

氏名	井 宮 公 之 い み や き み ゆ き
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学位記番号	薬 博 第 486 号
学位授与の日付	平成 14 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	薬学 研究科 生命薬科学 専攻
学位論文題目	HNK-1 糖鎖抗原の生合成に関わる二種類のグルクロン酸転移酵素の基質特異性および遺伝子構造解析

論文調査委員 (主査) 教授 川 寄 敏 祐 教授 市 川 厚 教授 伊 藤 信 行

### 論 文 内 容 の 要 旨

糖鎖は細胞表面上でタンパク質や脂質に結合しており、細胞間接着や細胞の移動に重要であることが近年次第に解明されつつある。中でも HNK-1 糖鎖抗原は神経系に特徴的に発現しており、神経細胞の移動、接着、神経突起の伸長への関与が示唆されている。本糖鎖抗原の構造は細胞表面上に豊富に存在する N-アセチルラクタサミン構造の末端に、3 位が硫酸化されたグルクロン酸が結合した特異的な構造をしている。申請者の所属する研究室ではすでに、この N-アセチルラクタサミン構造にグルクロン酸を転移する酵素として、二種類のグルクロン酸転移酵素 (GlcAT-P および GlcAT-S) が存在することを明らかにしている。本研究は、HNK-1 糖鎖生合成におけるこれら二種類のグルクロン酸転移酵素の役割を解明することを目的としたものである。第一章では糖タンパク質に特異的なグルクロン酸転移酵素 (GlcAT-P) の基質特異性について、第二章では第二のマウスグルクロン酸転移酵素 (GlcAT-S) の cDNA クローニングと遺伝子構造解析を行った。

#### 第一章 ラットグルクロン酸転移酵素のタンパク質性基質に対する基質特異性

ラットグルクロン酸転移酵素 (GlcAT-P) の酵素学的性質を明らかにするため、糖タンパク質に対する基質特異性を検討した。まず、N-アセチルラクタサミン構造を多く含むアシアロオロソムコイドをモデル基質とし、生後14日齢のラット脳から精製したグルクロン酸転移酵素を酵素源として酵素反応を行った。反応生成物から糖鎖を遊離させ、ピリジルアミノ化した後、高速液体クロマトグラフィーによる2次元マッピングや質量分析法を用いて、グルクロン酸の転移された糖鎖の構造解析を行った。その結果、GlcAT-P はアシアロオロソムコイドに存在する主要な複合糖鎖である2本鎖、3本鎖、4本鎖に対し、ほぼ同じ効率でグルクロン酸を転移することが明らかとなった。

次にピリジルアミノ化した種々の複合型糖鎖を基質として、グルクロン酸転移反応を行い、グルクロン酸の転移された分枝の同定を行った。その結果、本酵素は糖鎖末端に存在する N-アセチルラクタサミン (Gal $\beta$ 1-4GlcNAc) 構造を厳密に認識すること。さらに、N-アセチルラクタサミン構造のなかでも特に Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-4Man $\alpha$ 1-3の構造に対して最もよくグルクロン酸を転移する、いわゆる分枝特異性を持つことが明らかとなった。

#### 第二章 HNK-1 糖鎖生合成に関わる第二のマウスグルクロン酸転移酵素の cDNA クローニングおよび遺伝子構造解析

HNK-1糖鎖抗原の生合成に関与する二種類のグルクロン酸転移酵素 (GlcAT-P, GlcAT-S) の遺伝学的な相違点を調べるため、マウス GlcAT-S の cDNA クローニング、遺伝子構造解析および遺伝子マッピングを行った。

生後9日齢マウス大脳の RNA を鋳型とし、すでに明らかにされているラット GlcAT-S のアミノ酸配列の情報をもとに縮重プライマーを作成し、PCR 法によってクローニングを行った。得られた cDNA 断片の塩基配列の情報をもとに5'領域、3'領域は RACE 法により塩基配列を決定した。これらの塩基配列の情報よりマウス GlcAT-S は324アミノ酸残基からなり、ラット GlcAT-S と98.1%、マウス GlcAT-P とは58.2%の相同性を示した。続いてノーザン・ブロット法により各組織でのマウス GlcAT-S の発現を解析した結果、マウス GlcAT-S は神経系に特異的に発現していることが確認された。

次に、マウス GlcAT-S cDNA をプローブとして Svj 129マウスゲノムライブラリーをスクリーニングし、GlcAT-S 遺伝子断片を複数単離した。構造解析の結果、GlcAT-S 遺伝子は翻訳領域が4つのエクソンからなり、全体で25kbp以上に及ぶ遺伝子であることが明らかとなった。さらにサザン・ブロット法や FISH 法により解析した結果、マウス GlcAT-S 遺伝子は単一コピーの遺伝子であり、第1番染色体の A4-B 領域に位置していることが示された。GlcAT-S 遺伝子のエクソン、イントロンの構造は GlcAT-P 遺伝子のそれと大きく異なり、染色体上の位置も異なることが明らかとなった。

以上、本研究は HNK-1 糖鎖抗原の生合成に中心的な役割を担う二種類のグルクロン酸転移酵素に関して、その基質特異性や遺伝子の構造について明らかにしたものであり、生体内における二種類のグルクロン酸転移酵素の存在意義を考えるうえにおいて重要な知見を与えるものである。

## 論文審査の結果の要旨

近年、神経回路網の形成過程における細胞間相互作用に糖鎖が直接的に関与することが明らかにされつつある。このような糖鎖の一つに、免疫グロブリンスーパーファミリーに属する神経系細胞接着分子に特徴的に発現する HNK-1 糖鎖抗原が知られている。本抗原は硫酸化されたグルクロン酸が N-アセチルラクタミン構造の末端に結合した極めて特徴的な構造をもつ。その生合成は、まず、二種類の特徴的なグルクロン酸転移酵素 (GlcAT-P および GlcAT-S) により、糖タンパク質糖鎖の周辺部に含まれる N-アセチルラクタミン構造の非還元末端にグルクロン酸が転移され、ついで、硫酸基転移酵素の働きにより、このグルクロン酸の3位が硫酸化されて完成する。

申請者はまず、アジアロオロソムコイド (ASOR) と複合型 N-グリコシド型糖鎖を用いて主要な HNK-1 糖鎖抗原生合成酵素であるグルクロン酸転移酵素 (GlcAT-P) の基質特異性について解析した。その結果、GlcAT-P は2本鎖、3本鎖、4本鎖の複合型 N-グリコシド型糖鎖いずれも良い基質とすること、GlcAT-P は複合型糖鎖内の結合様式に対する分枝特異性 (ブランチ特異性) を有し、Gal $\beta$ 1-4 GlcNAc  $\beta$ 1-4 Man  $\alpha$ 1-3 部位に対してグルクロン酸を転移しやすいこと、しかし、この糖鎖の末端の結合が Gal $\beta$ 1-3 結合になると全く転移せず、末端の N-アセチルラクタミンを厳密に認識することを明らかにした。

次に申請者は第二のマウスグルクロン酸転移酵素 (GlcAT-S) の cDNA クローニングとその遺伝子構造解析を行った。マウス GlcAT-S の cDNA クローニングはラット GlcAT-S との相同性を利用して、PCR 法によって行った。得られたマウス GlcAT-S は975塩基の翻訳領域アミノ酸配列は、ラット GlcAT-S に対して98.1%の高い相同性を示し、ラット GlcAT-P に対しては49.5%の相同性を示した。また、マウスはラットの GlcAT-S と比較して6個のアミノ酸残基が異なっていた。マウス GlcAT-S は分子量が約37kDa でヒドロパシーブロット解析から II 型膜貫通タンパク質と予想された。また、ノーザンブロット解析の結果、神経系に強く発現していて肝臓に発現していないことが示された。GlcAT-S マウス GlcAT-S 遺伝子構造は翻訳領域が4つのエクソンからなり、全体で25キロ塩基対以上の構造をもつことを明らかにした。マウス GlcAT-S 遺伝子の転写開始点を決定した結果、複数の部位から転写されることが示された。プロモーター領域は基本転写因子に必要な TATA ボックスや CCAAT ボックスが存在せず GC 含量が高いこと、転写因子結合部位として c-Ets-1, p300, C/EBP, AP-1 等が含まれることが分かった。

以上の研究は、神経系の回路形成に関与する糖鎖抗原の生合成の機作の解明をすすめる上で重要な知見を明らかにしたものであり、よって本論分は博士 (薬学) の論文として価値あるものと認める。

更に、平成14年2月28日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。