

平成 21 年 12 月 21 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18770081
 研究課題名（和文） 生体防御因子としてのハト由来生物種特異的糖鎖遺伝子の同定と利用
 研究課題名（英文） Molecular cloning of pigeon α 1,4-galactosyltransferase
 研究代表者
 鈴木 詔子（SUZUKI NORIKO）
 東京大学・大学院新領域創成科学研究科・特任助教
 研究者番号：50401237

研究成果の概要：ガラビオース配列（Gal α 1-4Gal）は、哺乳類では糖脂質上に存在し尿路感染性大腸菌や志賀毒素が細胞に付着する際の標的分子となる。一方、ハトなどの鳥類ではガラビオース配列は糖タンパク質上に存在する。本研究では、糖タンパク質上のガラビオース配列を生成する新規のハト由来 α 1,4-ガラクトース転移酵素遺伝子を同定した。類似の配列を持つ酵素はヒトやニワトリにも存在するが、ハト由来の酵素は基質特異性が異なることを明らかにした。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,500,000	0	1,500,000
2007年度	1,100,000	0	1,100,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	330,000	4,030,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：糖鎖、酵素、遺伝子、生体防御、生物種特異的

1. 研究開始当初の背景

生体内において糖タンパク質や糖脂質として存在する糖鎖は、その多様な構造や発現様式に応じて様々な働きを持つ。例えば、糖脂質は一般に細胞の表面上に局在し、シグナル伝達や細胞内取り込み作用に関与することが知られている。一方、糖タンパク質は、細胞表面上、または細胞外に分泌された形で存在し、そのコアタンパク質の性質に応じて糖鎖の役割も多岐にわたる。

糖鎖の構造や発現様式は、生物種間で異なる場合がある。このような糖鎖は、生物が進化・多様化する過程で微生物などの感染を防ぐために、あるいは共生細菌との相互作用を円滑にするために取捨選択された糖鎖遺伝子の産物であると推測されている。しかし、生物種特異的な糖鎖遺伝子が生物の進化の過程でどのように獲得・喪失されたのか分子進化的に解析した研究は数少ない。

Gal α 1-4Gal 配列は、哺乳類において糖脂質上に存在することが知られている。その代表

的な例である Gb3 (Gal α 1-4Gal β 1-4Glc-セラミド) は様々な組織に発現し、尿路感染性大腸菌や志賀毒素が細胞表面に付着する際の標的分子となる。一方、これまでの研究から鳥類のうちハトやオウム、アナツバメなど新鳥類に属する種の多くに、Gal α 1-4Gal 配列が糖タンパク質上に存在することが明らかにされている。しかし、哺乳類や同じ鳥類でもニワトリやアヒルなどのキジカモ小綱およびダチョウやエミューなどの古顎下綱に属する種ではこの糖鎖配列を持つ糖タンパク質は見つかっていない。Gal α 1-4Gal 配列は、 α 1,4-ガラクトース転移酵素(以下 α 4GalT と略す)の作用により形成されると考えられるが、哺乳類の α 4GalT は糖脂質特異的に作用する可能性が高い。一方、ハトの α 4GalT は、少なくとも糖タンパク質に作用することが予想されるが、この糖転移酵素は未だ同定されていない。

2. 研究の目的

本研究では、生物種特異的な糖鎖である Gal α 1-4Gal 配列の発現がどのようなメカニズムで構築されたのか遺伝子レベルで解析するため、ハト α 4GalT をコードする遺伝子を同定し、他の生物種由来 α 4GalT 遺伝子と比較することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) cDNA クローニング

ハトの肝臓から mRNA を抽出し、得られた cDNA を哺乳動物細胞用発現ベクター pcDNA3.1(+) に組み込んだ。この cDNA ライブラリーを 293T 細胞にリポフェクトアミンで導入し、抗 P₁ 抗体(Gal α 1-4Gal β 1-4GlcNAc-特異的)および蛍光標識した二次抗体で細胞を染色した。セルソーターで Gal α 1-4Gal を発現している細胞を選別し、プラスミドを回収した。大腸菌で増幅させたプラスミドを再度 293T 細胞に導入し、陽性細胞からプラスミドを回収した。この操作を 3 回繰り返し、最終的に単一の大腸菌コロニーから cDNA を単離した。

(2) 糖転移酵素の基質特異性の解析

in vitro の基質特異性の解析

N 末端側に存在する細胞質内部位および膜貫通部位を除き C 末端側に存在する酵素の活性部位をコードする領域を PCR によって増幅し、哺乳動物細胞発現用のベクター pFLAG-CMV に組み込んだ。293T 細胞に導入して可溶性の α 4GalT を発現させ、培養上清から抗 FLAG 抗体カラムを用いて精製した。様々な構造の糖鎖を基質として、³[H]-標識し

た UDP-Gal を用いて酵素活性を測定し、この酵素の基質特異性を決定した。

in vivo の基質特異性の解析

哺乳動物細胞用発現ベクター pcDNA3.1(+) に組み込まれた全長の α 4GalT 遺伝子を 293T 細胞に導入した。48 時間後に細胞表面を抗 P₁ 抗体または抗 Gb3 抗体で染色し、セルソーター(FACS)で発現している糖鎖を検出した。また、遺伝子導入した細胞の抽出液をウェスタンブロット分析し、糖タンパク質上に存在する糖鎖を検出した。

(3) 他の生物種由来 α 4GalT との比較

NCBI のデータベースからハト α 4GalT 遺伝子と相同性のある遺伝子を検索した。分子系統樹は近隣結合法により作製し、ブートストラップ法により検定した。

4. 研究成果

(1) cDNA クローニング

発現クローニングによって得られた cDNA の配列を調べた結果、この遺伝子が 360 個のアミノ酸残基から成るタンパク質をコードしていることが明らかになった。先にクローニングされていたヒト α 4GalT とアミノ酸配列のレベルで 58.2% の相同性があり、またニワトリ由来の α 4GalT ホモログ(推定)と 68.0% の相同性があった。

(2) 糖転移酵素の基質特異性の解析

in vitro の基質特異性の解析

様々な単糖およびオリゴ糖を用いて、可溶性のハト α 4GalT の基質特異性を解析した。その結果、ガラクトース(単糖)やガラクトースを非還元末端に持つオリゴ糖に対して、糖転移反応が検出されたが、ガラクトースを非還元末端に持たない単糖やオリゴ糖には転移反応が検出されなかった。N-アセチルラクトサミン(Gal β 1-4GlcNAc)に対する糖転移反応を基準にすると、ラクトース(Gal β 1-4Glc)はその約 0.6 倍、4'-ガラクトシルラクトース(Gal β 1-4Gal β 1-4Glc)は約 3 倍の糖転移反応が検出された。Gal β 1-4Gal 配列がハト α 4GalT の良い基質であることは、ハトの組織中に Gal α 1-4Gal β 1-4Gal 配列が存在することと関連があると考えられる。また、type I の N-アセチルラクトサミン(Gal β 1-3GlcNAc)は type II (Gal β 1-4GlcNAc) に比べて 0.08 倍の糖転移反応しか検出されなかった。さらに、type II (Gal β 1-4GlcNAc) にフコースが付加した場合、Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc では約 0.1 倍、Fuc α 1-2Gal β 1-4GlcNAc では 0.01 倍以下の糖転移反応しか検出されなかったことから、フ

コシル化がハト α 4GalT の反応を阻害することが示唆された。

in vivo の基質特異性の解析

ハト α 4GalT 遺伝子を 293T 細胞に発現させ、細胞表面上の糖鎖を抗体染色したところ、抗 P₁ 抗体陽性細胞が検出されたが、抗 Gb3 (糖脂質) 抗体では陰性であった(図 1 A)。一方、ヒトおよびニワトリ由来 α 4GalT 遺伝子(ホモログ)を導入した細胞では、抗 Gb3 抗体陽性の細胞が増加した。これらの細胞抽出液をウェスタンブロット分析したところ、抗 P₁ 抗体で染色される糖タンパク質はハト α 4GalT 遺伝子を発現させた細胞にのみ存在することが明らかになった(図 2 B)。さらに、各細胞抽出液を用いて、糖タンパク質由来の糖鎖を基質にし、 α 4GalT の酵素活性を測定したところ、ハト α 4GalT 遺伝子を発現させた細胞抽出液を作用させた時のみ、Gal α 1-4Gal 配列を持つ糖鎖が生成された。以上より、ハト肝臓 cDNA ライブラリーから単離した遺伝子は、糖タンパク質上の糖鎖に作用し、Gal α 1-4Gal 配列を生成する α 4GalT をコードしていると判定した。また、この糖転移酵素には Gb3 合成活性は無いことから、ヒトやニワトリ由来の α 4GalT とは基質特異性の異なる酵素活性を持つことが明らかになった。

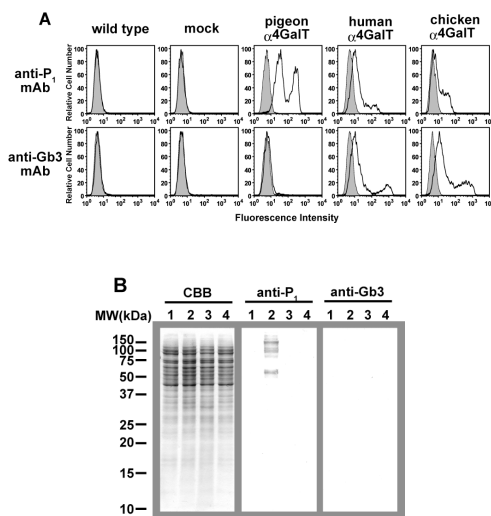


図 1 ハト、ヒト、およびニワトリ由来 α 4GalT 発現細胞における Gal α 1-4Gal の検出

(A) 細胞表面上の Gal α 1-4Gal の発現

(B) 糖タンパク質上の Gal α 1-4Gal の発現、lane 1, mock; lane 2, ハト α 4GalT; lane 3, ヒト α 4GalT; lane 4, ニワトリ α 4GalT

(3) 他の生物種由来 α 4GalT との比較

NCBI のデータベースからハト α 4GalT 遺伝子と相同性のある遺伝子を検索したところ、ニ

ワトリやキンカチョウなど鳥類、およびヒト、マウス、ラット、カモノハシ、ウマ、イヌ、ウシ、アカゲザル、オラウータン、チンパンジーなど哺乳類由来の α 4GalT (ホモログ) が選択された。これらの配列を比較した分子系統樹を図 2 に示す。ニワトリ α 4GalT は、遺伝子およびアミノ酸配列は、ハト α 4GalT とより相同性が高く、分子系統樹でも両者が互いに近い関係に位置している。しかし、糖タンパク質ではなく、糖脂質に作用するという点でニワトリ α 4GalT の基質特異性はハト α 4GalT よりも、むしろヒト α 4GalT と類似である。これは、哺乳類と同様にニワトリにおいて、Gal α 1-4Gal 配列を持つ糖タンパク質は見つかっていないという事実と矛盾しない。哺乳類では様々な種に Gb3 が発現していること、ニワトリ α 4GalT も Gb3 合成酵素として機能することを考慮すると、Gb3 合成酵素活性を持つ α 4GalT が、哺乳類と鳥類の共通祖先に存在していた可能性が高い。一方、今回クローニングしたハト α 4GalT のように Gb3 合成酵素活性を持たないが、糖タンパク質糖鎖に作用する酵素は、Gb3 合成酵素から派生した可能性がある。

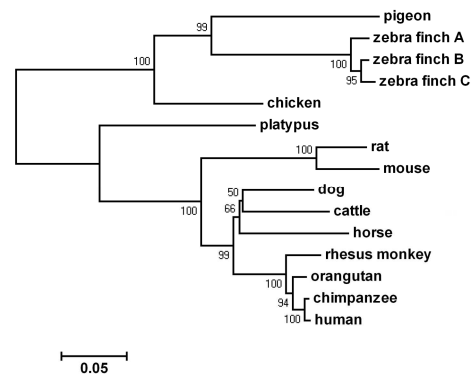


図 2 近隣結合法による α 4GalT の分子系統樹

(4) 今後の展望

本研究により、糖タンパク質上の Gal α 1-4Gal 配列を生成する新規のハト由来 α 4GalT を同定することに成功した。得られた遺伝子配列を解析した結果、この糖転移酵素遺伝子は現生鳥類の祖先が分岐する過程で Gb3 合成酵素をコードする遺伝子から重複や変異を経て新たに生じた可能性が示唆された。今後は、いつどのように遺伝子の変化が生じたのか解明するために、様々な鳥類から α 4GalT 遺伝子を単離して配列や基質特異性の比較解析を行う必要がある。また、ハトとニワトリの α 4GalT はアミノ酸配列レベルで 68.0% の相同性があるにも関わらず、基質特異性が異なることが本研究で明らかになった。これらの

酵素の配列のどの部分が糖タンパク質または糖脂質に作用する特異性を決定するのか、キメラ体を作製して検証する必要がある。さらに、本研究によりハト由来 α 4GalTはヒト由来 α 4GalTよりも広範囲の基質に対して作用し、Gal α 1-4Gal配列を産生することが明らかになった。したがって、この酵素を利用してGal α 1-4Gal配列を持つ様々な複合糖質を酵素化学的に産生することが可能となる。Gal α 1-4Gal配列は、尿路感染性大腸菌の接着分子(P-アドヘシン)や志賀毒素が宿主の糖鎖を認識する際の最小構造であるため、糖鎖を介した接着阻害物質を開発する上でもこの α 4GalTは有用であると考えられる。

鈴木 詔子 (SUZUKI NORIKO)
東京大学・大学院新領域創成科学研究科・特任助教
研究者番号：50401237

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3 件)

Suzuki, N., Su, T. H., Wu, S. W., Yamamoto, K., Khoo, K. H., and Lee, Y. C. (2009) Structural analysis of N-glycans from gull egg white glycoproteins and egg yolk IgG. *Glycobiology* 19, 693-706 (査読あり)

Suzuki, N., Laskowski, M., Jr., and Lee, Y. C. (2006) Tracing the history of Gal α 1-4Gal on glycoproteins in modern birds. *Biochim. Biophys. Acta.* 1760, 538-546 (査読あり)

鈴木詔子 (2005) 鳥類のIgG/IgY上に存在する糖鎖構造の保存性と多様性. 『*生化学*』 77, 1514-1518 (査読なし)

[学会発表](計 2 件)

鈴木詔子、名和大輔、松本直樹、Yuan C. Lee、山本一夫：鳥類におけるGal α 1-4Galの発現とハト α -1,4-ガラクトース転移酵素の解析、日本糖質学会、2006年8月25日、仙台

名和大輔、鈴木詔子、松本直樹、Yuan C. Lee、山本一夫：ハトの各組織における α および β -1,4-ガラクトース転移酵素の活性測定、日本糖質学会、2006年8月25日、仙台

[図書](計 1 件)

Suzuki, N., and Lee, Y. C.: (2007) Glycophylogeny of Gal α 1-4Gal in avian egg glycoproteins. In *Comprehensive Glycoscience: from chemistry to systems biology* (Kamerling, J. P., Boons, G.-J., Lee, Y. C., Suzuki, A., Taniguchi, N., and Voragen, A. G. J., eds) Vol. 3 pp. 237-251, Elsevier, Amsterdam ; Boston

6. 研究組織

(1)研究代表者