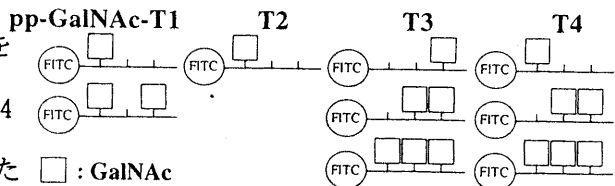


Fig.1 GalNAc(s)-attached glycopeptides produced by the action of each pp-GalNAc-T when PTTTPLK peptide was used as a substrate.

により異なることが判明した。

1-2. N-アセチルガラクトサミンの付加を一部受けた PTTTPLK への GalNAc の取り込み

次に、ペプチドへの GalNAc の部分的な付加が、その後の pp-GalNAc-Ts の作用を変化させる可能性について検討した。

合成ペプチドの N 末端の α-アミノ基を FITC 標識し、受容基質とした。pp-GalNAc-T1、あるいは、T3 を用いて、このペプチドの 4 種類の異なる GalNAc 付加体を合成し (Table 1)、pp-GalNAc-Ts の作用を調べた。一定時間反応後の反応産物の相対量により活性を比較した (Fig. 2)。

pp-GalNAc-T1 は、GalNAc を Thr-2 に導入する傾向があるが、GalNAc-Thr の N 末端側の隣 (-1) で

Table 1 Substrates used in these experiments

sequence	predicted mass	the number of GalNAc-attached
PTTTPLK	1146.3	0
PT*TTPLK	1349.5	1
PT*TT*PLK	1552.7	2
PTTT*PLK	1349.5	1
PTT*T*PLK	1552.7	2

Glycopeptides were enzymatically prepared. Sites of GalNAc attached were confirmed on the protein sequencing system and indicated with asterisks.

あると付加しにくくなった (-1 negative effect)。

pp-GalNAc-T2 は、GalNAc の付加により、劇的に特異性が変化した。すなわち、PTTTPLK の Thr-3 には付加しないが、PTTT*PLK (T*:Thr-GalNAc) を基質とすると、PTT*T*PLK を生成したので、

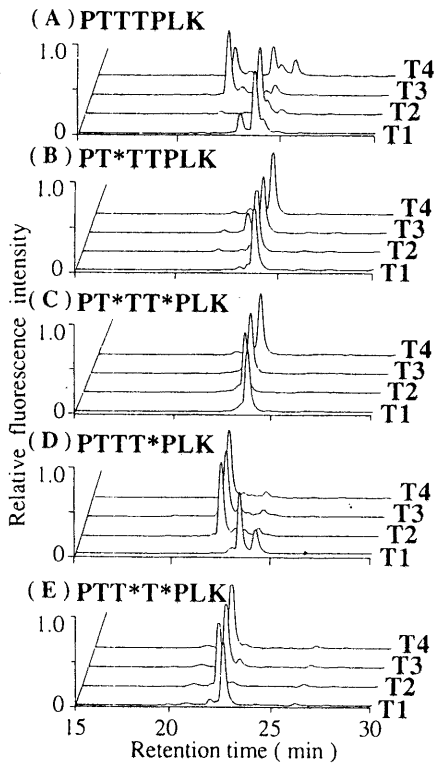


Fig. 2 Elution profiles of products separated by reverse-phase HPLC after incubation of PTTTPLK peptide or its glycosylated derivatives with recombinant pp-GalNAc-T1, T2, T3, or T4 for 16 h.

GalNAc-Thrの -1 positive effect があると考えられた。pp-GalNAc-T3は、部分的に GalNAc が付加したものを基質としたときにも、Thr-4、3、2の順に付加しやすく、GalNAc-Thrに -1 positive effect があることが分かった。pp-GalNAc-T4にも、pp-GalNAc-T2、T3と同様に、-1 positive effect がみられた。各酵素の特異性を Fig. 3 にまとめた。

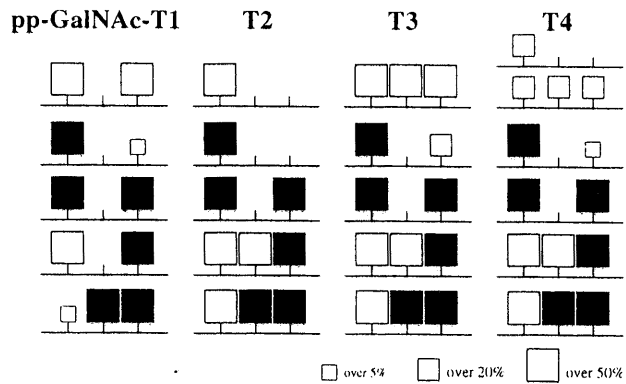


Fig. 3 Extent of product formation by pp-GalNAc-Ts using PTTTPLK peptide or its glycosylated derivatives as substrates. Transferred GalNAc residues were shown by open symbols.

1-3. N-アセチルガラクトサミンにガラクトース (Gal) が付加することによる影響

Gal β 1-3GalNAc α - を付加させた PTTTPLK に対する pp-GalNAc-Ts の作用を調べた。Thr-2 に糖が付加していると、その糖が GalNAc であれ、Gal β 1-3GalNAc であれ、Thr-3 または Thr-4 への GalNAc の取り込みは、いずれの pp-GalNAc-Ts でもほとんどみられなかった。Thr-4 に糖が付加している場合は、糖の種類によって pp-GalNAc-Ts の活性に差異がみられた。pp-GalNAc-T1 は、いずれの場合にも、基質に対してさらに 1 つの GalNAc を付加した。これに対して、T2、T3、T4 は、PTTT*PLK を基質としたときに残りの 2 箇所の Thr 残基に GalNAc を付加したが、この作用はガラクトースの付加によって抑制された。このように、連続する Thr 残基への O-グリコシルーションにおいては、ペプチドへの GalNAc の付加と GalNAc へのさらなる糖の付加とが拮抗することが、糖鎖付加部位の配置を決定する要因のひとつであることが示唆された。

2. 近傍に複数の O-結合型糖鎖を含む構造に対する糖鎖認識分子の特異性

第 1 章で明らかとなったように、ムチンのアミノ酸配列にしばしばみられる連続するスレオニン残基の O-グリコシル化の配置は、生合成の中間体やその後の伸長の仕方を含めて極めて厳密に制御されている。そこで、糖ペプチドが糖鎖認識分子によって認識される際に、糖鎖の配置の違いがその親和性に影響するかどうか植物レクチンおよびモノクローナル抗体を用いて調べた。

2-1. 植物レクチンの特異性

糖鎖単独では GalNAc (Tn 抗原) に特異的とされている *Vicia villosa* agglutinin (VVA)、および、Gal β 1-3GalNAc (TF 抗原) に特異的とされているピーナッツアグルチニン (PNA) の結合性について検討を加えた。方法としては、今回作成した FITC 標識糖ペプチドとこれらのレクチンとの結合性を蛍光偏光度測定法 (BEACON 2000, TaKaRa) により解析した。VVA は、Tn 抗原に結合性を示し、2つの Tn 抗原が Thr-2 と 4 に付加している糖ペプチドに対して、Thr-3 と 4 に結合しているものより高い結合性を示した (Fig. 4, A)。PNA は、TF 抗原に結合性を示したが、2つの TF 抗原が Thr-2 と 4 に付加している糖ペプチドに対して、3つの TF 抗原が付加している糖ペプチドに対するよりもはるかに高い結合性を示した (Fig. 4, B)。PNA が高い結合性を示すには、2つの糖鎖の間に少なくともアミノ酸ひとつ分のスペースが必要であることが示唆された。これらのことから、少なくとも連続する3個のスレオニン残基が足場 (scaffold) として、Tn あるいは TF 抗原が構築された場合、糖鎖の配置がレクチンとの親和性に大きな影響を及ぼすことが示された。

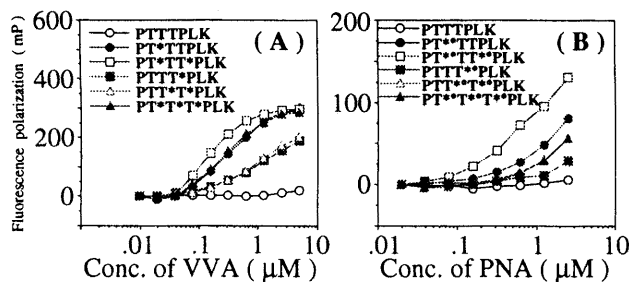


Fig.4: Fluorescence polarization of FITC-labeled glycopeptides (10 nM) after incubation with lectins. (A) VVA . (B) PNA . T* and T*° indicates GalNAc-Thr and Gal β 1-3GalNAc-Thr, respectively.

2-2. 抗 MUC1ムチン抗体 MY.1E12 の特異性

O-グリコシル化がムチンとその認識分子との相互作用に強い影響をもつ例として抗体による MUC1ムチンの認識がよく知られている。健常人乳汁膜面分から粗精製したヒト乳脂肪膜を免疫原として、当研究室で作製された抗 MUC1ムチンモノクローナル抗体 MY.1E12 の詳細なエピトープの解析を試みた。MUC1ムチンタンデムリピート (GSTAPPAHGVTSAPDTRPAP) およびその部分配列上

において糖鎖の逐次的付加反応を行った。

細胞を用いた予備的な実験から、結合における、 α -2-3 結合したシアル酸の重要性が示唆されたので、数および付加位置の異なるシアリル TF 抗原が付加した糖ペプチドを作製した。合成糖ペプチドと本抗体との結合を蛍光偏光度測定法により解析した。

その結果、この抗体が、Thr-11 にシアリル TF 抗原の付加している糖ペプチドに対して高い結合性を示すことを見出した。別の位置にシアリル TF 抗原が付加していても結合性の上昇はみられなかったことから、この位置の Thr 残基にシアリル TF 抗原が付加していることが本抗体の結合性を有意に上昇させるものと考えられた (Fig.5)。

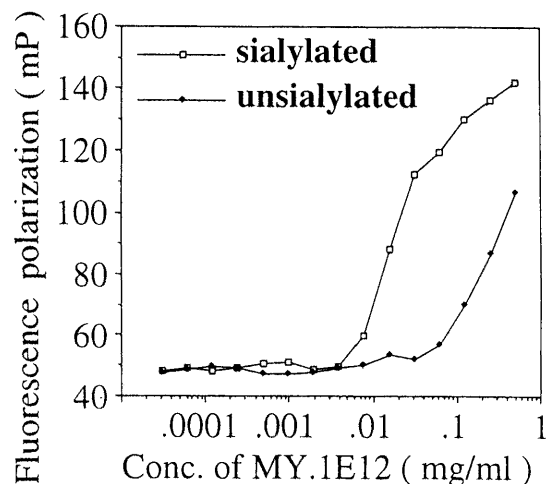


Fig. 5 Effect of sialylation on the binding of MY.1E12 antibody to GSTAPPAHGVT*°SAPDTK peptide T*° indicates Galb1-3GalNAc-Thr.

結語

本研究により、ムチンタンデムリピートへの O-結合型糖鎖の付加の順序と最大数が、酵素の受容基質特異性に基づいて厳密に制御されていることが示された。今後は細胞に発現した pp-GalNAc-T の種類とムチンの O-グリコシルーションとの間に相関があるかを解明する必要がある。糖ペプチドに対するレクチンの親和性が糖鎖付加部位の配置に影響を受けることが明らかとなった意義は大きい。本酵素アイソザイムはムチンの糖鎖付加のパターンを決定することを通して細胞間の認識に影響する可能性が高い。したがって、感染、炎症、組織形成、癌の悪性化などに関わる細胞において、本酵素アイソザイムの発現に変動がみられるかどうかは興味深い問題である。

参考文献

1. Iida, S., Takeuchi, H., Hassan, H., Clausen, H., and Irimura, T. (1999) FEBS Lett. 449, 230-234.
2. Iida, S., Takeuchi, H., Kato, K., Yamamoto, K., and Irimura, T. (2000) Biochem. J. 347,535-542.
3. Takeuchi, H., Kato, K., Hassan, H., Clausen, H., and Irimura, T. submitted.
4. Takeuchi, H., Kato, K., Denda-Nagai, K. and Irimura, T. in preparation.