

氏名	木村 尚子 きむら なおこ
学位の種類	博士（生体情報）
学位記番号	第5号
学位授与の日付	平成18年3月24日
学位授与の要件	課程博士 本学学位規則第3条第2項該当 （システム自然科学研究科生体情報専攻）
学位論文題目	細胞間認識における糖鎖硫酸化とシアル酸環状化の役割
論文審査委員	（主査）教授 森山 昭彦 （副査）教授 舘脇 洋 （副査）教授 加藤 宏一 （副査）分子病態学部長 神奈木 玲児 （愛知がんセンター研究所） （副査）教授 羽瀧 脩躬 （愛知教育大学）

## 論文内容の要旨

セレクトインファミリーの細胞接着分子は、糖鎖リガンドと特異的に結合してタンパク質-糖相互作用を引き起こし、血中を流れる白血球をとらえて血管外へ遊走させるための最初のステップに関与している。リガンド糖鎖としては、シアリルルイスXをはじめさまざまな分子種が知られているが、最近になって同定されたリガンドは、糖鎖に硫酸基とシアル酸基を持つシアリル6-スルホルイスXである。この糖鎖はリンパ節高内皮細静脈に発現するL-セレクトインのリガンドとして同定され、リンパ球の生理的なホーミング現象に関与していると考えられている。

本研究において、糖鎖がL-セレクトインのリガンドととしての結合能を持つためには、糖鎖に硫酸基が転移されていることが必須であり、また、免疫系細胞に広く発現しているセレクトイン以外の接着分子であるシグレックタンパクのリガンドとしても一部、硫酸基が関与しているということを、培養ヒトリンパ球系細胞株を用いた実験で明らかにした。またセレクト

チン、シグレックタンパクと糖鎖の結合には糖鎖末端のシアル酸基も必須であり、その結合様式についても明らかにした。

シアリル6-スルホルイスXは、末端シアル酸基のN-アセチル基が脱アセチル化酵素によって脱N-アセチル化され、続いてカルシウム依存性の酵素シアル酸シクラーゼにより脱水環状化反応を受けてサイクリックシアリル6-スルホルイスXになることが、有機合成された糖脂質において知られている。

本研究では、この経路が実際にヒトリンパ球系培養細胞株においてはたらいているということを、カルシウムイオンで細胞を刺激しサイクリック化を触媒する酵素を活性化することによって証明した。イノシトール3リン酸（IP3）を介したカルシウムイオンの細胞内流入によって、リンパ球系細胞表面のシアリル6-スルホルイスX糖鎖は、サイクリックシアリル6-スルホルイスX糖鎖に速やかに変化した。この反応は硫酸基を持たないシアリルホルイスXについては起こらなかった。また、脱N-アセチル化を阻害することによって、サイクリックシアル酸がシアル酸にもどる反応もリンパ球系細胞株で起こることを発見した。さらに、ヒトリンパ球系細胞株において表面糖鎖のシアル酸がサイクリックシアル酸に変化することによって、L-セレクチン、シグレックのリガンド糖鎖としての結合機能が消失することを見出した。

健常人の末梢血では、ほとんどのリンパ球がセレクチンやシグレックタンパクと結合しないサイクリックシアリル6-スルホルイスX糖鎖を持つもので、一部結合することのできるシアリル6-スルホルイスX糖鎖を持つものが存在していることが知られている。このことから実際の体内において、ホーミングに關与するL-セレクチンのリガンド糖鎖を発現しているリンパ球のなかに、シアル酸の環状化によってリガンドとしての結合機能を消失したリンパ球が存在することが示唆された。結合機能消失というネガティブフィードバック機構がはたらいて、そのことが、炎症の際の白血球の大量血管外脱出と異なる、ホーミングにおける限定されたリンパ球サブセットのゆっくりとした散発的な血管外脱出を可能にしていると考えられた。

このように、L-セレクチンやシグレックタンパク質とリガンド糖鎖との相互作用において糖鎖硫酸基、シアル酸基は重要な役割をはたしており、リガンド糖鎖としての活性を調節するという意味で広く健常人の体内でのリンパ球分布のホメオスタシスの維持に糖鎖硫酸基、シアル酸環状化の系がはたらいていると考えられた。

## 論文審査の結果の要旨

申請者は、リンパ球系細胞表面に発現している糖鎖構造の多様性に着目し、特異構造認識抗体を活用して細胞表面糖鎖構造の構造と機能の関係を解析した。

まず、L-セレクチンがヒトリンパ球系細胞表面のリガンド糖鎖シアリル6-スルホルイスXと結合するには、硫酸基、2,3-結合したシアル酸が必要であることを生細胞を用いて証明した。また、シグレックタンパク質Siglec-2, 7は、リガンド糖鎖に硫酸基が結合することにより結合能が亢進することを示し、Siglec-2の認識するリガンド糖鎖のシアル酸は2,6-シアル酸であり、Siglec-7の認識するリガンド糖鎖のシアル酸は、2,3-シアル酸である可能性を示した。また、Siglec-2、Siglec-7の結合にはこれらのシアル酸に加えて硫酸基も必要とされる可能性があることを生細胞を用いて証明した。ついで、シアル酸からサイクリックシアル酸への環状化反応が実際に分単位で起こることことを培養細胞を用いて証明した。さらに、この環状化反応は、細胞内カルシウムの動員によって制御されており、小胞体から細胞内へのカルシウム放出を引き起こすIP3を介する情報伝達経路を刺激することにより起こることを示した。さらに、シアル酸の環状化によってL-セレクチン、シグレックのリガンド糖鎖としての結合機能の消失をヒトリンパ球系細胞において初めて明らかにした。

このように、細胞表面糖鎖が、硫酸化ならびにシアル酸の環状化を受けることにより、結合相手分子であるセレクチンやシグレックとの結合能を変化させる事を明らかにした。

これらの知見は、リンパ球系細胞表面にある糖鎖構造の変化がリンパ球系細胞の生体内でのダイナミックな局在性の変化をコントロールしている可能性を示すものであり、免疫学、糖鎖生物学における研究の発展に大きく寄与するもので、高く評価される。また、英語力ならびに当該分野の基礎知識も十分にあり、申請者は博士（生体情報）の学位を授与される資格があるものと認められる。