

審査の結果の要旨

氏名 竹内英之

「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」と題する本論文は、上皮の産生する粘液の主成分であり、また上皮に特徴的な細胞表面分子である「ムチン」に糖鎖が付加する際の制御機構と、結果として生じる糖鎖を含むペプチドの構造的なモチーフが特異的に認識される仕組みを明らかにしたものである。ムチンは上皮組織の保護や潤滑がその主な分子機能とされ、糖鎖はそのような物性に必要な構造を保つための部分品であると考えられて来た。そのため従来は、ペプチド上での糖鎖の配置などを含む構造の多様性に生物学的な意味があると考えられたことはなかった。しかし最近、ムチンの遺伝子構造が明らかにされた結果、この分子は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考えられるようになった。さらに、ムチンコアペプチドに糖鎖を付加する酵素であるUDP-GalNAc:polypeptide *N*-acetyl galactosaminyltransferase (pp-GalNAc-T) が遺伝子レベルでも構造と機能のレベルでも予想外の多様性を示す事もわかって来た。そのような背景から、本研究は「細胞外に運び出される蛋白質に含まれるセリンやスレオニンの全てが、どのような順序でどこまで O-グリコシレーションを受けるか或いは受けないかは、ポリペプチドの配列と産生細胞に発現している pp-GalNAc-T の組み合わせによって特異的に決定されている」という仮説に基づき、連続するスレオニンを含むペプチドを対象に生合成過程の特異性を解析したものである。ムチンやムチン様レセプターに含まれるスレオニン（及びセリン）が連続する配列は、糖とペプチドの組み合わせによって無限に近い多様なモチーフを形成し、発分化と組織形成、炎症と免疫、感染とその防御、癌の進行と転移などにおける細胞間の認識における多様性の分子的な基盤として機能している可能性が高い。しかし今までは、多様な構造の生合成が厳密に制御されていることが示されていなかったため、生物学的な特異性を議論出来なかった。ペプチドと糖鎖のコンビネーションによるモチーフ形成が pp-GalNAc-T の特異性によって厳密に制御されていることだけでなく、多様なモチーフが糖鎖認識分子によって見分けられる事が、本研究によって初めて明らかにされた。

本論文は大きく二つの部分に分けられている。ムチン 2 (MUC2) の配列の一部をモデルとして用いた O-グリコシレーションの法則性に関する研究と、ムチン 1 (MUC1) 及び MUC2 の配列に基づくムチンモチーフのレクチン及びモノクロナル抗体による認識に関する研究である。

まず、連続するスレオニン残基を含むペプチドである PTTTPLK への GalNAc の取り込み (O-グリコシレーションの最初のステップ) が研究対象とされた。合成したペプチドの N 末端のアミノ基に FITC で蛍光標識し、膜貫通ドメインを欠失させたりコンビナント体 pp-GalNAc-T1、2、3、または 4 と UDP-GalNAc によって GalNAc を取り込ませた。反応産物を逆相 HPLC で分離し、MALDI-TOF MS にて分子量 (糖の付加数) を、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。O-グリコシレーションの法則性（付加位置、順序、最大数）が、アイソザイムの種類により異なることが判明した。このペプチドの4種類の部分的なGalNAc付加体を合成し、各pp-GalNAc-Tと一定時間反応後の産物を同様なストラテジーで分析した。その結果、pp-GalNAc-T2、3、及び4ではC末端側のスレオニンにGalNAcが取り込まれると、そのN末端側のスレオニンへのGalNAcの取り込みが亢進することが明らかになった。この効果は、このGalNAcにガラクトース（Gal）が付加することによって失われることも証明した。従って、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し、最終産物のモチーフを決定することが示された。

本論文の後半では、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を、論文の前半で扱ったMUC2由来の各種ペプチドと植物レクチン及びMUC1の一部のペプチドとMUC1特異的なモノクローナル抗体の相互作用について解析した結果が示されている。方法は、構造を確かめた蛍光標識糖ペプチドのレクチンや抗体と結合を蛍光偏光解消法によって測定している。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ツアグルチニン（PNA）の結合性について、糖鎖とペプチドが複合することによって生じるムチンモチーフに対する認識特異性を明らかにした。VVAは、2と4番目のスレオニンにTn抗原が付加している糖ペプチドの方が、3と4番目のスレオニンに結合しているものより高い結合性を示した。PNAは、2と4番目のスレオニンに2つのTF抗原が付加している糖ペプチドの方が、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。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。さらに、抗MUC1モノクローナル抗体のひとつであるMY.1E12の詳細なエピトープの解析を試みた結果も述べられている。MUC1タンデムリピート（GSTAPPAHGVT SAPDTRPAP）の11番目のスレオニンにシアリル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、ペプチド合成と抗体との親和性測定から証明した。

以上のように、本研究によってムチンタンデムリピートに最も典型的な配列である連続するスレオニンへの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はじめて示された。さらに、糖ペプチドに対する糖鎖認識分子の親和性が、糖鎖付加部位の配置に大きな影響を受けることを、本研究が示した。pp-GalNAc-T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。以上のような内容を含む本研究成果は、O-結合型糖鎖の生物学における重要な一里塚として後世に残る意義深いものである。糖鎖生物学、分子細胞生物学に大きく貢献することは言うまでもない。よって、本研究を行った竹内英之は博士（薬学）の学位を得るにふさわしいと判断した。