

学位論文題名

Glycoform-focused reverse genomics of skin

(皮膚のグライコフォームフォーカスドリバースゲノミクス)

学位論文内容の要旨

タンパク質の機能は、その発現量の調節に加え、翻訳後のプロセッシングや様々な修飾によって制御されていることが知られている。翻訳後修飾の実態を知ることは、タンパク質の活性や局在、およびその制御機構を知る上で重要である。糖鎖修飾は代表的な翻訳後修飾であり、タンパク質の高次構造形成、局在、活性、寿命など様々な局面でタンパク質の機能を調節し、細胞分化、受精、免疫、細胞間接着やシグナル伝達などの生命現象に深く関わっている。

糖鎖修飾は、糖転移酵素等により糖が付加されることにより起こるため、構造的に著しく多様で複雑な上に、マイクロ不均一性がしばしば認められる。加えて、比較的少量の試料量を要するため、実際に糖鎖構造や修飾部位が詳細に解明された例は少ない。急速に発展した質量分析法により、生体分子の迅速な解析が可能になり、糖タンパク質解析においても主流の分析法になりつつある。糖タンパク質の糖鎖のもつ生物学的機能の解明を目指し、グライコプロテオミクスの概念が台頭し、それを具現化するための様々な方法論の開発が進められているが、糖鎖構造と修飾部位をハイスループットかつ網羅的に解析することは困難であり、新たな戦略が必要とされている。近年、グライコブロットティング法と呼ばれるケモセレクトィブな糖鎖捕捉反応に基づいて、生体試料由来糖鎖の網羅的かつ定量的なプロファイル取得を大幅に高速化する技術が開発された。グライコブロットティング法による糖鎖情報を基に、興味をもたれた糖鎖のキャリアータンパク質同定し、さらに上流のゲノム情報に遡る研究方法「グライコフォームフォーカスドリバースゲノミクス (GFRG)」が提唱され、同定されたタンパク質および複雑な糖鎖情報と遺伝子情報を組み合わせ、糖鎖の生物学的意義の解明や新規疾患バイオマーカー探索が始まっている。

皮膚バリア機能の主体を成す表皮は、表皮基底膜構造を介して真皮と接着し、近接する表皮細胞同士はデスモソームと呼ばれる接着班で強固に結合している。基底層で分裂増殖した表皮細胞は、分化・成熟しながら上層へ移行する。これを角化といい、機能的にも形態的にも緻密かつダイナミックな変化が進行する。接着班は角質へ移動するに従い、ラメラ顆粒に存在する各種分解酵素によって分解され、徐々に剥離・脱落する。糖タンパク質は細胞の分化や接着に関することから、表皮のグライコプロテオミクスはタンパク質糖鎖修飾の機能的役割に新たな知見を与えると考えられる。表皮のプロテオミクスはこれまでにいくつか報告例があるが、糖鎖部分の情報は不明のままである。表皮の糖鎖情報を得る試みとして、レクチンや抗糖鎖抗体を用いた組織化学的解析の報告は多数存在するが、糖鎖の詳細構造や量比を知ることは困難である。

本研究は、皮膚をモデルとして GFRG を実践し、表皮における糖鎖の生物学的意義の一端を明らかにした。

はじめに、グライコブロットティング法に基づき新規に開発された、ヒドラジド基を高密

度に有する糖鎖捕捉担体および安定同位体標識した糖鎖誘導体化試薬を用いて、皮膚 *N*-結合型糖鎖の定量的糖鎖プロファイリングを行った。ヒトおよびマウスに共通した特徴として、表皮はハイマンノース型、真皮はコンプレックス型 2 本鎖糖鎖の比率が顕著に高いこと、表皮ではシアル酸やフコースによって修飾される糖鎖が減少し、比較的分子量の小さな糖鎖が相対的に増加する傾向があることを明らかにした。一方、ヒトでは *N*-グリコリルノイラミン酸が欠落しているため、すべてのシアル酸は *N*-アセチルノイラミン酸であったが、マウスでは *N*-グリコリルノイラミン酸であったが主体であった。さらに、非還元末端の種々のエピトープ構造が減少する中、マウスでは Gal α 1-3Gal エピトープを有する糖鎖、ヒトでは LacdiNAc 構造が例外的に表皮でのみ発現が認められた。 α 1-3 ガラクトース転移酵素は新世界サルや哺乳動物以外の多くに発現しているが、ヒトを含む旧世界サルの細胞や組織には存在しないため、ヒト表皮には Gal α 1-3Gal エピトープは認められなかった。グライコプロッティング法により、皮膚 *N*-結合型糖鎖の高精度な定量的プロファイル初めて明らかにすることが出来た。

表皮のハイマンノース型糖鎖で修飾されているタンパク質の同定に興味をもたれたため、トリプシン消化を施したマウス表皮からレクチンアフィニティークロマトグラフィーで糖ペプチドを選択的に濃縮した。逆相クロマトグラフィーを用いた off-line LC-MALDI-TOF/TOF により解析を行い、15 種類のハイマンノース型糖鎖を有する糖タンパク質を同定し、さらに個々の結合部位における糖鎖の不均一性も定量的に明らかにした。同定されたタンパク質の多くはリソソーム（ラメラ顆粒）もしくはデスモソームなどの接着分子に由来する膜タンパク質であった。リソソームタンパク質では、膜タンパク質ではほとんど認められないマンノース残基数が 4 以下の糖鎖の比率が高く、リソソームに存在するグリコシダーゼにより分解されているものと推測された。ラメラ顆粒は表皮顆粒層にあって脂質の供給に、デスモソームは角層細胞の接着に主な役割を担ういずれも表皮に特徴的な小器官であることから、表皮に認められた高いハイマンノース型糖鎖の比率は、表皮特異的なタンパク質が主にハイマンノース型糖鎖で修飾されていることによる可能性が考えられた。

同様の手法で、Gal α 1-3Gal エピトープを有する糖鎖修飾されているマウス表皮タンパク質同定を行ったところ、その多くは接着分子で糖鎖構造は部位特異的に制御されていた。接着分子の機能発現には *N*-結合型糖鎖の付加だけではなく、特定の構造を持つ *N*-結合型糖鎖の修飾も重要であることが強く示唆されている。マウス表皮接着分子が Gal α 1-3Gal エピトープで特異的に修飾される意義の解明を目的として、公開されているマイクロアレイデータから、表皮特異的に発現し糖鎖と結合するタンパク質の遺伝子を検索した。検索した 6 つの遺伝子のうちガレクチン 3 および 7 に関して、表面プラズモン共鳴センサーに固定した Gal α 1-3Gal エピトープとの相互作用を評価した結果、ガレクチン 3 が Gal α 1-3Gal エピトープの受容体であることを明らかにした。

最近、Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc から Gal α 1-3Gal を切断する Endo- β -Galactosidase C のトランスジェニックマウスが作製され、上皮細胞の増殖亢進と分化異常が原因と考えられる表皮の炎症・肥厚を生じ、生後 12 日までに半数が死亡するとの報告がなされた。これらの結果から、Gal α 1-3Gal エピトープを有する糖鎖で修飾されているマウス表皮接着分子が皮膚における表現系に関与している可能性が示唆され、GFRG の具体的展開により表皮における糖鎖の生物学的意義の一端が明らかとなった。

学位論文審査の要旨

主査	教授	西村 紳一郎
副査	教授	田中 勲
副査	教授	河野 敬一
副査	教授	綾部 時芳 (生命科学学院)
副査	教授	小布施 力史 (生命科学学院)
副査	准教授	山田 修平 (生命科学学院)

学位論文題名

Glycoform-focused reverse genomics of skin

(皮膚のグライコフォームフォーカスドリバースゲノミクス)

皮膚バリア機能の主体を成す表皮は、基底膜構造を介して真皮と接着し、近接する表皮細胞同士は強固に結合している。基底層で分裂増殖した表皮細胞は、分化・成熟しながら上層へ移行し、垢となって剥がれ落ちる。糖鎖修飾は、タンパク質の高次構造形成、局在、活性、寿命など様々な局面でタンパク質の機能を調節し、細胞分化、受精、免疫、細胞間接着やシグナル伝達などの生命現象に関わっている。表皮の糖鎖情報を得る試みとして、レクチンや抗糖鎖抗体を用いた組織化学的解析の報告は多数存在するが、糖鎖の詳細構造や量比、キャリアータンパク質、修飾部位を知ることは困難であった。

近年、生体試料由来糖鎖の網羅的かつ定量的なプロファイル取得を大幅に高速化する、グライコプロッティング法と呼ばれる技術が開発された。グライコプロッティング法による糖鎖情報を基にキャリアータンパク質を同定し、さらに上流のゲノム情報に遡る研究方法「グライコフォームフォーカスドリバースゲノミクス (GFRG)」が提唱され、糖鎖の生物学的意義の解明や新規疾患バイオマーカー探索が始まっている。

本研究では、皮膚 N結合型糖鎖に着目し、表皮はハイマンノース型、真皮はコンプレックス型 2 本鎖糖鎖の比率が顕著に高いこと、表皮ではシアル酸やフコースによって修飾される糖鎖が減少し、比較的分子量の小さな糖鎖が相対的に増加する傾向があることを初めて明らかにした。非還元末端の種々のエピトープ構造が減少する中、マウスでは Gal α 1-3Gal エピトープを有する糖鎖、ヒトでは LacdiNAc 構造が表皮でのみ発現が認められた。

表皮のハイマンノース型糖鎖で修飾されているタンパク質の同定に興味をもたれたため、マウス表皮トリプシン消化物をレクチンアフィニティークロマトグラフィーに供し、逆相クロマトグラフィーを用いた off-line LC-MALDI-TOF/TOF 解析により、タンパク質を同定した。同定されたタンパク質の多くはリソソーム (ラメラ顆粒) もしくはデスモソーム由来であった。ラメラ顆粒は表皮顆粒層にあって脂質の供給に、デスモソームは表皮細胞の接着に主な役割を担ういずれも表皮に特徴的な小器官であることから、表皮に認められた高いハイマンノース型糖鎖の比率は、表皮特異的なタンパク質が主にハイマンノ

ース型糖鎖で修飾されていることによる可能性が考えられた。

さらに、Gal α 1-3Gal エピトープを有する糖鎖修飾されているマウス表皮タンパク質同定を行ったところ、その多くは接着分子で糖鎖構造は部位特異的に制御されていた。マウス表皮接着分子が Gal α 1-3Gal エピトープ特異的に修飾される意義の解明を目的として、公開されているマイクロアレイデータから表皮特異的に発現し糖鎖結合能を有するタンパク質の遺伝子を検索し、表面プラズモン共鳴センサーに固定した Gal α 1-3Gal エピトープとの相互作用を評価した結果、ガレクチン3 が Gal α 1-3Gal エピトープの受容体であることを明らかにした。Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc から Gal α 1-3Gal を切断する Endo- β -Galactosidase C のトランスジェニックマウスが作製され、上皮細胞の増殖亢進と分化異常が原因と考えられる表皮の炎症・肥厚を生じるとの報告がなされているが、本研究で明らかとなった Gal α 1-3Gal エピトープを有する糖鎖で修飾されているマウス表皮接着分子がその表現系に関与している可能性が示唆された。

これを要するに、著者は、皮膚を用いて GFRG を具体的に展開し、N結合型糖鎖の定量的糖鎖プロファイルや修飾されるタンパク質について新知見を得たものであり、かつ表皮における糖鎖の生物学的意義の一端を明らかにするという成果も上げている。この知見は糖鎖生物学および皮膚科学に対して貢献するところ大なるものがある。

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あるものと認める。