

# 博士學位論文

内容の要旨及び審査の結果の要旨

第19号

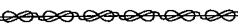
2003年3月

京都産業大学

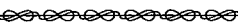
## は し が き

本号は、学位規則（昭和28年4月1日文部省令第9号）第8条の規定による公表を目的とし、平成15年3月25日に本学において博士の学位を授与した者の論文内容の要旨及び論文審査の結果の要旨を収録したものである。

学位記番号に付した甲は、学位規則第4条第1項によるもの（いわゆる課程博士）であることを示す。



# 目 次



1. 天野 麻理	
論文内容の要旨 .....	1
論文審査の結果の要旨 .....	4

氏名(本籍)	天野 麻理 (石川県)
博士(専攻分野)	博士(生物工学)
学位記番号	甲工第6号
学位授与年月日	平成15年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
論文題目	Structure-function relationship of UDP-GalNAc : polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 1 (GalNAc-T1)
論文審査委員	主査 黒坂 光 教授 副査 岡山 實 教授 " 福井 成行 教授

### 論文内容の要旨

小胞体で合成された新生タンパク質は、糖付加等の様々な翻訳後修飾を受けて機能を持った成熟タンパク質となる。GalNAc $\alpha$ 1 $\rightarrow$ Ser/Thrの結合様式を持つムチン型糖鎖の付加は、重要な翻訳後修飾の1つである。ムチン型糖鎖は、受精や炎症反応等の現象に関与することが報告されている。また、癌細胞では異常な構造のムチン型糖鎖が蓄積する。このように細胞の状態や要求される生理機能に応じて様々な構造のムチン型糖鎖が発現する。このことは、ムチン型糖鎖生合成に関与する糖転移酵素群が高度な調節を受けていることを示しており、糖転移酵素の触媒機能の分析は、細胞の機能の解明に重要な手がかりを与える。本研究では、ムチン型糖鎖の生合成反応を触媒するUDP-GalNAc : polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase (GalNAc-T)に注目した。本酵素は、ムチン型糖鎖の有無や位置、数を決定する重要な酵素である。これまでに発見された12種類のGalNAc-Tは図のような共通のドメイン構造を持っている。酵素活性に関係する触媒領域のN末端側には、多くの糖転移酵素で共通な glycosyltransferase1 (GT1)モチーフが、C末端側には galactosyltransferaseと相溶性の高



いGal/GalNAc-Tモチーフが存在する。さらにC末端側には植物レクチンのリシンと相同性が高く、糖転移酵素ではGalNAc-Tにのみ特異的に見られるレクチン様ドメインを有する。このように、GalNAc-Tは特徴的なモチーフやドメイン構造を持つが、その機能は不明である。ムチン型糖鎖付加反応の機構を解明する目的で、筆者はGalNAc-Tのアイソザイムの中でも特に組織分布が広く、あいまいな基質特異性を持つGalNAc-T1をモデル酵素としてその構造活性相関を詳細に解析した。

筆者はアイソザイム間で高度に保存されているシステイン残基に着目した。システイン特異的修飾試薬を用いた実験から、GalNAc-T1のUDP-GalNAcとの結合部位にシステインが関与することが示唆された。アイソザイム間で保存されているシステインをアラニンに置換した変異体を作製し、その酵素活性を測定したところ、①GT1モチーフ内とその近傍の3つのシステイン ②Gal/GalNAc-Tモチーフ内とその近傍の3つのシステインの変異体はいずれも失活した。さらに、GalNAc-T1をシステイン特異的な蛍光試薬を用いて修飾した後、蛍光標識されたアミノ酸を同定することにより、GT1モチーフ内のCys212, Cys214が遊離システインであることを見いだした。これらのシステインをそれぞれセリンに置換した変異体はいずれも50%以上の活性を保持していた。また、セリン置換体はいずれもセリン修飾試薬で阻害をうけた。さらに、それらの置換体のUDP-GalNAcとの親和性は低下したがアクセプターとの親和性には変化がなかった。以上より、GalNAc-T1とUDP-GalNAcとの結合にはGT1モチーフ内のシステインを介した水素結合が関与していると結論した。

次に、Gal/GalNAc-Tモチーフの機能を調べた。筆者はこのモチーフ内で高度に保存されている芳香族アミノ酸残基に着目した。これらの残基をロイシンや他の芳香族アミノ酸残基に置換した変異体を解析した。その結果、このモチーフ中のPhe303, Tyr309, Trp316が糖ドナーとアクセプターの両方の結合に関与することを見いだした。特に、Trp316は基質タンパク質との結合に重要な役割を果たしていた。また、すべてのアイソザイム間で保存されているTrp328はGalNAc-T1の酵素活性に不可欠であり、この部位に導入した種々の変異は酵素を完全に失活させた。

植物レクチンリシンと相同性の高いC末端部のレクチン様ドメインは3つのタンデムリピート $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ からなる。このドメインを欠失した変異体は失活したことから、このドメインの活性への関与が示唆された。しかし、レクチン様ドメインの欠失変異体が糖ドナーやアクセプターペプチドとの結合能を保持していたことから、基質との結合には触媒領域の

みに関与することが示された。次にこのドメインのレクチン様機能について調べた。まず、GalNAcを用いた単糖阻害の実験を行った。アポムチンの様な多くの糖受容部位を持つアクセプターへの糖転移は、高濃度のGalNAcの添加により阻害されたのに対し、1つの糖受容部位しか持たないアクセプターへの転移は、GalNAcの阻害を受けなかった。このことは、多くの糖受容部位への糖の付加反応の過程で、アクセプター上のGalNAcが酵素のレクチン様ドメインにより認識される可能性を示している。そこで、リシンとのホモロジーから、GalNAc-T1のレクチン様ドメイン中の糖結合に関与すると推測されるいくつかのアミノ酸に変異を導入した。変異の導入は、多くの糖受容部位を持つアクセプターに対する活性を選択的に低下させたことから、レクチン様ドメインのGalNAc認識機構がアクセプターへGalNAcの連続的な付加反応に必須であることを見いだした。さらに、ドメイン中の3つのリピートが $\alpha > \beta > \gamma$ の順の強さで糖結合活性を持つこと、および $\alpha$ リピート中のAsp444がレクチン様活性に最も重要な残基であることも見いだした。

筆者はGalNAc-T1を詳細に解析する事で以上の新規な知見を得た。本研究は各アイソザイムの構造的な違いと生物活性との関係の理解に役立つ。生物が重複した機能を持つ多くの糖転移酵素群を発現している必然性は理解されていない。一見類似した組織発現分布や基質特異性を持つ酵素もおそらくそれぞれが特有の性質を持っており、生物に不可欠な役割を担っているものと思われる。これらを明らかにするには、それぞれのGalNAc-Tの性質をさらに解明することが必要である。

## 論文調査結果の要旨

予備審査の結果を受けて、本博士論文の本審査を以下の観点から評価した。

### 1. 学位論文の評価

本論文は、主にほ乳類細胞において細胞間および分子間の識別に重要な働きをするムチン型糖鎖の生合成反応を触媒する酵素(GalNAc-T)の構造活性相関に関する研究について記述したものである。ムチン型糖鎖の構造は、組織間で異なり、また細胞の生理的状态により変化することが知られている。したがって、その生合成反応は糖転移酵素の活性のレベルで厳密に制御されているものと思われる。ムチン型糖鎖の生合成の開始反応を触媒するGalNAc-Tは大きな遺伝子ファミリーからなることが解明されつつある。しかしながら、それらの触媒機能に関する情報はきわめて少なく、タンパク質への糖鎖付加反応がどのような触媒機構で起こるのか、またその反応がどのように制御されているのかほとんど理解されていない。本論文は、このような観点に基づき、GalNAc-Tの中でも最も広い組織分布を示すGalNAc-T1をモデル酵素として、詳細な構造活性相関についての研究を行い、その成果を記述したものである。

本論文は3章から構成されており、それぞれの章においてGalNAc-T中に含まれる各ドメインについて以下のような重要な知見を得ている。

- a) 第1章では、アイソザイム間で高度に保存されているシステイン残基に着目し実験を行っている。システインに対する特異的な化学試薬を用いて、遊離のシステイン残基を修飾した後、その修飾されたシステイン残基を、HPLCを用いて分画することで同定に成功している。さらに、システイン残基の変異体を作製することで、GT1モチーフ中の2つのシステイン残基が、酵素反応の開始に先立ってUDP-GalNAcと結合することを見いだした。
- b) 第2章では、Gal/GalNAc-Tモチーフ中に含まれる疎水性アミノ酸残基の役割を明らかにした。このモチーフはGalNAc-Tとgalactosyltransferaseに共通に見られる事が知られているが、その機能ははまだ解明されていない。申請者は、モチーフ中に存在する疎

水性アミノ酸残基に変異を導入することで、それらのいくつかが糖供与体であるUDP-GalNAcおよび糖受容体のペプチドの両方の認識に重要であることを示した。特に、Trp316については詳細な解析を行い、このアミノ酸残基が酵素のinitial glycosylation活性に重要な役割を果たしていることを示した。この研究成果は、GalNAc-Tが、initialとfollow-up反応の2つの異なった糖転移反応を行う事を示した初めての研究成果である。

- c) 第3章では、酵素のC末端にあるレクチン様ドメインについても非常に詳細な研究を行っている。レクチン様ドメインの立体構造から、立体構造の保持、もしくは糖との結合に必要とされるであろうアミノ酸残基を標的として、欠失変異体や種々のアミノ酸置換体を作製し、基質との結合性や酵素速度論的な解析を行った。その結果、このドメインが、糖結合活性を保持しており、酵素のfollow-up glycosylation活性に必要不可欠であることを証明した。さらに、レクチン様ドメイン中の3つの繰り返し単位の糖結合活性が $\alpha > \beta > \gamma$ の順に強いこと、さらに $\alpha$ リピート中のAsp444が糖結合活性に最も重要であることも明らかにした。

このように本論文は、酵素に存在するGT1モチーフ、Gal/GalNAc-Tモチーフ、レクチン様ドメインのそれぞれについて、部位特異的変異導入法と酵素の速度論的解析を組み合わせ、従来不明瞭であった糖鎖付加反応の機序に関する重要な知見を得たことを論理的に記述しており高く評価できる。本研究の遂行には、分子生物学・生化学・酵素化学などの幅広い知識を要求されるが、申請者は十分な調査と実験を積み重ね極めて論理的に研究を進めている。したがって本学位論文は、研究内容の質・量ともに非常に高いレベルにあり、学位論文として申し分ないものと判断できる。

## 2. 研究業績

申請者は、本審査申請時ですでに英文専門誌に論文5報を公表している。さらに、京都産業大学論集にも1報を投稿中である。また、国際会議を始め種々の学会での発表も多数(16回)行っており、学位授与に十分な研究業績を備えている。



### 3. 学位申請論文公聴会

平成15年1月21日には学位申請論文公聴会を行うとともに、質疑応答による試験を行った。発表内容は、十分に工夫され非常に高いレベルにあった。また、質疑応答も的確であった。

### 4. その他

平成13年度には笹川科学研究助成を受けている。さらに、研究に真摯に取り組む姿勢、および学科内の種々のセミナーなどで発言する積極性なども高く評価できる。

### 5. 総合判断

上記各項目の評価より明らかなように、本学位論文は非常に高い水準にある。また、申請者は優れた専門分野の知識および見識を有している。

以上の調査を総合的に判断して、本調査委員会は全員一致で、本学位論文が博士課程の学位の授与に値するものと判断した。