

論文の内容の要旨

論文題目 接着分子セレクチンの糖鎖リガンドの生合成に関与する
 $\alpha 2, 3$ -シアル酸転移酵素と $\alpha 1, 3$ -フコース転移酵素の
発現クローニングと応用

氏 名 佐々木 克敏

白血球の炎症部位への浸潤やリンパ節へのホーミングには、接着分子セレクチン (E-, P-, L-セレクチン) とその糖鎖リガンドの結合が重要な役割を果たしている。糖鎖リガンドとしては、シアリルルイス x [Sialyl Lewis x (sLe^x): NeuAc α 2-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc] 糖鎖およびその関連糖鎖が知られている。セレクチンと糖鎖リガンドの結合をブロックする薬剤 (セレクチンブロッカー) や糖鎖リガンドの発現を抑制する薬剤は、抗炎症薬として期待される。sLe^x糖鎖は、 $\alpha 2, 3$ -シアル酸転移酵素と $\alpha 1, 3$ -フコース転移酵素が順に作用することによって合成されるが、研究を開始した当時 (1980 年後半)、白血球におけるセレクチンの糖鎖リガンドの生合成に関与する糖転移酵素は不明であった。そこで我々は、白血球においてセレクチンリガンドの生合成に関与する $\alpha 2, 3$ -シアル酸転移酵素と $\alpha 1, 3$ -フコース転移酵素の単離・同定を試みた。糖転移酵素は微量にしか存在せず、蛋白質精製に基づく従来のクローニング法は困難と考えられたため、発現クローニング法を用いたアプローチを行った。

1. 独自の発現クローニング系の開発

Epstein-Barr virus の複製開始点 oriP を有する発現クローニングベクターと、Namalwa KJM-1 細胞 [Namalwa 細胞 (burkitt lymphoma) の無血清馴化株] を用いた発現クローニング系を構築した。本系を用いて、効率的な cDNA ライブラリーの作製と安定形質転換株の取得が可能である。

2. sLe^x糖鎖の生合成に関与する α 2,3-シアル酸転移酵素 (ST3Gal IV) の発現クローニング

ヒマメレクチン 120 (sLe^x糖鎖の骨格糖鎖 Gal β 1-4GlcNAc を認識して細胞毒性を示すレクチン) に対する耐性獲得を指標とした発現クローニングにより、ヒト・メラノーマ細胞株 WM266-4 から 2 種の α 2,3-シアル酸転移酵素 (ST3Gal IV と ST3Gal III) のクローン化に成功した。推定触媒部位をプロテイン A の IgG 結合領域との融合蛋白質として分泌させた分泌型酵素を作製し、*in vitro* 基質特異性を検討した結果、両酵素は LNnT (Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc) と LNT (Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc) を基質とすることが判明した。ST3Gal VI は LNnT、ST3Gal III は LNT に特異性が高かった。ST3Gal IV を発現させた Namalwa KJM-1 細胞では sLe^x糖鎖の発現が増加したが、ST3Gal III を発現させた細胞ではほとんど増加しなかった。Competitive PCR 法を用いて、ST3Gal IV と ST3Gal III の転写物の発現量を解析した結果、ST3Gal IV は、sLe^x糖鎖を発現することが知られているヒトの顆粒球、単球、顆粒球系・単球系細胞株 (HL-60、U-937、THP-1)、および大腸癌細胞株 (Colo205、SW1116、LS180) の全てで発現がみられたのに対し、ST3Gal III は、顆粒球、単球、Colo205、SW1116 ではほとんど発現していなかった。以上の *in vitro* 基質特異性、*in vivo* 酵素特性、発現分布から、顆粒球や単球では、ST3Gal IV が sLe^x糖鎖の生合成に関与すると考えられた。

3. sLe^x糖鎖の生合成に関与する α 1,3-フコース転移酵素 (Fuc-TVII) の発現クローニング

抗 sLe^x糖鎖抗体への結合能の増加を指標とした発現クローニングにより、ヒト単球系細胞株 THP-1 から新規 α 1,3-フコース転移酵素 (Fuc-TVII) のクローン化に成功した。上記 2 と同様にして作製した Fuc-TVII 分泌型酵素は、 α 2,3-sialy-LNnT を基質とした時にのみ α 1,3-フコース転移酵素活性を示し、LNnT や LNT は基質としなかった。Competitive PCR 法を用いて 5 種の α 1,3-フコース転移酵素 (Fuc-TIII、Fuc-TIV、Fuc-TV、Fuc-TVI、Fuc-TVII) の転写物の発現量を解析

した結果、Fuc-TIV と Fuc-TVII が、セレクトインリガンドを発現することが知られている顆粒球、単球、顆粒球系・単球系細胞株 (HL-60、U-937、THP-1) で発現していた。Fuc-TIV と Fuc-TVII が sLe^x糖鎖の生合成に関与するか調べるため、3種の sLe^x糖鎖抗体 (CSLEX-1、KM93、HF6) を用いて、各酵素を発現させた Namalwa KJM-1 細胞における sLe^x糖鎖の発現を検討した。その結果、Fuc-TVII の発現により、3種の抗体全てで sLe^x糖鎖の大幅な増加が検出された。一方、Fuc-TIV の発現では、CSLEX-1 への結合のみがわずかに増加した。各酵素を発現させた Namalwa KJM-1 細胞の E-セレクトインに対する結合能を検討した結果、Fuc-TVII 発現細胞では明らかな結合がみられたのに対し、Fuc-TIV 発現細胞ではみられなかった。以上の結果から、Fuc-TVII は白血球におけるセレクトインリガンドの生合成に関与していると考えられた。

4. その後の進展と応用

白血球におけるセレクトインリガンドの生合成に ST3Gal IV と Fuc-TVII が関与することは、その後のノックアウトマウスを用いた外部研究からも支持された。ノックアウトマウス等の解析から、セレクトインブロッカーや Fuc-TVII 阻害剤は、喘息、皮膚炎、虚血再灌流障害等に有効と考えられる。我々は、ST3Gal IV と Fuc-TVII を用いて効率よく sLe^xオリゴ糖が製造可能であることを示すと共に、Fuc-TVII 阻害剤として Panosialin A を見出した。特定の糖蛋白質 (コア蛋白質) 上の sLe^x糖鎖が、セレクトインリガンドとして機能することも明らかになった。P-セレクトインリガンド糖蛋白質 1 (PSGL-1) はそのようなコア蛋白質の一つであり、Wyeth Pharmaceuticals 社が製造した可溶性 PSGL-1 (PSGL-1 の N 末端 47 アミノ酸とイムノグロブリン G の Fc 領域のキメラ蛋白質) が、現在セレクトインブロッカーとして臨床開発中である。可溶性 PSGL-1 の生産には Fuc-TVII が使用されている。これまでに開発に入った Fuc-TVII 阻害剤はないが、現在も魅力的な標的である。

5. まとめ

独自に開発した発現クローニング系を用いて、白血球におけるセレクトインリガンドの生合成に関与する α 2,3-シアル酸転移酵素 (ST3Gal IV) と α 1,3-フコース転移酵素 (Fuc-TVII) のクローン化に世界に先駆けて成功した。これらの酵素は、セレクトインリガンド (セレクトインブロッカー) の生産、阻害剤のスクリーニング、蛋白医薬の糖鎖修飾等、医薬開発上有用と考えられる。