

審査の結果の要旨

氏 名 菅原 大介

細胞の表面には非常に多種類の糖鎖が、糖蛋白質に付加した形で発現、表出している。これらの糖蛋白質糖鎖の構造は、普遍的に多くの細胞に見出されるものであることが多いが、相対的な量比は細胞の種類に特徴的である。細胞の分化、増殖、活性化、老化などの細胞の状態によっても大きく変化する。また、同じ細胞の産生する糖蛋白質糖鎖であっても、特定の位置にある特定の糖蛋白質に付随した糖鎖の持つバリエーションは、それぞれ極めて特徴的である。細胞が産生する糖鎖の生合成制御には複数の分子が関与し、特に糖転移酵素の発現レベル、基質特異性、局在、複合体形成などが糖鎖の構造の種類と構造を決定していると考えられている。しかし、糖転移酵素の遺伝子発現解析からある細胞においてどのような糖鎖がどのような比率で生合成されているか予想することは全く不可能である。機能的に重要な糖鎖がどのような量で存在するかは、細胞表面を免疫学的に解析することや、細胞が産生する複数の多様な糖鎖の構造を一つずつ化学的に解析することによって初めて可能になる。このようなアプローチは糖鎖の生物学的意義を理解して医学的に応用するためにも必須である。また、個々の糖蛋白質に付随する全ての糖鎖のバリエーションを決定することも、糖鎖による糖蛋白質の機能調節を理解するために不可避である。しかし、糖蛋白質糖鎖の全体像を明らかにすることは非常に困難であり、中でもO-結合型糖鎖の微量解析法が十分に確立されていないことは従来から大きな問題とされてきた。「細胞が産生するO-結合型糖鎖のピレン標識法による微量解析」と題する本研究では、O-結合型糖鎖の微量解析法を確立し、この方法を用いて糖転移酵素の遺伝子発現に伴って細胞が産生するO-結合型糖鎖の構造的なバリエーションがどのように変化するかを、容易に得られる数の細胞を材料として、その全体像を明らかにすることが目的とされている。

学位申請者はピレン標識法が、多様な構造を有するO-結合型糖鎖の解析に適すると考え、まず、細胞が産生するO-結合型糖鎖のヒドラジン分解による遊離法及びピレン標識法によるO-結合型糖鎖の解析法の開発を行なった。次にこの方法により腫瘍関連糖鎖抗原の生合成に関与すると考えられていた糖転移酵素遺伝子を導入したヒト大腸癌細胞株を用い、この遺伝子の発現に伴い細胞が産生するO-結合型糖鎖にいかなる変化が起こったか解析した。

第一章（序論）では、本研究の重要性に関して、学位申請者の考えが述べられている。第二

章では学位申請者が従来行っていた糖蛋白質からの O-結合型糖鎖の遊離法とこれに続くピレン標識法を改善したことが述べられている。具体的にはピレン誘導体生成後に還元処理を施して結合を安定化させた。第三章では、この改善したピレン標識法を用いて、O-結合型糖鎖を構造的に解析する方法が述べられている。ここでは、細胞から適当な前処理を施すことによって直接全ての O-結合型糖鎖を遊離させ、ピレン標識体にかえて網羅的な分析を行うことが試みられている。ヒト大腸癌細胞株における糖転移酵素遺伝子発現に伴う O-結合型糖鎖の変化と題して、ヒト腸癌細胞株 HCT-15 細胞に、 α 2,6 シアル酸転移酵素 ST6(*GalNAc-I*) 遺伝子を導入した場合、及び同じ細胞に β 1,3 フクトース転移酵素 β 3(*Gal-T5*) を強制発現させた際の O-結合型糖鎖プロファイルの変化について分析化学的な検討を行った結果が述べられている。

ST6GalNAc-I はセリンまたはスレオニンに結合した N-アセチルガラクトサミン残基に α 2,6 結合によりシアル酸を転移しシアリルTn抗原を生成する活性を有する。本酵素を発現しないヒト大腸癌細胞株 HCT-15 細胞に この 遺伝子を導入し、本酵素の発現によって変化する O-結合型糖鎖を解析した。本酵素遺伝子導入細胞（以下、HCT-ST6 細胞）及びモックトランスフェクタント細胞、各 1×10^6 個をペレットとし、脱脂処理及びプロナーゼ処理後、遠心式限外ろ過膜を用い徹底的に脱塩処理を行なった。これらの処理により得られた O-結合型糖鎖を豊富に含む糖ペプチドの10%を用いて60℃、5時間、ヒドラジン分解を行ない O-結合型糖鎖を遊離した。上述の方法によりピレン誘導体を糖鎖還元末端へ導入し、アミノカラム を用いたHPLCにより糖鎖を分離した。ウシフェチュイン及びウシ顎下腺ムチンなどから得た構造既知の糖鎖の溶出位置から糖鎖構造を推定し、結合様式特異的シアリダーゼ処理前後の溶出位置の変化から付加されたシアル酸の結合様式を推定した。解析の結果、HCT-ST6 細胞ではモック細胞では産生が確認されなかった NeuAc α 2,6GalNAc、Gal β 1,3(NeuAc α 2,6)GalNAc、NeuAc α 2,3Gal β 1,3(NeuAc α 2,6)GalNAc の出現が確認された。また、HCT-ST6 細胞においては Gal β 1,4GlcNAc β 1,3Gal β 1,4GlcNAc β 1,6(Gal β 1,3)GalNAc の相対量比がモック細胞の約 3分の2へ低下したことが明らかになり、コア 2 糖鎖から伸長した結合型糖鎖の産生が阻害されたと考えられた。これはGal β 1,3GalNAc α 1-Ser/Thrを基質とするコア2 β 1,6 N-アセチルグルコサミン転移酵素と本酵素が基質を競合した結果、コア 2 糖鎖の生合成が抑制され、コア 2 糖鎖からのラクトサミン糖鎖の伸長が阻害された結果と考えられた。

β 3Gal-T5 は Nアセチルグルコサミン残基に β 1,3 結合によりガラクトースを転移する糖転移酵素であり、大腸癌、膵臓癌の進展に伴い患者血清中において発現が上昇する腫瘍マーカー CA19-9 抗原（シアリルルイス X 抗原 NeuAc α 2,3Gal β 1,3(Fuc α 1,4)GlcNAc β -R) をはじめとする

タイプ 1 骨格糖鎖(β 1,3GlcNAc β -R) 生合成に重要な酵素の一つと考えられていた。本酵素遺伝子を発現していないヒト大腸癌細胞株 HCT-15 細胞に *Gal-T5* 遺伝子を導入し、それに伴う糖鎖の変化を解析した。本酵素遺伝子導入細胞（以下、HCT-3GT5 細胞）及びモックトランスフェクタント細胞が産生する *O*-結合型糖鎖を上述の *ST6GalNAc-I* 遺伝子導入細胞における解析と同様の方法にて比較した。アミノカラム HPLC による比較では、本酵素導入により出現したピークが複数検出され、これらはいずれもシアル酸結合糖鎖であることが明らかになった。シアリダーゼ処理に引き続き、基質特異性の広いフコシダーゼ処理を行なった結果得られた糖鎖に対し結合位置に特異的な β -ガラクトシダーゼ処理を行い、処理前後の溶出位置の変化から糖鎖構造を推定することが可能になった。その結果、コア 1 糖鎖を除く HCT-3GT5 細胞が産生する *O*-結合型糖鎖の非還元末端はタイプ 1 骨格糖鎖をもつことが明らかになった。ガラクトース転移酵素である本酵素の酵素基質特異性からは予想できないシアル酸結合糖鎖の産生にも影響したことが明らかになった。

以上の様に、学位申請者はヒドラジン分解による *O*-結合型糖鎖の遊離法及びピレン標識法を改良し、比較的少数の細胞を用いて糖蛋白質糖鎖の主要なものの全てを微量でかつ簡便に解析する方法を確立した。この方法に従い、 *β 3Gal-T5* 及び *ST6GalNAc-I* 遺伝子発現に伴う *O*-結合型糖鎖変化を解析し、その影響が広範囲の糖鎖構造に及ぶことを示した。従来糖鎖生物学の研究方法としては、生物学のセントラルドグマに基づいて、糖転移酵素の遺伝子を明らかにし、その発現調節と生物現象と結び付けるというアプローチが一般的であった。しかし、レクチンとの相互作用を通して諸々の生物現象を直接制御するのは糖鎖であり、糖転移酵素ではない。従って、細胞がどのような糖鎖を産生しているか明らかにすることが糖鎖の機能を理解するためには必須である。本論文に記述された研究成果は糖鎖生物学ばかりでなく、免疫学や細胞生物学などの関連する領域に資するところが大きい。従って、本研究は学位論文として十分な内容を含むと判断し、また本研究を行なった菅原大介は博士（薬学）の学位を得るにふさわしいと判断した。