

学 位 論 文 題 名

Cell/ Tissue Glycomics and its Regulation

(細胞／組織のグライコミクスとその制御に関する研究)

学位論文内容の要旨

糖タンパク質は付加した糖鎖の基本構造やその部位によって分類され、そのうちアスパラギン(N-)結合型糖鎖はタンパク質の品質管理や細胞の発生、分化、増殖、がん転移、免疫などの生命現象に深く関わっていることが知られている。N-結合型糖鎖はその生合成経路に特徴があり、ノックアウトマウスや様々なプロセッシング阻害剤を用いた研究により、生合成経路の解明がなされてきた。N-結合型糖鎖は未成熟なハイマンノース型糖鎖からハイブリッド型糖鎖を経て、成熟型であるコンプレックス型糖鎖へとプロセッシングを受けるが、末端の修飾構造は発生に伴って顕著に変動することが知られており、がん化においても非還元末端の修飾構造の変化が大きく関与している。糖転移酵素や糖加水分解酵素の厳密な発現制御が細胞や組織特異的な糖鎖修飾を制御している。例えば、 α -マンノシダーゼ II (MII) および Hx(MX) はハイブリッド型糖鎖からコンプレックス型糖鎖へと変換する際の鍵となる酵素で、同じ基質特異性を持つが、それぞれのノックアウトマウスは異なる表現型を示す。さらに MII/MX ダブルノックアウトマウスは肺形成不全により胎生 15.5 日以降から産後にかけて致死の表現型を示すことが報告されている。一方、糖鎖修飾阻害剤としてのフッ素化 N-アセチルグルコサミン誘導体はがん細胞の接着に関与するポリラクトサミン鎖やシアリルルイス X 構造などの合成を阻害する事が報告されているが、その阻害メカニズムは解明されていない。

糖鎖修飾は細胞・組織特異的に起こり、細胞外の環境変化すなわち薬剤などによっても影響を受けるため、細胞・組織のグライコミクスはさらなる生命現象の解明には必要不可欠である。近年、質量分析法(MS)がグライコミクスの分野に導入され発展を続けている。一方で、細胞や組織からの糖鎖の精製には多大な手間と労力が必要とされてきたが、当研究室において開発された糖鎖捕捉ビーズを用いた効率的濃縮法(グライコブロットティング法)により、短時間で微量糖鎖の精製および濃縮が可能となった。そこで私は、発生における糖鎖構造の制御機構を解明するため、MII/MX ダブルノックアウトマウス胎児の組織グライコミクスを行うこととした。また、がん細胞に対するフッ素化単糖誘導体の糖鎖修飾阻害の制御機構を解明するため、細胞グライコミクスおよびそれに基づいた細胞生物学的アッセイを行い、ホルモン療法不応性前立腺がん細胞に対する化学療法剤としての有効性を評価した。

第一章では、N-結合型糖鎖の生合成経路と発生・がん化に伴う糖鎖変化ならびに細胞・組織のグライコミクスについて簡単にまとめ概説した。

第二章では、2次元 HPLC 糖鎖マップ法と MALDI-TOF/TOF MS を組み合わせた体系的グライコミクスにより、MII/MX ダブルノックアウトマウス胎児の N-結合型糖鎖のプロファイ

リングを行った。MALDI-TOF/TOF MS において Matix-dependent selective fragmentation (MDSF)法を導入する事で、遺伝子改変のために生じた擬似コンプレックス型糖鎖である新規糖鎖構造を決定した。また、詳細な糖鎖構造解析により野生型、MII ノックアウト、MX ノックアウトおよび MII/MX ダブルノックアウトマウスでハイマンノース型糖鎖が一定の割合を示したことから、MII および MX は発生の過程で下流の産物であるコンプレックス型糖鎖にのみ影響することを明らかにした。また、MII/MX ダブルノックアウトマウスはコンプレックス型糖鎖を全く発現していなかったことから、MII と MX のみがハイブリッド型からコンプレックス型へと変換できる酵素であることを証明した。

第三章では、グライコプロッティング法によるヒト前立腺がん細胞のグライコミクスを行い、フッ素化 *N*-アセチルグルコサミン誘導体の糖鎖修飾阻害の制御機構について評価した。さらに細胞内糖ヌクレオチドの組成分析を行い、フッ素化 *N*-アセチルグルコサミン誘導体は細胞内に取り込まれた後 UDP 化され細胞内に蓄積する事で細胞内 UDP-GlcNAc 濃度を攪乱し、*N*-結合型糖鎖の分岐度を減少させることを明らかにした。

第四章では、フッ素化 *N*-アセチルグルコサミン誘導体の前立腺がん細胞の増殖抑制機構について評価した。アノマー位にのみ水酸基を持つ *N*-アセチルグルコサミン誘導体は、完全アセチル体に比べて著しい増殖抑制効果を発揮することを発見し、細胞周期を G2/M 期で停止させる事でがん細胞の増殖を抑制することを明らかにした。第三章でのグライコミクスと合わせて、アノマー位水酸基を露出した新規フッ素化 *N*-アセチルグルコサミン誘導体は、細胞内糖ヌクレオチドの攪乱と G2/M 期での細胞周期停止という2つの効果によって、前立腺がん細胞に対する高い増殖抑制効果を発揮することを示した。

第五章においては第一章から第四章までの総括とこれからの展望についても短く述べた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 西 村 紳一郎

副 査 教 授 出 村 誠

副 査 教 授 菅 原 一 幸 (生命科学院)

副 査 准教授 山 下 匡 (生命科学院)

学 位 論 文 題 名

Cell/ Tissue Glycomics and its Regulation

(細胞／組織のグライコミクスとその制御に関する研究)

複合糖質は付加した糖鎖の基本構造やその部位によって分類され、そのうちアスパラギン (N-)結合型糖鎖はタンパク質の品質管理や細胞の発生、分化、増殖、がん転移、免疫などの生命現象に深く関与している。発生やがん化に伴って顕著に変動する N-結合型糖鎖修飾は、糖転移酵素や糖加水分解酵素の厳密な発現制御によって細胞・組織特異的に制御され、細胞外環境変化すなわち薬剤などによっても影響を受けるため、細胞・組織のグライコミクスはさらなる生命現象の解明には必要不可欠である。本論文は、培養細胞および生体組織のグライコミクスから遺伝子改変や糖鎖修飾阻害剤による糖鎖構造の変化を検出することで、表現型や薬物応答とその制御メカニズムを関連づけることを目的とした研究であり、糖鎖生物学上大きな意義がある。

N-結合型糖鎖に特徴的な生合成経路は、種々のノックアウトマウスやプロセッシング阻害剤を用いた研究により解明されてきたが、N-結合型糖鎖プロセッシング経路における鍵酵素である α -マンノシダーゼ II (MII)ノックアウトマウスから得られた知見により MII を迂回する経路の存在が示唆されていた。著者は MII および MII のアイソザイムである α -マンノシダーゼ IIx(MX)ノックアウトマウス胎児の組織グライコミクスを行い、詳細な構造解析を行った結果、MII の迂回経路が MX であることを証明した。また、従来から用いられている 2 次元糖鎖マップ法に、MALDI-TOF/MS におけるマトリックス依存選択的フラグメント化 (MDSF)法を導入することで微量試料での未知糖鎖構造解析に成功し、遺伝子改変により発現した 3 種類の新規糖鎖構造を決定した。

糖鎖修飾阻害剤としてのフッ素化 N-アセチルグルコサミン誘導体はがん細胞の接着に関

与するポリラクトサミン鎖やシアリルルイス X 構造などの合成を阻害する事が報告されているが、その阻害メカニズムは解明されていなかった。著者は、微量の未精製試料から糖鎖の精製濃縮が可能なグライコプロッティング法を細胞試料へと応用し、ヒト前立腺癌細胞のグライコムクスを行った。その結果、フッ素化 *N*-アセチルグルコサミン誘導体が代謝阻害剤として糖鎖修飾を制御していることを見いだした。また、種々の生化学的手法により、フッ素化 *N*-アセチルグルコサミン誘導体のアノマー位水酸基が細胞増殖抑制効果に大きく寄与していることを示し、細胞周期を G2/M 期で停止させることを明らかにした。さらに、実際に臨床で使用されている抗がん剤との比較を行い、アノマー位水酸基を有するフッ素化 *N*-アセチルグルコサミン誘導体の新規抗がん剤としての有用性を示した。

本論文は生体組織や培養細胞におけるグライコムクスの手法を確立し、遺伝子改変や阻害剤による糖鎖修飾の制御およびそれに付随した生体反応を明らかにしたものである。糖鎖生物学のみならず医学・創薬科学を始めとした各分野にも大きな波及効果が期待され、癌をはじめとするさまざまな疾患の病態解明や創薬へ大きく貢献するものと確信している。

よって著者は、北海道大学博士(理学)の学位を授与される資格があるものと認める。