

論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

氏 名 岩 木 佑 弥

論 文 題 目

デアミノノイラミン酸の細菌由来新奇代謝
酵素および哺乳類における輸送経路の解析

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	名古屋大学准教授	邊 見 久
委 員	名古屋大学准教授	灘 野 大 太
委 員	名古屋大学准教授	柴 田 貴 広

論文審査の結果の要旨

シアル酸は糖鎖の非還元末端に存在する酸性 9 炭糖であり、受精、発生、免疫、神経形成など多様な生物学的機能に重要な役割を果たす。シアル酸には *N*-アセチルノイラミン酸 (Neu5Ac)、*N*-グリコリルノイラミン酸 (Neu5Gc)、デアミノノイラミン酸 (KDN) の 3 大分子種が存在し、細菌から哺乳動物まで幅広く分布している。この中で、Neu5Ac と Neu5Gc については種々の側面から数多くの研究が行われているのに対して、1986 年、新規単糖として発見された KDN については、その機能の理解や利用応用に関する研究例も殆どなく立ち後れている。その原因として、KDN に特異的に作用するプローブが少ないことや、KDN の代謝や輸送に関する知見が乏しい現状が考えられる。そこで本研究は、KDN の機能に関する基礎及び応用研究の進展を目的として、KDN に特異的なプローブの開発と哺乳類細胞における KDN の細胞内への取り込み機構の解明に取り組んだ。

1. 細菌由来の KDN 残基の加水分解酵素の発見と性質： 細菌の中には、シアル酸残基の加水分解酵素シアリダーゼによって宿主のシアル酸を利用する種が多数報告されている。この細菌シアリダーゼは糖鎖の非還元末端に存在するシアル酸を遊離させる酵素として広くシアル酸研究に用いられている。殆どの細菌シアリダーゼは、Neu5Ac および Neu5Gc 残基は加水分解できるが、KDN 残基には作用できないため、KDN 含有糖鎖特異的なシアル酸機能研究には不向きである。そこで本研究では KDN だけを遊離する酵素 KDNase の開発を目的として、まず、その酵素の存在が示唆されているグラム陰性菌 *Sphingobacterium* 属のシアリダーゼの探索を行った。その結果、*Sphingobacterium* sp. strain HMA12 から Neu5Ac、Neu5Gc、KDN 全てを基質とする KDN-sialidase を発見した。この KDN-sialidase は α 2,3-、 α 2,6-、 α 2,8-、 α 2,9 結合したシアル酸を基質にできる幅広い基質特異性を持ち、至適 pH を 7.0 に持つことが明らかになった。また、Neu5Ac 及び KDN 残基の加水分解に対する遷移状態中間体ホモログ阻害剤による阻害効果、および酵素の活性中心に面するチロシン残基の点変異体の効果がいずれも同じであることから、この酵素は同一の活性ポケットにより Neu5Ac および KDN を認識していることが示唆される。さらに、活性ポケットのシアル酸炭素 5 位の置換基周辺の空間を縮小させる変異体酵素 T177W は、KDN よりも Neu5Ac への活性が高い野生型と異なり、逆に Neu5Ac よりも KDN への活性が高くなった。シアル酸分子種の認識特異性は、活性ポケットのシアル酸炭素 5 位周辺の空間の大きさによって制御されることが示唆される。次に、誘導酵素として KDNase をもつことが知られている別種の *Sphingobacterium* 属菌株の全ゲノム解析を行った。細菌シアリダーゼの保存配列の Asp box (S-X-D-X-G-X-T-W; X は任意のアミノ酸) を持つ 6 つのシアリダーゼ候補遺伝子を大腸菌に発現させて、その活性を測定した。その結果、そのうちの 1 つが KDNase 活性を示すことがわかり、世界で初めて KDN 残基のみを特異的に加水分解する KDNase の配列が同定された。この KDNase はデータベース上に登録されていない新規酵素であった。また、至適 pH を 6.0 と 8.0 の 2 点に持つ興味深い性質があることも見出された。本研究に

よって KDN を基質にできる 2 つの新奇シアリダーゼを発見することができ、これらの酵素は KDN 含有糖鎖の機能解析を容易にするものと期待される。

2. 哺乳類細胞における KDN 単糖の取込経路と代謝運命の解析: シアル酸は親水性が高いため細胞膜を自由に透過できないが、哺乳類細胞によって細胞内へと取り込まれることが知られている。Neu5Ac、Neu5Gc 単糖の取込については、主としてマクロピノサイトーシスおよびカベオラ依存性エンドサイトーシスが関与することが示唆されているが、KDN 単糖の取込機構については全く報告がない。そこで本研究では、まず、各種取込阻害剤等を用いて KDN 取込機構の解析を行った。また、同時に Neu5Gc 単糖の取込機構を解析することで、KDN との取込機構の違いを調べた。その結果、マウスメラノーマ B16 細胞において、KDN はトランスポーター、クラスリン依存性エンドサイトーシス、カベオラ依存性エンドサイトーシスによる選択的取込、マクロピノサイトーシスによる非選択的な取込が関与することが示された。また、Neu5Gc 単糖の取込みについても、上述の 2 種類の機構に加えてトランスポーターによる取込が起こることが示された。すなわち、KDN 単糖にはクラスリン依存性エンドサイトーシスで取込まれるという独自の性質があることが明らかとなった。

次に、取り込まれた KDN の代謝運命について解析を行った。KDN の代謝酵素としてシアル酸ピルビン酸リアーゼ (SPL) が知られている。SPL は *in vitro* において KDN を Man とピルビン酸へ分解する活性、また、その逆反応である合成活性を持つが、細胞内における作用は明らかにされていない。また、哺乳類細胞を Man 含有培地で培養すると細胞内 KDN 量が増加することが知られている。しかし、その後の KDN の命運は不明である。そこで、SPL 発現が脆弱である B16 細胞に SPL 遺伝子を導入し、KDN 含有培地、または Man 含有培地によって増加した細胞内 KDN の変動を解析した。その結果、Man 添加により増加した細胞内 KDN は経時的に減少する一方、KDN 添加により増加した細胞内 KDN は一定量細胞内に残存することがわかった。この理由は、培地の KDN は多様なエンドサイトーシスによって取り込まれ、細胞内ではエンドソーム、リソソームの内腔に一旦貯留するためであり、さらに、SPL 導入細胞においてはサイトゾル内の KDN が分解されることでリソソームからサイトゾルへの KDN 輸送が促進されてリソソームにおける KDN の蓄積は回避されると考えられる。また、B16 細胞を Man 添加培地で培養すると培地に KDN が検出されたことから、細胞内 KDN の一部が培地へ排出される新しい機構の存在も示唆される。

以上、本研究によって、岩木佑弥はあまり生物学的意義の解明が進んでいないシアル酸の一種である KDN に着目して、細菌由来の新奇シアリダーゼとして KDN-sialidase と KDNase の発見と性質の解明を行い、また哺乳類における KDN の取込みとその命運を初めて明らかにした。また、本研究の成果は生物におけるシアル酸代謝を巡る基礎および応用科学研究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。