

# 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>

# 2016年度 理工学研究科

## 博士学位請求論文（要旨）

### 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

学位請求者 電気工学専攻  
越中谷 賢治

#### 内容の要旨

##### 1. 本研究の問題意識と目的

糖鎖は核酸やタンパク質に次ぐ第三の生命鎖として知られており、タンパク質の機能を制御する糖鎖修飾は、生体内の多くの生化学反応に必要不可欠である。また、糖鎖を形成する糖の種類（糖種）には多くのバリエーションがあり、それぞれが特異的な生化学反応と密接に関連している。これらは発生・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。それゆえ糖鎖は、分子生物学や生命科学の新たな切り口としての強い期待が寄せられているほか、医学や薬学とも切り離せない重要な分子である。

タンパク質のセリン残基やスレオニン残基に結合するO型糖鎖修飾は、これまで細胞外マトリクスの主成分として知られてきたが、近年、豊富な糖種がさらに多様な役割を持ち、タンパク質の機能制御を通して特異的な疾患にも影響を及ぼしていることが明らかにされつつある。そのため、修飾された糖種を知ることにより、タンパク質の機能が予測できるばかりでなく、重要な疾患との関連を推測することが可能となり、疾患の治療や創薬への応用も期待できる。しかしながら、従来の糖鎖修飾予測法は、タンパク質のアミノ酸配列において糖鎖修飾を受けるアミノ酸残基の位置を予測する機能を持つのみであり、糖種の判別は不可能であった。一方、実験的手法による解析では、特定の糖種が異なる細胞内小器官で見つ

かったことや、糖種の組織特異性が報告されているものの、依然としてバイオインフォマティクスによる解析では、糖種の予測や判別には対応できておらず、タンパク質の糖鎖修飾における糖種判別法の開発は急務であると考えられる。また、バイオインフォマティクスによる糖鎖修飾研究では、アミノ酸配列のみを解析対象とした内容がほとんどであり、糖鎖修飾機構に基づいた解析が行われていない。

そこで本研究では、O型糖鎖修飾を受けるタンパク質のアミノ酸配列・二次構造・立体構造・細胞内局在経路解析を通して糖鎖修飾機構の考察を行い、糖種特異的な特徴を抽出するとともに、O型糖鎖修飾の糖種判別に利用可能なパラメータを探索し、高精度糖種判別法の開発を目指した。

##### 2. 本研究の構成ならびに各章の要約

本論文は全7章から構成されている。各章の概要を以下に示す。

第1章では、序論として本研究における背景、糖鎖研究の現状と問題点を示し、本研究の目的を記述した。

第2章では、O型糖鎖修飾を受けている糖の種類（糖種）によって、修飾残基付近のアミノ酸出現傾向が異なることを明らかにした。また、糖鎖修飾位置周辺のアミノ酸出現頻度から得られた位置特異的なスコアマトリクス(PSSM)を用いることにより、新規の糖種については高精度糖種判別に成功した。糖鎖修飾の有無を判別する精度が85%程度であった従来法と比較し、特にキシロース(Xyl)は5分割交差検定において成功率88%、フコース

(Fuc) は 100%と極めて高精度に判別することができた。従来のO型糖鎖修飾予測法では対応していない糖種が多かったが、本研究では糖種特異的な PSSM を用いることにより、より多くの糖種に対応した判別を可能にした。一方で、N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) を他の糖種の修飾残基から判別する精度は低く、一次配列に基づく完全な糖種判別には限界があることがわかった。

第3章では、立体構造データベース Protein Data Bank (PDB) の原子座標データに O 型糖鎖を含むタンパク質を対象とし、糖種ごとに糖鎖修飾位置周辺の二次構造のバリエーションを調査した。その結果、糖種ごとに二次構造の出現傾向に特徴が見られ、各糖を修飾する糖転移酵素の認識における二次構造の指向性を示すことができた。O 型糖鎖修飾はストランド構造とコイル構造の境目に受けやすいことを明らかにしたほか、特に Fuc は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がわかった。一方、PDB に含まれる O 型の糖の情報調査したところ、N-アセチルガラクトサミン (GalNAc) および GlcNAc 修飾位置は、タンパク質配列データベース Uniprot Knowledgebase/Swiss-Prot には数多く報告されているにも関わらず、いずれも結晶構造数は1桁しかなく、二次構造・立体構造の特徴を糖種判別法に活用するには統計的有意性に乏しいことも示された。

第4章では、Fuc 修飾と GlcNAc 修飾を受けた糖鎖周辺の物理化学的環境を調査した。構造既知の糖タンパク質を対象に、糖鎖修飾残基および糖構成原子周辺のアミノ酸残基の出現傾向を調べた。Fuc 修飾の周辺では、とりわけシステイン残基の出現傾向が高かった。これらシステイン残基は他のシステイン残基とジスルフィド結合しており、Fuc 転移酵素がジスルフィド結合からなる初期構造を認識している可能性を示すことができた。一方、GlcNAc 修飾ではチロシン残基および疎水性残基 (アラニン、バリン) の高頻度出現を見だし、糖鎖修飾位置周辺に高疎水性環境を形成していることを明らかにした。糖鎖認識残基の周辺に芳香族アミノ酸が存在することは、糖転移酵素や糖分解酵素にも共通しており、Fuc や GlcNAc 修飾位置周辺で見られた芳香族アミノ酸が、それぞれの糖鎖修飾の選択性に寄与している可能性を示すことができた。今後、PDB に含まれる GlcNAc 修飾タンパク質の構造情報が増加すれば、糖種判別法にも活用できるであろう。

第5章では、O 型糖鎖修飾を受けている糖タンパク質について、細胞内局在・糖鎖修飾情報をもとに、細胞内での局在化経路および糖種に応じて分類した。糖タンパ

ク質をシグナルペプチドや膜貫通領域の有無で、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、O 型糖鎖修飾の糖種を調査した。シグナルペプチドもしくは膜貫通領域を有する分泌型・シグナルアンカー型、あるいはその両方を有する膜貫通型の糖タンパク質は、トランスロコンから小胞体に挿入され、小胞体を經由する局在化経路 (小胞体・ゴルジ体・細胞膜・細胞外分泌) を通る。小胞体経由の3グループにおいては、主として Fuc、Xyl、GalNAc の修飾が見られた。一方、小胞体を經由しない局在化経路 (核・細胞質・ミトコンドリア) を通る細胞内在型タンパク質においては、O 型糖鎖修飾の100%が GlcNAc によることがわかった。上記の結果は、O-Fuc 転移酵素、O-Xyl 転移酵素、O-GalNAc 転移酵素、および O-GlcNAc 転移酵素の細胞内局在性とよく一致した。本項目では特に、一次配列情報では判別が難しかった GlcNAc 修飾タンパク質の細胞内局在化経路の特異性が明らかになり、糖種判別のための強力なパラメータになることが示された。

第6章では、O 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から得られた糖種特異的 PSSM および細胞内局在経路 (シグナルペプチド・膜貫通領域の有無) をパラメータとし、タンパク質 O 型糖鎖修飾における糖種判別を行った。本項目では、判別が難しい糖種の組み合わせを明らかにするために、各糖種総当たりの組み合わせ判別を行った。また、細胞内局在性やシグナルペプチド・膜貫通領域の有無が不明のタンパク質配列の糖種判別を行う可能性も鑑み、糖種特異的 PSSM のみをパラメータとして用いた際の糖種判別の精度も求めた。PSSM を用いた判別においては、Fuc・Xyl・GalNAc 内、および Fuc・Xyl・GlcNAc 内は、どの組み合わせにおいても成功率 85%~100%の判別が可能であった。しかし、GalNAc と GlcNAc の組み合わせでは成功率 55%と、判別精度は極めて低かった。つまり、アミノ酸配列情報のみの判別が困難である組み合わせは GalNAc と GlcNAc であることがわかった。しかし、第5章での解析によると、細胞内局在経路 (シグナルペプチド・膜貫通領域の有無) をパラメータに加えることにより、GlcNAc 修飾位置は GalNAc 修飾位置から完全に分離することが可能であった。そこで、タンパク質をまず細胞内局在経路 (シグナルペプチド・膜貫通領域の有無) によって GlcNAc と Fuc・Xyl・GalNAc の2グループに分類し、Fuc・Xyl・GalNAc 内において PSSM からスコアを算出することにより、高精度に O 型糖鎖修飾糖種を判別することが可能となった。今後は、現在データ数が少

なく解析が不可能であった別の糖種についても、公共データベースへ情報が蓄積されることにより、本研究で行ったアミノ酸配列・立体構造・細胞内局在化経路の糖種特異的特徴を抽出して利用することができ、糖種を判別することができると考えられる。O型糖鎖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や、糖鎖修飾のエラーによる疾患の具体的な要因を議論することにも応用できる。

第7章では、総論として本研究における問題意識と研究成果をまとめ、今後の方針を示した。