

論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

氏 名 吉 村 淳

論 文 題 目

オリゴ・ポリシアル酸構造の新奇な合成酵素および認識分子
に関する研究

論文審査担当者

主 査	名古屋大学教授	北 島 健
委 員	名古屋大学教授	佐 藤 ちひろ
委 員	名古屋大学教授	柴 田 貴 広
委 員	名古屋大学教授	岡 島 徹 也
委 員	名古屋大学助教	呉 迪

論文審査の結果の要旨

別紙 1-2

生体を構成するタンパク質や脂質はしばしば糖鎖修飾される。とくに、細胞表面のタンパク質は高度に糖鎖修飾されるものが多く、実際、細胞表面は分厚い糖鎖の層で覆われていることが知られている。これらの糖鎖の構造は生物種、細胞の種類や状態の違いによって千差万別であるため、しばしば糖鎖は外部に情報を提示する「細胞の顔」と言われている。また、糖鎖修飾はタンパク質や脂質の性質を大きく変えることから、それらの生理機能の制御に重要な役割を果たしている。糖鎖修飾の中でもシアル酸修飾は糖脂質及び糖タンパク質の糖鎖の非還元末端に対して起こるため、細胞の接着や認識過程において重要な機能を担うことが知られている。シアル酸は 9 つの骨格炭素からなる酸性の単糖で、その存在は、細菌からヒトに至るまで多くの生物種において知られ、糖鎖の構造多様性の一因を担っている。多くの場合、1 残基のシアル酸が末端に付加したモノシアル酸 (monoSia) 残基として存在している。しかし、monoSia よりも少ないながら、シアル酸にシアル酸が付加されてできるシアル酸重合体として、ジシアル酸 (diSia)、重合度 3~7 のオリゴシアル酸 (oligoSia) および重合度 8 以上のポリシアル酸 (polySia) も存在する。その構造は、構成シアル酸の分子種、シアル酸残基間の結合様式 ($\alpha 2,4$ 、 $\alpha 2,8$ 、 $\alpha 2,9$ 、 $\alpha 2,8/9$ 、 $\alpha 2,5$ *O*_{glycolyl}) および鎖長の違いによって高い多様性を有する。このようなシアル酸重合体 oligo/polySia の構造多様性に関する研究は、解析の困難さが主な原因と思われる取り残されており、その存在意義には不明な点が多く残っている。本研究では oligo/polySia の生物学的意義の理解を深めることを目的として、polySia 合成酵素 (polyST) とシアル酸結合免疫グロブリン様レクチン (Siglec) に着目して以下の二つの課題に取り組んだ。

(1) ウニポリシアル酸合成酵素 (polyST) の同定と性質： 無脊椎動物ウニの配偶子においては、単一種内で $\alpha 2,5$ *O*_{glycolyl}、 $\alpha 2,8$ -および $\alpha 2,9$ -polySia の 3 種類の oligo/polySia を発現することが知られている。ウニは oligo/polySia の構造多様性や polyST による生合成制御機構の解明研究に適している。本研究では、ウニのゲノムデータベースより polyST の候補遺伝子を探索し、生化学的なアプローチにより polyST 活性を解析した。BLAST 検索を含んだ探索により 28 のウニ ST8Sia 遺伝子が見出され、それらの遺伝子は系統樹解析により既知の脊椎動物 ST8Sia とは系譜の異なる遺伝子群を形成していることが判明した。次に、ウニの生殖巣から PCR によって 5 つの ST8Sia 候補遺伝子をクローニングした。哺乳類細胞に遺伝子を導入後、ウェスタンブロッティングやフローサイトメトリーによる polyST 活性測定を行い、spu5 が $\alpha 2,8$ -polyNeu5Ac 合成活性を持つことを明らかにした。また、spu5 の変異体作出、糖鎖分解酵素処理、基質タンパク質との共発現によって polyST 活性を調べ、脊椎動物の既知 polyST とは異なる性質を持つ新奇 polyST であることを示した。

(2) シアル酸結合免疫グロブリン様レクチン (Siglec) : 免疫系の自己非自己の認識

別紙 1 - 2

には糖鎖が重要な役割を果たす。中でも、後口動物においては糖鎖上のシアル酸の有無が重要であると考えられている。その認識に関わる分子として主に免疫細胞に発現している Siglec が知られている。Siglec は、シアル酸の認識を通して免疫を制御するレクチン型受容体である。Siglec のシアル酸結合特異性は複雑であり、その結合メカニズムは完全には明らかにされていない。ヒトの 15 種類の Siglec 遺伝子の中、Siglec-7 は主にナチュラルキラー (NK) 細胞や単球上に発現しており、細胞外領域の Ig-like V-set ドメインとシアル酸含有リガンドとの結合を介して免疫を負に制御している。また、Siglec-7 の結合特異性は $\alpha 2,8$ -diSia 構造や分岐型 $\alpha 2,6$ -シアル酸構造とされているが、佐藤ちひろ等のグループによって、重合度が 6 のヘキサシアル酸構造まで認識できることが示されている。近年、同じグループによって、Siglec-7 のシアル酸結合部位について、既知の結合部位 (Site 1) に加えて新規の結合サイト (Site 2) に位置するアルギニン残基 (R67) の存在が報告された。そこで本研究では、Siglec-7 のシアル酸認識機構をより詳細に解明することを目的として、新奇 Site2 結合部位の詳細な理解とそのがん細胞上の標的リガンドの同定を行った。最初に、Site 2 に存在する他のアルギニン残基の結合への関与を調べた。まず、アミノ酸配列や立体構造の *in silico* 解析を行い、R92 と R94 が Site 2 に存在し、多くの Siglec において保存されていることを見出した。特に、R94 は全 Siglec に保存されており、実際に Siglec-7 のシアル酸結合に必須であることを明らかにした。また、R92 は monoSia を含む糖鎖との結合に関与していることも明らかにした。以上の結果から、Siglec-7 は結合に必須なアルギニン残基をもつ機能的な 2 つの結合サイトを通じてリガンドと相互作用することによって、一見複雑な結合特異性を示すことが初めて明らかにされた。

次に、Siglec-7 はシアル酸結合を介して自然免疫を負に制御することが知られているが、そのリガンドは未同定であったため、Siglec-7 に対して高い結合性をもつ血球系がん細胞 K562 を用いて、そのリガンド担体タンパク質の同定を行った。抗体の Fc 領域と Siglec-7 融合タンパク質と強力な結合阻害剤 diSia-Dex を用いてリガンドを親和性精製し、質量分析、免疫沈降実験、近接ラベリング法を併用して、分子量 110 kDa のリガンド担体タンパク質として CD43 を同定した。また、K562 と NK 細胞を用いた細胞障害実験により、CD43 と Siglec-7 の相互作用を介して NK 細胞の活性が低下することを発見した。さらに、Siglec-7 が認識する CD43 上の糖鎖構造を修飾するシアル酸転移酵素として、ST8SIA6 と ST6GALNAC1 を同定した。これらことから、Siglec-7 は CD43 の O 結合型糖鎖上の $\alpha 2,8$ -diSia および Sia $\alpha 2$ -6GalNAc 構造を認識し、NK 細胞における細胞障害活性を抑制する機能があることを明らかにした。

以上、本研究では oligo/polySia の「生合成」と「認識」という 2 つの現象に着目

別紙 1-2

して研究を行った。ウニの新奇 polyST である spu5 の発見は、多様な polySia 構造が合成される触媒機構を明らかにするだけでなく、棘皮動物からヒトに至るまでの polySia の進化の過程をひも解くヒントを与えることになる。また、Siglec-7 における高度に保存された 2 番目の結合サイトの発見は、Siglec-7 の糖鎖認識機構を詳細に理解することにつながる。さらに、がん細胞における Siglec-7 のリガンド担体タンパク質およびリガンドの生合成を担うシアル酸転移酵素が同定され、NK 細胞上の Siglec-7 との相互作用の機能が解明されたことは、Siglec-7 の生体内における免疫制御機構の解明に向けた大きな一歩である。このように本論文は、独創的および新規性において高い学術的価値をもっており、その成果はさらに社会貢献に繋がることが期待できる。したがって、審査委員会は本論文が博士（農学）の学位論文として十分な価値を有すると認め、論文審査に合格と判定した。