

1. 課程・論文博士の別 課程博士
2. 申請者氏名(ふりがな) 加藤 健太郎(かとう けんたろう)
3. 学位の種類 博士(薬学)
4. 学位記番号 博葉 第 1072 号
5. 学位授与年月日 平成16年3月25日
6. 論文題目 N-アセチルガラクトサミン転移酵素 (pp-GalNAc-T) によるムチンのグリコシレーション制御とその意義について
7. 審査委員会委員 (主査) 東京大学 教授 入村 達郎  
教授 関水 和久  
助教授 渋谷 雅明  
助教授 仁科 博史  
助教授 高崎 誠一
8. 提出ファイルの仕様等

使用文書ファイル 加藤健太郎 審査結果.pdf

Adobe Acrobat

Mac OS 9.2

## 審査の結果の要旨

氏 名 加藤 健太郎

「N-アセチルガラクトサミン転移酵素 (pp-GalNAc-T) によるムチンのグリコシレーション制御とその意義について」と題する本論文では、ペプチド中のスレオニン (Thr) 残基への N-アセチルガラクトサミンの酵素的な転移反応における特異性が明らかにされ、その生物学的な意義が述べられている。本研究の背景には、ほとんどすべての蛋白質にはセリン (Ser) 残基と Thr 残基が含まれており、これらには糖鎖が付加しているものも付加していないものもあり、その制御機構は全く不明であったという事実がある。膜蛋白質の細胞外ドメインや分泌蛋白質の場合、付加している糖は N-アセチルガラクトサミン (GalNAc) であることが多いが、全ての Thr/Ser に糖鎖が付加しているわけではない。他の分子との相互作用によって重要な水酸基を含む Thr/Ser には糖鎖は付加しない。従って、ここには精緻な制御機構が働いている可能性が高かった。学位申請者は、多数の Thr を含み、そこに多数の糖鎖が付加していることが知られている分子であるムチン 2 (MUC2) に特徴的なペプチド配列を対象に、その O-グリコシレーションの制御機構を解明した。ムチンとは主として上皮細胞が産生してその管腔側に分泌または表出する O-結合型糖鎖を多数含む糖蛋白質である。多数の Ser 又は 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し、これらの Ser 及び Thr 残基は高頻度に O-結合型糖鎖の付加を受けている。分泌型ムチンの 1 つである MUC2 は PTTTPITTTTTVTPTPTGTQT またはこれに類似の構造が 51-115 回繰り返す部分を含むが、どの Thr に糖鎖が付加しているかは不明であった。ペプチドへの GalNAc の付加反応に関わる 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。しかし、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最大いくつまで 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。

本研究は MUC2 ムチンのタンデムリピート部配列のうち連続する Thr を含むペプチドである PTTTPITTTTTK をアクセプター基質としたときに得られた産物の構造を決定し、GalNAc の

取り込みにどのような規則性が存在するか、異なる pp-GalNAc-T を発現する細胞における GalNAc 付加の違い、また GalNAc 付加位置が異なることが糖鎖認識分子との相互作用にどのような影響するのかを明らかにすることを目的として行われた。

第一章は、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 付加制御を明らかにした結果である。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、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\*TTTPIITTTK および PTTTPIITTTK (\* 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判明した。

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すべく、第二章の研究が行われた。ここでは、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 付加制御が解析された。pp-GalNAc-T1、T2、T3、あるいは T4 単独では 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、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。LS174T 細胞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。そこで、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 ペプチド上のすべての Thr 残基に 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、GalNAc 付加の最大数は 5 個であった。従って、特定の pp-GalNAc-T がこのペプチドへの GalNAc 付加の、位置、順序及び最大数を決定する可能性が示された。

pp-GalNAc-T の種類によって GalNAc 最大付加数が異なることが明らかとなったので、第

三章では実際に 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かった。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 個まで付加された。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、ムチン上の GalNAc 付加パターンが異なることが示唆された。

異なる組み合わせの pp-GalNAc-T によってムチン上に異なる GalNAc 付加パターンが生成されることが分かったので、これらに対する糖鎖認識分子による認識が異なるのではないかと考え、実際にそれを検証した結果が第四章である。具体的には GalNAc-Thr/Ser を含む構造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、結合速度定数は GalNAc 付加位置が離れている方が大きく、解離速度定数は 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。

以上の結果から、ムチンコアペプチドへの GalNAc 付加は複数の 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、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が明らかにされた。また、異なる pp-GalNAc-T が発現する細胞において、ムチンへの GalNAc 付加位置および GalNAc 付加数が異なること、これによって糖鎖認識分子との親和性が異なることが明らかにされた。ムチンにおける O-グリコシル化の制御とその生物学的な意義を解明するという意味で極めて重要な成果であり、本研究は学位論文として十分な内容を含むと判断した。また、本研究を行なった加藤健太郎は博士(薬学)の学位を得るにふさわしいと判断した。