

# タンパク質の糖鎖修飾に関するバイオインフォマテイクス解析と工学的応用

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2018-11-16 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 越中谷, 賢治 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10291/19694">http://hdl.handle.net/10291/19694</a>

## 「博士学位請求論文」審査報告書

審査委員 (主査) 理工学部 専任准教授

氏名 池田 有理 (印)

(副査) 理工学部 専任教授

氏名 鎌田 弘之 (印)

(副査) 理工学部 専任教授

氏名 加藤 徳剛 (印)

1 論文提出者 越中谷 賢治

2 論文題名 タンパク質の糖鎖修飾に関するバイオインフォマティクス解析と工学的応用  
(英文題) Bioinformatics analysis and engineering applications related to protein glycosylation

### 3 論文の構成

本論文は次の7章から構成されている。

第1章 序論

第2章 一次配列に基づく糖種判別とその限界

第3章 糖タンパク質の二次構造解析

第4章 糖鎖修飾位置周辺の空間的アミノ酸出現傾向解析

第5章 タンパク質細胞内局在経路に基づいた糖鎖修飾分布の解析

第6章 タンパク質O結合型糖鎖修飾の糖種判別

第7章 総論

### 4 論文の概要

糖鎖は細胞内の分子機械であるタンパク質の機能を制御する分子であり、タンパク質の適切な箇所に特定の種類の糖が修飾されることによって、生命活動に必要な生化学反応が引き起こされる。糖鎖修飾は、発生・分化、シグナル伝達などの生命現象をはじめ、免疫不全、感染症やガンなど、ヒトの疾患とも深く関わっていることが知られている。

糖鎖修飾にはN結合型・O結合型等の様式が存在する。このうち、タンパク質のセリンまたはスレオニン残基に結合するO結合型糖鎖修飾は、とりわけ糖種が豊富である。フコース

(Fuc)・グルコース (Glu)・キシロース (Xyl)・マンノース (Man)・*N*-アセチルガラクトサミン (GalNAc)・*N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc) 等の糖種構造の異常が、それぞれ特異的な疾患に影響を及ぼしていることが明らかにされつつある。したがって、ゲノム解析によって明らかにされた遺伝子がコードするタンパク質に修飾されている糖種を網羅的に予測することにより、未知タンパク質の機能や細胞内局在を正確に予測することが可能となり、また、それらと重要な疾患との関連をも推測できるようになる。糖種判別が実現することにより、糖鎖修飾の分子生物学的な理解はもちろんのこと、医学・薬学分野への応用も期待できる。しかし、既存の糖鎖修飾予測アルゴリズムは、糖鎖修飾を受けるタンパク質の残基位置予測の機能を有しているのみであり、糖種判別は不可能であった。

本論文では、*O* 結合型糖鎖修飾を受けるタンパク質の配列・構造および細胞内局在性を解析し、糖種判別に利用可能なパラメータを探索した。アミノ酸配列・二次構造・立体構造・細胞内局在経路の糖種特異性抽出と統計的有意性評価の結果に基づき、アミノ酸出現傾向と細胞内局在経路を主要な要素として用いることにより、*O* 結合型糖鎖修飾の高精度糖種判別を実現している。特に、タンパク質の細胞内局在化と糖種の相関解析からは、糖鎖修飾のエラーによる疾患の具体的な要因や、修飾を受けた糖種をパラメータとしたタンパク質の細胞内局在予測法の開発にも応用できる。さらに、アミノ酸配列・二次構造・立体構造・細胞内局在経路の糖種特異的特徴に基づいてタンパク質の配列の一部を設計し、適切な種類の糖鎖をタンパク質へ効果的に導入することができれば、タンパク質の機能制御も可能となり、人工粘膜やがんワクチン、動物生体を用いない人工抗体など、医療・創薬分野への応用も期待できる。このように、糖鎖修飾の分子機構について議論する理学的基礎研究から、その知見を応用して糖種判別法の開発を行うまでの工学的応用研究に展開しており、今後分子生物学実験と組み合わせることにより、糖転移酵素による標的タンパク質の認識機構や糖鎖修飾機構の詳細な解明や高機能性糖タンパク質の開発など、さらに幅広い応用展開も可能であると考えられる。

第1章では序論として、生命活動におけるタンパク質糖鎖修飾の役割、糖鎖研究の意義や現状および問題点を示し、本研究の目的を記述している。特に、本研究でタンパク質 *O* 結合型糖鎖修飾の糖種判別を行う必要性、および、糖鎖生物学研究における本研究の位置づけを示している。公共のタンパク質配列データベースには8種類の糖種情報が記載されているにも関わらず、従来の糖鎖修飾予測法では糖種の判別が不可能である点、糖転移酵素の分子機構に関する実験研究から糖転移酵素の糖種特異性が指摘されているが、依然としてバイオインフォマティクスによる網羅的解析が行われていない点等から、バイオインフォマティクスによる糖種特異性解析や糖種判別法開発が急務であることを指摘している。また、公共のタンパク質立体構造情報データでは、糖が含まれているエントリは存在するものの生体内では修飾されているはずの糖鎖が結晶構造中では欠失しているケースが多く、糖を完全に残したタンパク質の二次構造や立体構造の情報を得ることが困難であるという問題についても記述しており、アミノ酸配列・二次構造・立体構造・細胞内局在経路に関する情報の統計的有意性についても調査すべきであることを指摘している。

第2章では、糖鎖修飾残基付近のアミノ酸出現傾向の糖種特異性を明らかにしている。また、アミノ酸出現頻度から算出されるアラインメント位置特異的スコアマトリクス (PSSM)

を用いることで、一部の糖種について判別に成功している。特に Xyl と Fuc は高精度である。しかし、とりわけ GlcNAc を他の糖種から判別する精度は極めて低く、一次配列に基づく糖種判別の限界として示されている。この点から、構造や細胞内局在経路等の糖鎖特異性を網羅的に解析し、糖種判別要素としての可能性の調査が必要であることを指摘している。

第3章では、X線回折像による立体構造データにO結合型糖鎖修飾が含まれているタンパク質を対象に、糖鎖修飾位置周辺の糖種特異的二次構造出現傾向の特徴を見出しており、各糖を修飾する役割を果たしている糖転移酵素が標的タンパク質を認識する際の二次構造指向性について論じている。O結合型糖鎖修飾は総じて、タンパク質のストランド構造とコイル構造が切り替わる位置周辺に修飾を受けやすいが、特にFuc特異的な性質として、ストランド中の最もN末端側の残基に修飾されやすい傾向にあることを示唆している。また、GalNAcやGlcNAcを含むタンパク質結晶構造の数からは、二次構造・立体構造の特徴をO結合型糖鎖修飾の糖種判別に活用するには統計的有意性に乏しいという点についても指摘している。

第4章では、FucおよびGlcNAcの修飾を受けたタンパク質について、アミノ酸残基周辺の空間的アミノ酸出現傾向に基づいた物理化学的環境を調査している。Fuc修飾残基周辺ではシステイン残基の出現傾向が高く、Fuc転移酵素がシステイン残基同士のジスルフィド結合から形成された構造を認識して糖鎖を修飾している可能性について論じている。GlcNAc修飾残基周辺では、チロシン残基およびアラニンやバリンなど疎水性残基の高頻度出現が見られており、GlcNAc転移酵素が標的タンパク質の高疎水性環境を認識して糖鎖を修飾している可能性についても示している。糖転移酵素や糖分解酵素の構造についても同様に調査することにより、糖鎖認識サイトの周辺における芳香族アミノ酸の存在が糖鎖修飾位置周辺の性質と共通していることを明らかにしている。このことから、FucやGlcNAc修飾位置周辺の芳香族アミノ酸が糖種選択性に寄与している可能性を示唆している。今後の立体構造データ増加に伴い、将来的には糖種判別の要素となり得ることも指摘している。

第5章では、O結合型糖鎖修飾を受けている糖タンパク質を、細胞内局在化経路および糖種によって分類している。シグナルペプチドおよび膜貫通領域の情報から、糖タンパク質を細胞内在型・分泌型・シグナルアンカー型・膜貫通型の4グループに分類して、グループごとに糖種分布の調査を行っている。小胞体を経由する局在化経路に所属する分泌型・シグナルアンカー型・膜貫通型の3グループでは、Fuc・Xyl・GalNAc修飾が起こっており、小胞体を経由しない局在化経路を持つ細胞内在型タンパク質では、O結合型糖鎖修飾の100%がGlcNAcであることを明らかにしている。Fuc・Xyl・GalNAcを修飾する糖転移酵素は小胞体およびゴルジ体に、また、GlcNAc転移酵素は核や細胞質、ミトコンドリアに存在することについても調査し、糖タンパク質の細胞内局在化経路ごとの糖種特異的分布を支持している。本章では特に、一次配列に基づく糖種判別の限界に該当するGlcNAc修飾について、糖タンパク質の細胞内局在化経路の特異性が、糖種判別のための強力な要素となる可能性について論じている。

第6章では、O結合型糖鎖修飾を受けるタンパク質の糖鎖修飾位置周辺のアミノ酸配列(一次配列)から得られた糖種特異的PSSM、および、シグナルペプチド・膜貫通領域の有無から分類される細胞内局在経路を要素とし、タンパク質O結合型糖鎖修飾における糖種判別を行っている。まず、一次配列情報だけでは判別が難しい糖種の組み合わせを明らかにする目

的で、各糖種総当たりの組み合わせ判別を行ったところ、GalNAc と GlcNAc の組み合わせでは判別精度が極めて低いことが判明している。しかし、第 5 章の結論に基づくと、細胞内局在経路を要素に加えることにより、GlcNAc 修飾残基は GalNAc 修飾残基から完全に区別することが可能であるため、タンパク質をまず細胞内局在経路によって GlcNAc と Fuc・Xyl・GalNAc の 2 グループに分類した後に、Fuc・Xyl・GalNAc 内において糖種特異的 PSSM を用いて判別スコアを算出する方法で、2 段階の判別を実施することにより、タンパク質 O 結合型糖鎖修飾の糖種判別を高精度で実現している。

第 7 章では、総論として、本研究における問題意識に対応させながら第 2 章～第 6 章までの研究成果をまとめている。さらに、タンパク質 O 結合型糖鎖修飾の糖種判別サーバの公開、および、分子生物学実験による糖種判別結果の検証実験を含む今後の方針を示している。とりわけ、アミノ酸配列の一部、および、細胞内局在経路が異なる複数のタンパク質を遺伝子工学的に作製して糖種解析を行う研究計画について述べ、その実験の進捗についても報告している。

## 5 論文の特質

本論文は、O 結合型糖鎖修飾により機能制御を受けているタンパク質について、アミノ酸配列・二次構造・立体構造・細胞内局在経路の糖種特異的性質を抽出し、糖鎖修飾における糖種判別の要素としての適性をタンパク質の階層ごとに議論した、バイオインフォマティクス研究である。また、これらの解析により最適化された要素を用いて、糖鎖修飾における糖種の高精度判別法を提案している。特に、糖鎖修飾位置周辺のアミノ酸出現頻度から求められるスコアマトリクスと細胞内局在化経路とを組み合わせることにより、タンパク質に修飾される糖種を高精度で判別できることを明らかにしている。

## 6 論文の評価

本論文では、タンパク質 O 結合型糖鎖修飾の糖種特異性に着目し、タンパク質の階層構造ごとに糖種特異的性質を抽出することにより、これまで例が無かったタンパク質糖鎖修飾の糖種判別法の開発に至っている。本論文の提案法を用いて、さまざまなタンパク質に修飾されている糖種を網羅的に予測することにより、未知タンパク質の機能や細胞内局在性を正確に予測することにも繋がる。また、タンパク質細胞内局在性を切り口として糖鎖修飾機構の解明を目指す研究についても前例がなく、その新規性は評価に値する。さらに、分子生物学的手法による糖種判別結果の検証実験についても論じており、ドライ・ウェットの両面から糖鎖修飾機構の本質的理解を目指す研究の基盤を十分に構築できたといえる。

## 7 論文の判定

本学位請求論文は、理工学研究科において必要な研究指導を受けたうえ提出されたものであり、本学学位規程の手続きに従い、審査委員全員による所定の審査及び最終試験に合格したので、博士（工学）の学位を授与するに値するものと判定する。

以 上