

氏名	長岡 憲次郎		
授与した学位	博士		
専攻分野の名称	薬学		
学位記授与番号	博甲第 4540 号		
学位授与の日付	平成 24 年 3 月 23 日		
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科創薬生命科学専攻 (学位規則第 5 条第 1 項該当)		
学位論文の題目	ヒト UDP-グルクロン酸転移酵素 UGT2B7 の触媒機能における N-結合型糖鎖修飾の役割		
論文審査委員	教授 岡本 敬の介	教授 三好 伸一	准教授 表 弘志 教授 成松 鎮雄

学位論文内容の要旨

UDP-グルクロン酸転移酵素 (UGT) はグルクロン酸抱合反応を触媒する小胞体局在性の糖タンパク質である。UGT2B7 は UGT の中でも多くの基質の代謝に関与する分子種であり、主要な医薬品のグルクロン酸抱合反応の約 4 割に関与する。UGT は殆どの分子種でアスパラギン結合型糖鎖付加を受けるとされているものの、この糖鎖が酵素機能に及ぼす影響に関する情報は少ない。本研究では、UGT2B7 に存在する 3 か所の潜在的 N-結合型糖鎖付加部位 (Asn67、Asn68 及び Asn315) について、それらの変異型タンパク質を作製して糖鎖付加部位を同定し、糖鎖付加の酵素機能に及ぼす影響を検討した。

まず、部位特異的変異導入法により、糖鎖付加を受ける Asn-Xaa-Ser/Thr (Xaa は Pro を除くアミノ酸) の Asn を Gln に置換した 5 つの変異型 UGT2B7 (N67Q, N68Q, N315Q, N68Q/N315Q 及び N67Q/N68Q/N315Q) cDNA を構築し、ヒト胎児腎細胞 (HEK293) に導入して安定発現細胞株を作製した。安定発現細胞から S9 画分を調製し、これらタンパク質をウェスタンブロット分析で比較すると、N67Q のタンパク質バンドは野生型と同等の移動度を示したが、N68Q 及び N315Q は低分子量側へとシフトした。また、N68Q/N315Q 及び N67Q/N68Q/N315Q はその移動度がさらに大きくなり、Asn68 及び Asn315 の 2 か所で N-結合型糖鎖付加の生じていることが明らかとなった。

プローブ基質であるジドブジン (AZT) 及びモルヒネグルクロン酸抱合反応では、AZT に対する UGT2B7 の親和性が糖鎖欠損により有意に低下したのに対し、モルヒネでは上昇した。また、これらの反応において、最大反応速度には影響は無かった。補酵素 UDPGA に対する影響では、糖鎖欠損により UDPGA に対する親和性は低下した。

糖鎖の影響をより詳細に検討するために、糖鎖付加された成熟 UGT2B7 酵素を非変性条件下で糖鎖切断酵素 endoglycosidase H と反応させ、AZT グルクロン酸抱合反応を測定すると、未処理の場合と比較して反応速度及び基質親和性に違いは認められなかった。また、タンパク質発現過程において N-結合型糖鎖付加阻害剤ツニカマイシンを添加した場合には UGT2B7 タンパク質の基質に対する親和性が、阻害剤の添加濃度依存的に低下した。

以上の結果から、N-結合型糖鎖の存在により、UGT2B7 の正常なフォールディングが行われ、本来の触媒機能を持つこと、成熟タンパク質の状態では N-結合型糖鎖は酵素活性に直接影響を与えないことが示唆された。さらに、UGT2B 分子種は糖鎖の有無により、触媒機能に異なる影響を及ぼす可能性が示された。

論文審査結果の要旨

博士論文の原案は1月13日頃に全審査員に配布された。審査員は本原案を査読し、1月25日(水)18:00からの岡本の教授室での、審査委員会にのぞんだ。審査委員会では、論文提出者による論文の概要の説明が45分間程度行われ、続いて45分間程度審査員による試問が行われ、引き続き判定会議が開かれた。論文の概要は以下の通りであった。

本論文では薬物代謝反応の第二相を触媒する主要な酵素として知られているUDP-グルクロン酸転移酵素(UGT)のアスパラギン残基に結合している糖鎖の結合部位や糖鎖結合の意義を解析している。UGTは小胞体膜結合型タンパク質であり、それゆえタンパク質として精製する事は難しく、活性-構造相関の解明は進んでいなかった。しかし近年UGTのcDNAがクローニングされ、遺伝子学的手法を用いた解析が可能となった。その結果本酵素群の酵素化学的研究も開始され、ある種のUGTは翻訳後修飾としてリン酸化やN-グリコシル化を受ける事も報告された。しかし多くの医薬品や内因性基質の代謝に関与しているUGT2B7でのこの糖鎖が付加するアミノ酸残基や付加した糖鎖の機能などは不明であった。本学位提出者は、N-グリコシル化を受ける可能性のあるコンセンサス配列下にある67, 68, 315位のアスパラギン残基を部位特異的変異導入法でグルタミン残基に置換した変異酵素を作製し、N-グリコシル化が酵素作用に及ぼす影響を調べた。その結果N-グリコシル化は68位, 315位で生じている事、結合した糖鎖は酵素の基質結合部位のコンフォメーションを変化させていることを示し、さらに糖鎖はUGTのフォールディングを正常に進行させる機能を有している可能性を示唆した。

試問ではモデル図での糖鎖の記載の方法、一部構造解析されている他のUGTとの類似性などの質問やコメントが出されたが、学位申請者は適切に応答し、論文の一部修正にも応じた。

判定会議では、これらの結果は薬物代謝で重要な位置を占めているUGT2B7の機能と構造の解析に寄与する結果であり、薬物代謝の研究領域の進展に貢献する成果である。用いられている手法も、部位特異的変異法をはじめ、新しい技術を駆使しており、学位(博士)論文に相当する内容である。また酵素反応も適確に解析されており、それらの結果を示す図、表も適切に配置されている。引用文献からの解説や討論も適所に加えられており、試問での学位論文提出者の応答も適切である。

以上の内容から、審査本論文は学位(博士)に相当する論文であると評価した。