

審査の結果の要旨

氏名 榎谷内 晶

「2種類の新規 β 1,3-糖転移酵素のクローニングと機能解析～ β 1,3-ガラクトース転移酵素 5 (β 3Gal-T5) 及び β 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素 5 (β 3Gn-T5)」, 英文では「Molecular Cloning and Characterization of Two Novel β 1,3-Glycosyltransferases」と題する本論文は、これまで知られていなかった二つのヒトの糖転移酵素の遺伝子クローニング、発現細胞の同定、及び細胞への遺伝子の安定導入による細胞表面糖鎖のリモデリングに関する研究成果を述べたものである。これらの糖転移酵素は、いずれも糖鎖の非還元末端の糖を転移するものではないが、それらの発現がそれぞれ消化管上皮細胞における CA19-9 抗原と神経細胞や血球細胞における HNK-1 抗原の発現レベルを決定付ける重要な糖転移酵素であることが本研究によって証明された。糖鎖末端に見られる生物学的に重要なエピトープ構造の生合成が多くの糖転移酵素の協調的な働きによって担われている事は、既に良く知られていた。しかし、特定の細胞において生物学的に重要な糖鎖構造の生合成が、いかに制御されているのかは、類似のアクセプター特異性を有する糖転移酵素が多数存在する、これらが細胞の種類に特異的に発現している、個々の糖転移酵素の発現制御機構がユニークである、などの可能性が強いため、解明がおくれていた。生物学的に重要な糖鎖エピトープの生合成制御機構を解明した二つの先導的な例として、本研究は極めて価値の高いものである。

具体的には論文は二つの部分から成り、第一章は CA19-9 抗原の生合成に関与する β 1,3-ガラクトース転移酵素遺伝子 (β 3Gal-T5) のクローニングと機能解析が主題である。CA19-9 抗原は大腸癌、胃癌、膵臓癌などの消化器癌の進展に伴い患者血清中に発現する腫瘍マーカーであり、その抗原決定基はシアリルルイス a (sialyl-Lewis a) 構造である。本抗原の生合成には1型糖鎖 (Gal β 1-3GlcNAc-R) の合成に関与する β 1,3-ガラクトース転移酵素 (β 3Gal-T) が必須であるが、既知の3種類の β 3Gal-T 遺伝子群の癌細胞株における発現量を定量したところ、細胞表面の CA19-9 抗原の発現量と相関を示さなかった。そこで大腸癌・胃癌・膵癌において CA19-9 抗原の合成に関与している未知の β 3Gal-T が他に存在すると考えられた。そこで、既知の β 3Gal-T 酵素群のアミノ酸配列をもとに degenerate primer を設計し、ヒト大腸癌 Colo205 細胞由来の cDNA ライブラリーから、既知の β 3Gal-T 遺伝子にホモロジーを有する 310 アミノ酸からなる蛋白質をコードする新規の cDNA のクローニングに成功した。この酵素遺伝子の大腸癌、膵癌株における発現量は CA19-9 発現量に相関していた。また本酵素遺伝子の安定導入細胞株のフローサイトメトリー解析により細胞表面の CA19-9 抗原を合成するようになることを確認した。この β 3Gal-T 活性を有する新規の酵素を β 3Gal-T5 と命名した。各 β 3Gal-T 遺伝子の遺伝子安定導入株を作製し、その細胞抽出液を酵素源としてオリゴ糖基質 (GlcNAc β 1-3Gal1-4Glc) に対する糖転移活性測定を行った結果、 β 3Gal-T 活性が証明された。組織

発現分布をみると主に胃、大腸、小腸、膵臓、子宮などの消化器官に高いレベルで発現が見られた。この β 3Gal-T5 酵素は発現分布や活性等を考慮すると、大腸癌・胃癌・膵臓癌の組織あるいは癌細胞において CA19-9 抗原を合成する酵素であると結論できた。この酵素は消化管に特異的な発現をしており、消化器癌の悪性挙動における糖鎖抗原の役割に関係が深いものと考えられた。

第2章では、糖脂質上の HNK-1 及び Lewis X 抗原発現に関与する新規 β 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素 (β 3Gn-T5) 遺伝子のクローニングと機能解析に関する研究の成果が述べられている。糖脂質上の糖鎖抗原である Sulfoglucuronyl Glycolipid (SGGL、別名 CD57 あるいは HNK-1 抗原) や Lewis X 抗原 (CD15) などは発生特異的あるいは組織特異的にその発現が制御されており、それらを含むラクト・ネオラクト系列の糖鎖は、抗体による阻害実験等から神経細胞の樹状突起伸長などに関わっているとのされている。これらの糖鎖は β 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素 (β 3Gn-T) である Lactotriaosylceramide (以下 Lc3Cer) 合成酵素により合成され、発現の調節がなされている可能性が高かった。また、同じ特異性を持つ酵素は糖脂質糖鎖の生合成において、他の系列の糖鎖の発現を相対的に調節するという点においても重要であると考えられた。しかしこの酵素の実体は明らかでなく、遺伝子クローニングを含めた解析が必須と思われた。そこで、この Lc3Cer 合成酵素遺伝子を単離し、発現パターンを解析することが本研究論文の第二章の目的となった。既知の β 3Gn-T 群も遺伝子ファミリーを形成しており、新規 β 3Gn-T がこれらのモチーフを含むアミノ酸配列を有していると考えられたので、データベースを検索したところ、既知遺伝子に相同性を有する EST 配列が見出された。これに基づいて、378 個のアミノ酸から成る蛋白質をコードする新規のヒトの遺伝子が単離された。後の解析より β 3Gn-T5 と命名されたこの酵素は、糖脂質基質であるラクトシルセラミド (LacCer) とパラグロポシド (nLc4Cer) を基質とする強い酵素活性を示し、Lc3Cer 合成酵素である可能性が示唆された。 β 3Gn-T5 が細胞内でも Lc3Cer 合成酵素活性を示すのかを確認する為、 β 3Gn-T5 遺伝子安定導入細胞株から中性糖脂質画分を抽出し、その糖脂質組成を調べると Lc3Cer 酵素により合成される糖鎖構造の顕著な増加が見られた。血球系細胞の分化誘導、あるいはラットの脳の発生過程に伴い、この酵素の活性が変化することが既に報告されていたので、 β 3Gn-T5 遺伝子の転写産物の変化を定量した結果、 β 3Gn-T5 遺伝子発現の変化はこれらの報告と一致することを確認した。以上の結果より、 β 3Gn-T5 が Lc3Cer 合成酵素であることが結論付けられた。

本研究では、糖鎖抗原の細胞特異的、分化段階特異的な発現を制御するこれらの酵素の重要性をさらに明確にする為の第一歩として、まず相同性に基づく遺伝子クローニングを行い、二種類の新規の遺伝子のクローニングに成功した。本研究によりクローニングされた新規糖転移酵素遺伝子は β 1,3-結合の糖転移酵素群から形成される同じ遺伝子ファミリーに属しているが、本研究による解析によって、異なる基質特異性を有しそれぞれ特徴的な糖鎖構造を合成すること、そして生物学的に異なる機能を担っていることが明らかになった。本研究による遺伝子の単離と解析により、糖鎖抗原の特異的な発現を制御するこれらの酵素の重要性をさらに明確にする為の基礎が築かれた。このように糖鎖生物学と細胞生物学に大きく貢献する本研究を行った学位申請者である 梶谷内 晶 は、博士 (薬学) の学位を得るにふさわしいと判断した。