

Studies on the Biosynthetic Pathway of Galactose-containing Oligosaccharides in Fission Yeasts

福永, 嵩大

<https://hdl.handle.net/2324/6787678>

出版情報 : Kyushu University, 2022, 博士 (農学), 課程博士

バージョン :

権利関係 : Public access to the fulltext file is restricted for unavoidable reason (3)

氏名	福永 嵩大		
論文名	Studies on the Biosynthetic Pathway of Galactose-containing Oligosaccharides in Fission Yeasts (分裂酵母におけるガラクトース含有糖鎖の生合成機構の解明に関する研究)		
論文調査委員	主査	九州大学	教授 竹川 薫
	副査	九州大学	教授 角田 佳充
	副査	九州大学	准教授 樋口 裕次郎

論文審査の結果の要旨

酵母において細胞表層の糖タンパク質は細胞の凝集や菌糸状の侵入性増殖に重要な役割を果たす。分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* は、ゴルジ体内腔でガラクトース(Gal)転移酵素により糖タンパク質の *N*-および *O*-結合型糖鎖に Gal 残基を転移する。Gal 残基は分裂酵母の生育には必須ではないが、タンパク質へのガラクトシル化は細胞形態の維持や非性的凝集に重要である。さらに糖鎖末端の Gal に付加するピルビン酸(Pv)の負電荷によって、非性的凝集反応は抑制される。そのため、分裂酵母は糖鎖中の Gal および Pv 化 Gal を同種細胞間のコミュニケーションに活用していると考えられる。糖鎖中の Gal は α -1,2 結合、 α -1,3 結合、 β -1,3 結合の 3 つの結合様式で存在し、ゴルジ体内腔に局在する Gal 転移酵素によって付加されるが、詳細な機構については未解明であった。そこで、本研究では糖鎖への Gal 付加を担う糖転移酵素の機能および基質特異性の解析を行い、分裂酵母の Gal 含有糖鎖生合成機構の解明を試みている。

分裂酵母 *Schizosaccharomyces* 属は 4 種 (*S. pombe*, *S. octosporus*, *S. cryophilus*, *S. japonicus*) の全ゲノム配列が決定されており、相同性検索の結果、*S. pombe* 以外の 3 種にも推定 α -Gal 転移酵素 (GalT) 遺伝子が存在することがわかったため、3 種の *N*-および *O*-結合型糖鎖の構造解析を行っている。その結果、4 種の分裂酵母の糖鎖構造は類似しているが、Gal の結合様式に違いが認められた。さらに Gal 含有糖鎖の機能を解析するために、*S. japonicus* の UDP-Gal 輸送体遺伝子を破壊して Gal 鎖欠損株を構築している。*S. japonicus* は生育環境により、菌糸状に増殖することが知られているが、Gal 鎖欠損株は菌糸状成長が極度に抑制されることを明らかにしている。

分裂酵母糖鎖中の α -1,2 および α -1,3 結合の Gal を付加する推定 GalT は、分裂酵母ゲノム上に計 10 遺伝子が存在する。そこで、当研究室で取得された GalT の 10 重遺伝子破壊株(Δ 10GalT)に各 GalT 遺伝子を単独で導入した株を作製し、それらの株の糖鎖構造を比較解析することにより、各 GalT の基質特異性の解明を目指している。その結果、Gma12、Gmh1、Gmh2、Gmh3、Gmh6、Otg2、Otg3 が単独で Gal 転移活性を示すこと、Gma12 と Gmh6 は *O*-結合型糖鎖へ、Gmh1-3 は *N*-結合型糖鎖へ Gal を付加することを明らかにしている。さらに Otg1 は Gmh6 と共発現することによって Gal 転移活性を示したことから、分裂酵母における Gal 鎖合成には、各糖転移酵素の基質特異性に基づく一定の Gal 付加経路が存在することを見出している。

分裂酵母には、 β 1,3-結合の Gal 残基が *N*-結合型糖鎖のみに存在する。これまで、 β 1,3-結合の Gal 転移反応の分子メカニズムは不明であった。先行研究によって分裂酵母の糖鎖中に β 1,3-Gal が付加されない変異株が取得され、 β 1,3-Gal 転移反応に関与する機能未知タンパク質 Pvg (pyruvylated

glycan)2、3、5 が同定された。Pvg3 のみが糖転移酵素に保存されている GT31 ドメインを有していたため、糖転移活性に重要と予想されるアミノ酸の点変異体(D212A、D282A)を作製して *pvg3Δ* 株に対する機能相補試験を行っている。その結果、両点変異体は正常にゴルジ体に局在したが、 β 1,3-Gal 転移活性を欠失していた。以上の結果から、Pvg3 が β 1,3-Gal 転移酵素であり、D212 および D282 残基が活性に重要であることを見出している。また、*pvg2Δ*、*pvg5Δ* 株でも Pvg3 はゴルジ体に正常に局在したことから、Pvg2、Pvg5 は Pvg3 の局在には必要でなく、ゴルジ体内腔で Pvg3 の機能を補助することが予想された。そこで Yeast Two-hybrid 法を用いて Pvg2、Pvg3、Pvg5 各タンパク質の相互作用を調べた結果、タンパク質間相互作用が観察され、Pvg5 を中心とした Pvg3-Pvg5-Pvg2 ヘテロ複合体が形成されることを示唆している。

以上、要するに本研究はこれまで解析がほとんど行われていなかった分裂酵母の Gal 含有糖鎖の生合成機構について多くの新規な知見を見出したものであり、応用微生物学及び糖鎖生物学分野の発展に寄与する価値ある業績と認める。

よって、本研究者は博士(農学)の学位を得る資格を有するものと認める。