

別紙 1－1

論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

氏 名 荒木 映莉乃

論 文 題 目

癌細胞の形質における $\alpha 2, 8$ -シアル酸転移酵素の機能解明

論文審査担当者

主査 名古屋大学教授 佐藤ちひろ

委員 名古屋大学教授 北島健

委員 名古屋大学助教 羽根正弥

委員 名古屋大学助教 呉 迪

委員 名古屋大学教授 岡島徹也

論文審査の結果の要旨

細胞の表面は、タンパク質や脂質に結合した糖鎖に厚く覆われており、細胞が癌化すると糖鎖構造が変化する。細胞の癌化にともなう糖鎖構造の変化として、タンパク質に結合した N 型糖鎖や O 型糖鎖は高分岐化すること、脂質に結合した糖鎖は短くなること、シアル酸をもつ糖鎖が全体的に増加することが知られている。糖鎖構造の変化は、細胞間の相互作用、細胞膜の流動性や細胞内へのシグナル伝達経路に影響を及ぼし、細胞の増殖異常や癌の転移に関与する。特に、酸性糖のシアル酸は、癌細胞の増殖、浸潤や転移、炎症の促進等の癌の悪性形質と深く関わっている。シアル酸は糖鎖の非還元末端に存在しており、多くがモノシアル酸(monoSia)として存在するが、monoSia にさらにシアル酸が付加し、オリゴ・ポリシアル酸(oligo/polySia)として存在することもある。シアル酸量の調節は、シアル酸を付加するシアル酸転移酵素と、シアル酸を除去するシアリダーゼによって主に行われおり、癌細胞におけるシアル酸の増大は、シアル酸転移酵素の活性によるものと考えられる。シアル酸転移酵素には、monoSia を生合成する酵素群(ST3Gal、ST6Gal 及び ST6GalNAc)と、シアル酸上にシアル酸を転移し、oligo/polySia を生合成する α 2,8-シアル酸転移酵素(ST8Sia)がある。monoSia 構造を生合成するシアル酸転移酵素と癌との関係については、多くの報告がある一方で、癌細胞の増殖や転移に関する、oligo/polySia 構造に関する報告は少なく、シアル酸転移酵素の違いによる、癌細胞の形質の違いは、ほとんど解析されていない。そこで本論文では、複合糖質のシアル酸上に α 2,8 結合でシアル酸を転移し、oligo/polySia 構造を生合成する、St8sia ファミリーと癌の関係を明らかにすることを目的とした。

第 2 章では全 6 種類の α 2,8-シアル酸転移酵素(St8sia1-6)の悪性形質に与える影響を明らかにすることを目的とした。転移や浸潤の研究において、癌細胞のモデルとして使用される B16 マウスメラノーマ細胞に St8sia1-6 をそれぞれ過剰発現させ、安定発現株を樹立し、それらの細胞を用いて細胞の増殖能、細胞の浸潤能、足場非依存的増殖能及び遺伝子変化を解析した。細胞の増殖能は、St8sia1、St8sia4、St8sia6 の発現により増大した。細胞の浸潤能は、St8sia1、St8sia2、St8sia4、St8sia6 の発現により増大した。足場非依存的増殖能は、St8sia4 あるいは St8sia6 の発現により増大した。これらの結果から、 α 2,8-シアル酸転移酵素の中でも特に St8sia4 及び St8sia6 の発現が癌細胞の悪性形質を増大させることが初めて明らかになった。St8sia2 と St8sia4 の 2 種類のポリシアル酸転移酵素により polySia は生合成されるが、癌細胞の形質において、St8sia4 の発現がより多くの癌細胞の形質の悪性化に寄与していた。また一方で、浸潤能においては、St8sia2 と St8sia4 の発現により共通して増大することがわかった。

第 3 章では St8sia2 及び St8sia4 が癌細胞の形質に対してどのように機能的差を生じさせるのか、ポリシアル酸転移酵素(polyST)とその産物である polySia に着

目し、そのメカニズムの解明を行った。まず、B16 マウスメラノーマ細胞において、St8sia2 あるいは St8sia4 の発現がどのような糖鎖構造の変化を引き起こすのかを解析した。その結果、両酵素共に細胞表面に polySia を発現させること、糖脂質上ではなく主にタンパク質上に polySia を合成していること、また主要な担体タンパク質が NCAM であることが明らかになった。次に、polySia の有無が癌細胞形質(増殖能、浸潤能、足場非的増殖能)に及ぼす効果について polySia 特異的酵素(endoN)を用いて解析した。その結果、遊走能には効果をもたなかったが、増殖能については、St8sia2 ではなく St8sia4 の発現が polySia の有無に関わらず細胞増殖速度を増大させた。この増殖速度の増大は polySia 非依存的であり、St8sia4 の polySia 合成活性は関与しないと考えられる。そこで St8sia4 の低活性型酵素を発現させて細胞増殖能を解析した。その結果、St8sia4 は endoN では切断され抗 polySia 抗体では検出されない大きさを持つ oligoSia 構造を合成しており、その構造が増殖能の増大に寄与する可能性が示唆された。浸潤能については、polyST で共通して、polySia 依存的に浸潤能が増大した。浸潤能にはマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)の活性化が関与することが知られており、その polySia との相互作用が示唆された。足場非依存的増殖能に関しては、St8sia4 で polySia 依存的に増大した。また、St8sia2 と比較して St8sia4 発現細胞では癌関連遺伝子の発現が増大することから、どちらの polyST が発現するかによって、遺伝子発現が異なることがわかった。

第4章では機能未知であり、糖脂質末端にジシアル酸を転移し、複雑なガングリオシドを生合成するシアル酸転移酵素 St8sia5-S,-M,-L 変異体の局在と特性の解析を目指した。シアル酸転移酵素は、ゴルジ体に局在するものと考えられてきたが、St8sia5-M と St8sia5-S は ER に局在していることが新たに判明した。また、St8sia5 の部分配列欠失変異体を作成して調べた結果、Stem 領域に局在制御に重要な 12 アミノ酸配列の存在を見出した。

以上、荒木映莉乃は α 2,8-シアル酸転移酵素と癌の関係を明らかにし、特に癌形質に関与する酵素を特定した。また、ポリシアル酸を生合成する酵素の悪性化メカニズムの制御機構の一部を明らかにした。加えて α 2,8-シアル酸転移酵素の一部が ER 局在をすることを明らかにした。これらの研究成果に基づいて、今後、 α 2,8 シアル酸転移酵素遺伝子や酵素自身、そしてその産物を制御することが可能になれば、癌における新たな早期診断・治療法の開発につながることを期待される。このように本研究は基礎および応用科学における今後の展開に高いポテンシャルをもつ。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。