

「糖尿病に関連」糖鎖合成酵素の新たな仕組み発見

岐阜大学糖鎖生命コア研究所（iGCORE）の木塚康彦教授、大阪大学微生物病研究所の長江雅倫助教、東北医科薬科大学、産業技術総合研究所、米シシッヒ大学の国際共同研究チームは、糖尿病にも関わる糖鎖合成酵素GnT-IVaの新しい反応機構を発見した。GnT-IVaは、タンパク質の上の糖鎖に枝分かれ構造を作る酵素で、糖鎖を作るための領域のほかに、これまで知られている糖鎖合成酵素には見られない、糖鎖と結合する領域（レクチン）があることを発見した。さらに、その領域の立体構造を明らかにすることにより、レクチンが酵素活性に不可欠であり、特定の糖鎖と結合することで効率的な糖鎖合成を進めていることを明らかにした。タンパク質の上に複雑な糖鎖が作られる仕組みの解明に重要な基礎的知見を与えるとともに、糖尿病の病態解明や治療法開発にも役立つことが期待される。Communications Biologyに掲載された。

糖鎖は、主にタンパク質や脂質などに結合した状態で存在しており、病気になると糖鎖の形が変化することが知られている。糖鎖の変化は、医療の現場でがんなどの診断に使われているほか、特定の糖鎖が、がん、アルツハイマー病、糖尿病など様々な疾患において重要な役割を果たすことから、糖鎖を標的とした新たな治療薬の開発が期待されている。

タンパク質につく糖鎖は、細胞の中で糖転移酵素（糖鎖合成酵素）の働きによって作られる。180種類ほど存在しているヒトの糖転移酵素の一つ「GnT-IVa」は、細胞の中で、タンパク質についたN型糖鎖に作用し、ある種の枝分かれ構造を作る。このGnT-IVaが作る枝分かれ構造が、糖尿病の発症・進行と深い関係があることがわかってきている。

糖鎖と結合する領域あり

効率的な糖鎖合成を促進

一方、GnT-IVa自体の立体構造や、GnT-IVaがどのような機構でタンパク質の上の糖鎖を作るのかという仕組みの詳細についてはよくわかっていなかった。

そこで木塚教授らは、まずGnT-IVaのアミノ酸配列に着目した。タンパク質立体構造予測ツールPhyre2で調べたところ、糖鎖を作る触媒ドメインのほかに、C末端側にレクチンドメインを持つことがわかった。レクチンは、様々な糖鎖と選択的に結合するため、GnT-IVaはC末端側のレクチンドメインで特定の糖鎖と結合することを示唆している。多くの糖転移酵素はこのようなレクチンドメインを持たないことから、他の酵素とは異なるユニークな仕組みで糖鎖を作ることを示唆された。

レクチンドメインのGnT-IVa

岐阜大など 病態解明や治療法開発期待

酵素活性における役割を明らかにするため、GnT-IVa、またはレクチンドメインを欠損させた変異体をそれぞれ細胞に発現させて精製した。精製した酵素を、試験管の中で基質の糖鎖と混合し、生じた酵素反応の産物を高速液体クロマトグラフィーで分析。その結果、レクチンドメインを除いたGnT-IVaは、酵素活性を示さないことがわかった。つまり酵素活性にはレクチンドメインが不可欠なということだ。

45番目のアミノ酸であるアスパラギン酸（D445）がこの相互作用に極めて重要であることもわかった。最後に、GnT-IVaが実際に細胞内でタンパク質に働くときのレクチンドメインの役割を調べるため、レクチンドメインの糖鎖結合能に不可欠なアミノ酸（D445）をアラニンに置換し、レクチンドメインの機能を喪失させた変異体（D445A）を細胞に発現させて、その機能を調べた。その結果、GnT-IVaが細胞内でタンパク質に効率的に糖鎖を作るためには、レクチンドメインと糖鎖との結合が必要であることが明らかになった。

次に、レクチンドメインの働きや立体構造についてその詳細を調べた。レクチンドメインは糖鎖と結合する可能性が高いことから、どのような種類の糖鎖と結合するのか、N型糖鎖やO型糖鎖などを含む157種類の糖鎖を対象に、フロンタルアフィニティークロマトグラフィー法で調べた。その結果、レクチンドメインは、GnT-IVaが作る枝分かれ構造を持ったN型糖鎖とのみ結合することがわかった。

さらにX線結晶構造解析により、精製したレクチンドメインの三次元構造を明らかにした。その立体構造をもとに、分子動力学シミュレーションを行ったところ、レクチンドメインは、触媒ドメインが作る枝分かれ構造を持ったN型糖鎖と強く相互作用することがわかった。また、GnT-IVaの4

木塚教授らは最近、N型糖鎖の別の分岐構造を作る酵素GnT-Vでも、触媒ドメインとは別のドメインを介して基質となるタンパク質を認識することを明らかにしている。これらの知見は、それぞれの糖転移酵素が独自の機構で基質タンパク質に作用して複雑な糖鎖を作り上げていることを示唆している。一方、GnT-IVaのレクチンドメインと糖鎖との結合がどのようにして効率的な酵素反応に寄与しているのか、その詳細はまだ明らかになっていない。今後、触媒ドメインを含むGnT-IVa全体の立体構造がわかれば、その働く仕組みがさらに解明され、その期待される。また今回の研究は、糖鎖一般において未解明である「タンパク質ごとに異なる糖鎖がつく仕組み」を考える上で重要な知見を与えるものだ。