

# 博士學位論文

内容の要旨及び審査の結果の要旨

第16号

2001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13年3月23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（いわゆる課程博士）によるものであることを示す。

目次

1 鳥羽 慎也

論文内容の要旨 .....	1
論文審査の結果の要旨 .....	3

氏名(本籍)	鳥羽 慎也(京都府)
博士の専攻分野の名称	博士(生物工学)
報告番号	甲第13号(学位記番号 甲工第2号)
学位授与年月日	平成13年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
論文題目	Studies on Mucin Carbohydrates —Cancer-associated alteration— —Initiation of biosynthesis—
審査委員	主査 岡山 實 教授 副査 米澤 勝衛 教授 中田 博 教授

### 論文内容の要旨

タンパク質はリボソームで合成された後に細胞内で様々な修飾を受け、機能を持った成熟タンパク質となる。タンパク質への糖鎖の付加はそれらの修飾反応の一つである。糖鎖は糖とタンパク質の結合様式により何種類かに分類されるが、申請者はGalNAc $\alpha$ 1 $\rightarrow$ Ser(Thr)の糖結合構造を持つムチン型糖鎖について、癌細胞で発現するムチン型糖鎖の解析、ムチン型糖鎖合成の開始反応を触媒する酵素遺伝子のクローニングとその脳での発現分布の研究を行い、以下の知見を得た。

I. 細胞の癌化に伴う糖鎖構造の変化は、特異的な単クローン抗体を用いて感度よく検出される。申請者は、黒坂らがウシ顎下腺ムチンに対して作製したムチン型糖タンパク質に特異的に発現する卵巣癌関連糖鎖抗原を認識する単クローン抗体、6G9の認識するムチン型糖鎖の構造を詳細に解析した。ELISA法を用いて種々のムチンやオリゴ糖と6G9抗体の反応性を解析することにより、6G9が、O-アセチル化シリアルTn抗原を認識することを明らかにした。とくに、6G9の抗原への結合にはシアル酸のO-アセチル基が不可欠であった。このことは卵巣癌細胞では、細胞の癌化にともないしばしば観察されるシリアルTn抗原の高

い発現に加え、シアル酸のO-アセチル化も亢進していることを示すものである。

II. ムチン型糖鎖の生合成はUDP-GalNAc: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase (GalNAc transferase) により、UDP-GalNAcからタンパク質中のSer, Thr残基にGalNAcが転移されることで始まる。GalNAc transferaseはタンパク質中のムチン型糖鎖の位置と数を決定する重要な酵素であり、いくつかのアイソザイムが存在する。これらのアイソザイムは異なる基質特異性と組織分布を持つことから、それぞれの組織での糖鎖の生合成が、これらのアイソザイムの発現様式により決定されるものと思われる。本研究では、データベースに存在するGalNAc transferaseとホモロジーを有するESTクローンを利用して新規GalNAc transferase遺伝子の単離を行った。

データベースから得た部分cDNA配列をもとにして、RACE, PCR法を用いて、ヒトおよびラット脳 cDNAより、新規GalNAc transferase遺伝子をクローニングし、それぞれhGalNAc-T9, rGalNAc-T10とした。ノーザンブロッティング分析より、これら二つの酵素はともに脳にのみ特異的に発現するユニークなアイソザイムであることを明らかにした。現在までにクローニングされたアイソザイムには、このような脳に高い特異性を持つ例は知られておらず、これら二つの酵素が脳特異的なムチン型糖鎖生合成の解明に役立つものと期待される。

III. GalNAc transferaseはそれぞれ特有の組織特異性を持つが、各組織でのアイソザイムの詳細な発現パターンの解析はなされていない。申請者は、GalNAc-T1, T3, T4, T5および脳特異的なT10のラット脳内での発現分布を*in situ* hybridization法を用いて詳細に解析した。また、妊娠19日のラット胎児での発現分布の解析も併せて行った。

GalNAc-T1は脳、胎児のほぼ全領域で発現していた。GalNAc-T3, T4はそれぞれ海馬、脈絡叢にのみ発現し、GalNAc-T5の脳での発現はなかった。一方、GalNAc-T10は、小脳、海馬、大脳皮質、視床で発現が見られ、さらにその発現は神経細胞特異的であった。また、GalNAc-T10は胎児での発現も脳神経系に特異的であった。GalNAc-T5を除くアイソザイムのいずれも脳で発現していたが、その発現パターンは各アイソザイムに特異的であった。脳のそれぞれの領域は異なった組合わせのGalNAc transferaseを発現しており、脳はこの組合わせの違いから、細胞特異的にムチン型糖鎖の付加反応を行うものと考えられた。

## 論文調査結果の要旨

複合糖質の糖鎖は細胞間認識の標識として機能していることが多くの研究により示されている。これと符合してその糖鎖構造は個体発生、創傷治癒、腫瘍組織形成等の動的過程において劇的な変化を示す。このような機能をもつ複合糖質は自然界において糖タンパク質、糖脂質、プロテオグリカンの分子形態で存在している。糖タンパク質は糖鎖のタンパク質への結合様式の違いによりN-グリコシド型（血清型）とO-グリコシド型（ムチン型）に分類される。

本研究は癌関連糖鎖抗原の一群を構成するGalNAc  $\alpha$ 1-Ser/Thrの結合様式をもつムチン型糖鎖について、1) その糖鎖抗原の構造解析、2) 本糖鎖生合成の開始反応を触媒する酵素遺伝子のクローニング、3) 本酵素アイソザイムの発現組織と発現像を明らかにすることを目的としている。

第一の研究課題については、本申請者の所属する研究室で開発されたムチン型糖鎖特異的単クローン抗体、6G9の識別するエピトープ構造がO-アセチル化シアリルTn抗原であることを示すことにより、上皮細胞の癌化はシアリルTn抗原の高発現に加え、シアリル酸のO-アセチル化も亢進していることを明らかにした。引き続いて行った、ムチン型糖鎖生合成の開始反応を触媒するUDP-GalNAc:polypeptide GalNAc-transferaseの遺伝子クローニングに関する研究では、データベースから得た部分cDNA配列をもとにRACE、PCR法を用いてヒトおよびラット脳cDNAより新規GalNAc-transferase遺伝子をクローニングした。これまでに8種類のアイソザイムがクローニングされていることから、これら新規アイソザイムをそれぞれhGalNAc-T9、rGalNAc-T10と命名した。さらに、ノーザンブロット分析により、これら2種類のアイソザイムはいずれも脳特異的な発現を示すことを示した。これまでにクローニングされたアイソザイムの発現は各々組織特異性を持つことが示されているが、各組織内での詳細な発現像は明らかにされていない。本論文では*in situ* hybridization法によりラット成体の脳切片、胎児の矢状断切片を用いて、これまでにクローニングされているGalNAc-T1、-T3、-T4、-T5の発現分布を対照として解析し、rGalNAc-T10の発現分布が胎児、成体ともに脳に限定されており、小脳、海馬、大脳皮質、視床の神経細胞に特異的に発現されていることを明らかにした。これらの研究結果は、rGalNAc-T10が合成開始に関与するムチン型糖鎖の脳神経細胞における存在を示唆すると共に、それを発現している神経細胞の動態制

御に深く関わっていることを示唆するものであり、糖鎖機能の解明に新しい研究の糸口を切り開いたものとして高く評価される。

以上の調査結果に基づき、申請論文「ムチン型糖鎖に関する研究：糖鎖の癌性変異と糖鎖生合成開始機構」は、ムチン型糖鎖の化学構造及び生物学的機能の解明に寄与するところ大であり、博士学位に相応しい内容を持つと判定する。