

審査の結果の要旨

氏名 辛 欣

ジストログリカン(筋細胞表面膜貫通分子)であり、筋細胞内分子ジストロフィンや細胞外マトリックス分子ラミニンとの相互作用を通して、骨格筋構築に重要な役割を持つことが、筋ジストロフィーの原因となる変異がこの分子自体やその糖鎖の生合成に不具合を生じることから明らかにされて来た。「Role of the dystrophin-glycoprotein complex in skeletal muscle integrity (筋肉の統合性維持における dystrophin-glycoprotein complexの働き)」と題する本論文では、遺伝子変異を伴わない生理的あるいは病的な筋萎縮の過程において、ジストログリカン(一つの遺伝子の産物である α ジストログリカンと β ジストログリカンのヘテロダイマー)がどのような役割を持つかを追究すること、ジストログリカンの機能制御にかかわることが知られている糖鎖部分の生合成に関わる糖転移酵素であるprotein O-mannose β 2-N-acetylglucosaminyltransferase 1 (POMGnT1)が、この酵素に付加している糖鎖によって制御を受けるかどうかを追究すること、の二点を目指した研究の結果が記述されている。

論文の最初の部分は序論で、筋ジストロフィーの病因に関する研究からジストログリカン複合体が骨格筋の統合性を保つ上で重要であることが示された経緯が述べられている。さらに、それを背景に遺伝子変異を伴わない筋肉の萎縮にジストログリカン複合体が関わるかを追究することとした背景が記述されている。

第1章には、筋萎縮時におけるジストログリカン複合体の生化学的変化を追究した結果が詳細に述べられている。第一部では加齢による腓腹筋の萎縮、第二部では運動制限または神経切断による腓腹筋の萎縮を対象にした研究である。加齢に伴う骨格筋の萎縮時にミオシンの相対量は変化しなかったが、ジストログリカン含量及びジストログリカン複合体の低下が見られた。ジストログリカンの低下は遺伝子発現によるものではなかった。2週間の運動制限によって筋萎縮を誘導した場合は、骨格筋量の低下、ミオシン含量の低下が見られるが、ジストログリカン全体の含量は変化せず、糖鎖の付加度が低下することが示された。接続する運動神経を切断した骨格筋では、骨格筋量の低下は見られるが、ミオシン量に有意な変化はなくジストログリカン含量はむしろ増加していた。従って、特定の経時ポイントで見ると、ジストログリカンの相対含量や糖付加の割合はミオシン含量や総筋肉重量と相関しないことが解った。

第2章には、POMGnT1のグリコフォームを明らかにし、糖鎖の構造を推定し、糖鎖がこの酵素の機能に影響するかどうかを追究した結果が記述されている。第一部によれば、POMGnT1はN-グリカン付加部位を持たないが、昆虫細胞に発現させると、シアル酸、ガラクトース、マンノースなどの糖が含まれていることが、グリコシダーゼ処理とレクチンプロットの組み合わせによって明らかになり、マンノース型とN-

アセチルガラクトサミン型のO-結合型糖鎖(O-Man型、O-GalNAc型)の存在が示唆された。そこで第二部ではその構造解析に挑んだ。動物細胞でこの酵素を産生させると、O-GalNAc型の糖鎖の存在が示唆されたので、精製したリコンビナントPOMGnT1から β -脱離によって糖鎖を遊離させると同時にピラゾロン標識し、分画後質量分析を行った。その結果、主要な成分はNeuAc-Gal-GalNAcとNeuAc-Gal-(NeuAc-)GalNAcであることが推定された。糖鎖を含まない大腸菌によって産生されたリコンビナントPOMGnT1は動物細胞や昆虫細胞で発現させたものと比較して活性が著しく低い。そこで、POMGnT1の酵素活性における糖鎖の意義を調べるため、O-Man転移酵素を用いて大腸菌産生POMGnT1にO-Man型糖鎖を修飾させても活性は変化しなかった。また、グリコシダーゼによりO-GalNAc型糖鎖を除去した場合のPOMGnT1活性およびO-Man型糖鎖を欠損した細胞とコントロール細胞のPOMGnT1活性に差は認められなかった。この結果から、POMGnT1の糖鎖部分は細胞内における局在や安定性に関与する可能性があるにせよ、直接酵素活性に影響しないことが示された。

本研究は遺伝子変異を伴わない生理的なあるいは病理的な骨格筋の萎縮に、ジストログリカン複合体が関わるかを明らかにしようとした初めての試みである。骨格筋に萎縮を誘導するとジストログリカンの産生レベルに変化が生じたが、変化の方向やそのメカニズムは実験モデルにより同一ではなかった。また、ジストログリカンの機能がその糖鎖の付加と伸長によって制御されていることが知られているので、その制御にかかわる重要な糖転移酵素であるPOMGnT1の機能がこれに付加する糖鎖によって制御される可能性を査定した。この酵素にはO-GalNAc型の糖鎖が付加していることが判明し、その構造を推定することが出来たが、それらの有無による酵素活性に差異はなかった。これらの研究は、糖鎖生物学、生化学の領域において、これまで全く追究されていなかった領域を大胆に開拓しようとする研究であり、糖鎖生物学、病態生物学に資するところが大きい。よって、本研究を行った辛 欣は博士(薬学)の学位を得るにふさわしいと判断した。