

論文の内容の要旨

論文題目 *N*-アセチルガラクトサミン転移酵素 (pp-GalNAc-T) によるムチンの *O*-グリコシレーション制御とその意義について

氏名 加藤 健太郎

[序]

ムチンは *O*-結合型糖鎖を多数含む糖蛋白質であり、糖鎖の付加した多数のセリン (Ser) 又はスレオニン (Thr) を含み、さらにこのアミノ酸配列が繰り返すという特異な構造を有する。分泌型ムチンの 1 つである MUC2 では PTTTPITTTTTVTPTPTGTQT という配列が 51-115 回繰り返している。これらの Thr 残基のうち約 80% に糖が付加しているという報告があるが、どの Thr に糖付加が起きているかは不明である。従来、ムチンにおいては Thr (又は Ser) が存在すれば高頻度でランダムに糖付加が起こると考えられていた。

連続する Thr 又は Ser を含む配列は MUC2 以外のムチンやムチン様細胞表面レセプターの先端部にも存在し、糖鎖の配置やその糖鎖構造から生じる多様なモチーフには生物学的意味があると考えられる。この糖付加反応に関わる *N*-アセチルガラクトサミン (GalNAc) 転移酵素 (pp-GalNAc-T) は現在までにヒトでは 14 種類が遺伝子としてクローニングされ、それぞれの酵素でアミノ酸配列に対する基質特異性が存在することや発現臓器に違いがあることが明らかにされてきている。MUC2 のような連続する Thr や交互に Thr を含む配列に対しては、どの Thr にどのような順序でいくつの GalNAc が付加するかは不明であった。また、pp-GalNAc-T の発現パターンの異なる細胞で蛋白質上の GalNAc 付加位置および付加数が異なるかも明らかではなかった。

そこで私は MUC2 ムチンのタンデムリピート部配列のうち連続する Thr を含む PTTTPITTTTTK ペプチドをアクセプター基質としたときに得られた産物を分析し GalNAc の取り込みにどのような規則性が存在するか、細胞における異なる pp-GalNAc-T の発現が

GalNAc 付加にどのような影響を与えるか、また GalNAc 付加位置が異なることでどのような生物学的意義がありうるか明らかにすることを目的とし、本研究を行った。

[方法と結果]

1. pp-GalNAc-T の混合物であるヒト大腸癌 LS174T 細胞マイクロソーム画分による PTTTPITTTTK ペプチドに対する GalNAc 付加制御

ヒト大腸癌 LS174T 細胞は蛋白質レベルで pp-GalNAc-T1、T2、T3、および T4、mRNA レベルで pp-GalNAc-T1、T2、T3、T4、T6、T7、T8、および T9 の発現が確認された細胞である。この細胞のマイクロソーム画分を調製し、PTTTPITTTTK ペプチド、UDP-GalNAc とともに一定時間反応させた。逆相 HPLC により GalNAc が付加したペプチドを分離・精製した後、MALDI-TOF MS と peptide sequencer を用いて GalNAc 付加数と付加位置を同定した。考えられうる 128 通りのバリエーションのうち 11 通りの GalNAc 付加ペプチドしか得られず、しかもそれらがすべて 2 通りの経路上に存在することが示唆された。そこで GalNAc が 1 個付加したペプチド、PT*TTTTPITTTTK および PTTT*PITTTTK (* は GalNAc を意味する) をアクセプター基質として LS174T 細胞マイクロソーム画分と反応したところ、各々の GalNAc 付加ペプチドからそれぞれ 1 通りの経路で GalNAc 付加産物が生成し、GalNAc 付加経路が厳密に決まっていることがわかった。

2. 組換え型 pp-GalNAc-T1、T2、T3、T4 およびそれらの混合物による PTTTPITTTTK ペプチドへの GalNAc 付加制御

少なくとも 4 種類の pp-GalNAc-T が含まれる LS174T 細胞マイクロソーム画分を酵素源とした実験で 2 通りの経路で GalNAc 付加が起こったことから、これらがどの pp-GalNAc-T の特異性に基づくのか明らかにしようと考えた。LS174T 細胞で蛋白質レベルの発現が確認された pp-GalNAc-T1、T2、T3、あるいは T4 を単独で PTTTPITTTTK ペプチドと反応させた場合では pp-GalNAc-T2、T3、及び T4 では 1 通り、pp-GalNAc-T1 では 2 通りの経路で糖付加産物が合成された。しかし、いずれの経路も LS174T 細胞マイクロソーム画分を酵素源とした場合とは異なった。この結果より、マイクロソーム画分を酵素源とした場合には数種類の pp-GalNAc-T が協調して PTTTPITTTTK ペプチドに GalNAc を付加すると考えられた。これら 4 種類の pp-GalNAc-T のうち 2 種類、3 種類、および 4 種類を混在させた場合にどのように GalNAc 付加が起こるかすべての組み合わせについて検討した。PTTTPITTTTK ペプチド上の Thr 残基すべてに GalNAc が付加されたのは pp-GalNAc-T4 が含まれる場合であった。また、pp-GalNAc-T1 および T2 がともに含まれる組み合わせでは最大で 5 個までしか GalNAc が付加されなかった。さらに 4 種類の pp-GalNAc-T を含む場合も 5 個までしか GalNAc が付加されなかった。従って、どの pp-GalNAc-T が含まれているかにより GalNAc 付加位置と最大数が決まるという可能性が示された。

3. pp-GalNAc-T の発現を異にする細胞株における O-グリコシレーションの制御

酵素源に含まれる pp-GalNAc-T の種類により、GalNAc 最大付加数が異なることが明らかと

なったので、実際に pp-GalNAc-T の発現パターンの異なる細胞株において GalNAc 付加位置および付加数が異なるか検証した。GalNAc-Thr/Ser を認識する VVA-B4 レクチンによる染色性の異なるマウス大腸癌 colon 38 細胞およびそのバリエーションである SL4 細胞における pp-GalNAc-T の発現量を competitive RT-PCR 法により確認した。その結果、マウス pp-GalNAc-T1、T2、T7 は SL4 細胞で発現がより高く、pp-GalNAc-T3 は colon 38 細胞で発現がより高かった。pp-GalNAc-T4 は両細胞で発現量に差がなく、pp-GalNAc-T6 は両細胞とも発現量が検出限界以下であった。pp-GalNAc-T の発現パターンの異なる両細胞のマイクロソーム画分を酵素源にして PTTTPITTTTK ペプチドと反応させた結果、colon 38 細胞マイクロソーム画分を用いた場合は最大で 6 個の GalNAc が付加されたペプチドが得られたのに対し、SL4 細胞マイクロソーム画分を用いた場合は最大で 4 個までしか GalNAc が付加されなかった。12 時間反応後に得られた GalNAc 付加ペプチドの GalNAc 付加数は colon 38 細胞マイクロソーム画分を用いた場合は 1、3、4、5、及び 6 個であったのに対し、SL4 細胞マイクロソーム画分を用いた場合は 1、2、及び 4 個であった。これらの結果より、細胞において pp-GalNAc-T の発現が異なった場合に、同一ペプチド上の GalNAc 付加パターンが異なることが示唆された。

4. 異なる組み合わせの pp-GalNAc-T によって生成されたムチン糖ペプチドとレクチンの相互作用

それでは、細胞表面上のムチンの GalNAc 付加パターンが異なることにどのような生物学的意義があるのでしょうか。この問題に対して私は糖鎖認識分子による認識が異なるのではないかと

考え、GalNAc-Thr/Ser を認識するレクチン (VVA-B4) と 1~6 個の GalNAc が様々なパターンで PTTTPITTTTK ペプチドに付加した 17 種類のペプチドの親和性を表面プラズモン共鳴法により測定した。その結果、PTT*T*PITT*T*TK ペプチドが最も親和性が高いことが明らかとなった。また、結合速度定数 (ka) は GalNAc 付加位置が離れている方が大きく、解離速度定数 (kd) は GalNAc がクラスターを形成している方が小さくなる傾向があることが明らかとなった。これらの結果より、GalNAc 付加数ではなく GalNAc 付加位置により糖鎖認識分子との親和性が決まることが明らかとなった (Figure 1)。

Figure 1. VVA-B4 と 17 種類の GalNAc 付加ペプチドの親和性測定結果。

結合速度定数 (ka) は GalNAc 付加位置が離れている方が大きく、解離速度定数 (kd) は GalNAc がクラスターを形成している方が小さくなる傾向があることが明らかとなった。

	ka (1/Ms)		kd (1/s)
	4.40×10^4		3.53×10^{-3}
	2.68×10^4		4.35×10^{-3}
	2.60×10^4		4.41×10^{-3}
	2.53×10^4		4.41×10^{-3}
	2.46×10^4		4.48×10^{-3}
	2.16×10^4		4.70×10^{-3}
	1.78×10^4		5.27×10^{-3}
	1.43×10^4		5.28×10^{-3}
	1.35×10^4		5.29×10^{-3}
	1.32×10^4		5.69×10^{-3}
	1.23×10^4		5.73×10^{-3}
	1.21×10^4		6.03×10^{-3}
	1.01×10^4		6.68×10^{-3}
	9.41×10^3		7.88×10^{-3}
	9.14×10^3		8.03×10^{-3}
	8.33×10^3		8.13×10^{-3}
	5.92×10^3		1.25×10^{-2}

【まとめと考察】

ムチンコアペプチドへの GalNAc 付加は pp-GalNAc-T が混在した状態であっても厳密に制御されており、しかも最初にどの Thr に GalNAc が付加するかにより、その後の GalNAc 付加経路が決まっていることを明らかにした。また、pp-GalNAc-T の発現パターンを異にする細胞あるいは臓器において、同一のムチンコアペプチドを発現していても GalNAc 付加位置および GalNAc 付加数が異なり、糖鎖認識分子との親和性が異なることが示唆された。親和性の違いは糖鎖認識分子の認識部位の立体構造および認識部位間の距離に起因しているものと考えられる。これらの結果は生体内で GalNAc 付加パターンの異なる蛋白質が異なる機能を有している可能性を示している。ヒトに感染し、出血性大腸炎を引き起こす赤痢菌アメーバが Gal/GalNAc を認識するレクチンを有していることが知られているが、感染が成立する、あるいは宿主が防御に成功するまでの過程にムチンの GalNAc 付加パターンの変化が重要な役割を担う可能性が高い。