

糖転移酵素の関与するメラニン産生制御の解析

谷口直之

大阪大学大学院 医学系研究科

糖タンパク質糖鎖には、アスパラギン結合型(N型)糖鎖とムチン型(O型)糖鎖があり、N型糖鎖をもつものが多い。N型糖鎖のコア分岐構造は6つのN-アセチルグルコサミン転移酵素(*GnT-1* ~)によって合成される。*GnT-1* ~ はヒトに存在し、ヒト遺伝子が同定されているが、*GnT-1* は魚類や鳥類では見つかったが、哺乳動物からはまだ見つからない。*GnT-1* あるいは *GnT-2* で合成される高分岐糖鎖構造は、癌細胞の転移や受精、受容体機能、免疫反応などに関係している。糖鎖が高分岐化すると、多価性が付与されて糖鎖受容体との親和性が非常に高まることから、*GnT-1* の導入によりさまざまな生物作用が生じることが予想された。また、ヒトの *GnT-1* 相同遺伝子 *hGnT-1* に関しては、試験管内で糖転移酵素活性はみられていないが、未知の糖鎖修飾反応を触媒する可能性が考えられた。

メラニン細胞のメラニン産生のキー酵素であるチロシナーゼは、チロシン加水分解活性とドーパ酸化活性を同時にもち、その活性にはN型糖鎖が必須であることが知られている。また、 α -MSH等によるcAMP産生刺激によってメラノーマ細胞のメラニン産生が増加する際、さまざまなタンパク質のN型糖鎖の合成が促進される。このように、メラニン細胞におけるメラニン産生にはN型糖鎖が深く関わっていることがわかっているが、実際どのような糖鎖構造が関与しているのか、また、どのような糖転移酵素が関与しているのかは不明である。われわれは、最近、*GnT-1* 遺伝子をマウスメラノーマ細胞 B16 細胞に発現させると、チロシナーゼの糖鎖構造が変化するとともに、その活性が上昇して、メラニン産生が増大することを見出した。そこで他の糖転移酵素の影響を調べるために、トリの *galGnT-1* と *hGnT-1* の cDNA をマウスメラノーマ細胞 B16F1 に導入してその効果を調べた。

【結果および考察】

チロシナーゼの活性を規定する因子は複数あり、糖鎖もその一因と考えられる。実際、チロシナーゼについているN型糖鎖は分子シャペロンとの結合に関わり、酵素活性の発現に必要であることが証明されている。以前、我々はN-アセチルグルコサミン転移酵素 *GnT-1* 遺伝子をマウスメラノーマ B16 細胞に導入するとチロシナーゼ活性の上昇に伴いメラニン産生が増加することを見出した。

本研究では、*galGnT-1* 遺伝子導入細胞ではチロシナーゼ活性の低下に伴ってメラニン産生が抑制され、一方、*hGnT-1* 遺伝子導入細胞では逆にチロシナーゼ活性の上昇に伴いメラニン産生が亢進することを見出した。*GnT-1* はN型糖鎖の分岐形成により、また、*hGnT-1* も未知ではあるが糖転移酵素である可能性が高いので、これらの遺伝子導入は、チロシナーゼを含む糖タンパク質糖鎖の構造を改変し、活性に影響を及ぼすことが予想された。しかし両者のトランスフェ

クタントにおいて、導入した遺伝子が発現していることを mRNA レベルでは確認できるものの、*GnT* の活性は検出できなかった。

一方、ポリ N-アセチルラクトサミンと 1,6GlcNAc 分岐部を認識する植物レクチン DSA と L-PHA を用いたフローサイトメトリーにより細胞表面の糖鎖構造の変化を調べたところ、*galGnT* 遺伝子導入細胞と *hGnT* *h* 遺伝子導入細胞における細胞表面の糖鎖変化は逆に動いた。このレクチンとの反応性が、導入遺伝子産物の直接的な糖転移酵素活性に基づくものであるか、それとも他の糖転移酵素群の攪乱に基づくものであるかは不明である。

チロシナーゼの活性変化とチロシナーゼの mRNA の発現が相関していたことから、本研究で観察された *galGnT* あるいは *hGnT* *h* 遺伝子導入によるメラニン産生量の変化は、一つにはチロシナーゼ遺伝子の発現が変化したためと思われる。この原因としては、*galGnT* と *hGnT* *h* の mRNA が直接チロシナーゼ遺伝子の転写あるいはチロシナーゼ mRNA の安定性に干渉した可能性が考えられる。別の可能性としては、細胞表面の糖鎖変化が、チロシナーゼ遺伝子の発現に影響を及ぼしたか、あるいは別の分子を介してチロシナーゼ mRNA の安定性を調節していることが考えられる。

以上をまとめると、トリ *GnT* 遺伝子およびヒト *GnT* *h* 遺伝子のマウスメラノーマ細胞における発現は、チロシナーゼの発現変化を介して、メラニン産生を制御することが明らかとなった。