

氏名	みつもと やすひろ 三本 靖 洋
学位(専攻分野)	博士(薬学)
学位記番号	薬博第487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糖鎖抗原の機能と、その生合成に関与するグルクロン酸転移酵素による糖鎖発現調節に関する研究
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

近年細胞表面の糖鎖が、細胞と細胞、細胞と細胞外基質間の認識や接着といった、重要な機能の一端をになっていることが明らかとなってきた。HNK-1糖鎖抗原は、このような機能的糖鎖の一つであり、昆虫からヒトまで多種の動物にわたり、発生初期の神経系組織において高発現することが知られている。このような時期・部位に特異的な発現様式から、HNK-1糖鎖抗原の神経回路網形成への関与が指摘されている。

HNK-1糖鎖抗原はN-アセチルラクトサミン構造の非還元末端に硫酸化グルクロン酸が結合した、他の糖鎖では見られない特殊な構造を持っている。申請者の所属する研究室では、本糖鎖の生合成経路に着目し、その生合成に関与するグルクロン酸転移酵素(GlcAT-P, GlcAT-S)のクローニングに成功している。またSchachnerらとの共同研究によって、末端のグルクロン酸に硫酸基を付加する硫酸基転移酵素(HNK-1 ST)もクローニングされている。その結果、これらの遺伝子の発現を制御する事により、今まで困難であった糖鎖の直接的な機能に関する研究が可能となった。一方、ヒトにおいては、本糖鎖がMタンパク質血症と呼ばれる脱髄性の神経変性自己免疫疾患の自己抗原となることも知られている。そこで、本研究においては2つのグルクロン酸転移酵素(GlcAT-P, GlcAT-S)の発現様式から、HNK-1糖鎖抗原の発現制御について検討を行い、さらにヒトにおけるMタンパク質血症との関連について検討した。さらにグルクロン酸転移酵素強制発現系を用いて、直接的に本糖鎖の機能についての検討を行った。

第一章 ヒトグルクロン酸転移酵素(GlcAT-P)のクローニングとその解析

ヒトHNK-1糖鎖抗原の機能を知るためには、その生合成酵素であるGlcAT-Pのクローニングは必須である。そこで、ラットにおいて既にクローニングされていたラットGlcAT-Pの遺伝子配列を基にして、ヒト脳cDNAライブラリーよりヒトGlcAT-Pのスクリーニングを行った。得られたcDNAクローンは全長3446bpで、334アミノ酸からなるII型の膜タンパク質をコードしているものと推定された。ヒトGlcAT-PはラットGlcAT-Pの開始コドンの直後に17bpからなるインサートが存在し、その結果N末端から13アミノ酸が欠損した構造をとるものと推定された。またNorthern BlotによってmRNAの発現を解析したところ、ヒトGlcAT-Pは主に脳で強い発現が見られ、肝臓で弱い発現が見られた。さらに、FISH法により染色体マッピングを行い、ヒトGlcAT-P遺伝子は第11番染色体(11q25)に存在することを明らかにした。

第二章 HNK-1糖鎖抗原生合成酵素のmRNA発現分布の解析

次に実際にHNK-1糖鎖抗原の発現がどのように調節されているかを調べる目的で、ラットにおける本糖鎖の生合成に関与する2種のグルクロン酸転移酵素(GlcAT-P, GlcAT-S)および、末端グルクロン酸に硫酸基を転移する硫酸基転移酵素(HNK-1 ST)のmRNAの発現分布について、Northern blot法や*in situ* hybridization法により解析した。さらに、HNK-1糖鎖抗原の免疫組織染色を行い、これらの生合成酵素の発現との相関性を検討した。その結果、GlcAT-P, GlcAT-Sは比較的若い時期に高発現していた。またGlcAT-P, GlcAT-SがHNK-1糖鎖抗原発現部位に特異的な発現を示すのに対し、HNK-1 STはほとんど全ての細胞において発現が見られたことから、HNK-1糖鎖抗原の生合成において、

2種のグルクロン酸転移酵素が律速的な働きをすることが示された。また、GlcAT-PとGlcAT-Sは発現部位や時期が異なっていることから、それぞれ相補的に働く可能性が示唆された。

第三章 HNK-1糖鎖抗原による接着分子間相互作用の調節機構の解析

HNK-1糖鎖抗原の発現が細胞間相互作用にどのような変化を起こすかを調べる目的で、C6グリオーマ細胞にGlcAT-Pを導入し、HNK-1糖鎖抗原を安定発現する細胞株C6/GlcAT-P細胞を作製した。このC6/GlcAT-P細胞は、親細胞株C6グリオーマ細胞と比較すると明らかに細胞凝集の低下が観察された。一方、C6/GlcAT-P細胞のHNK-1抗体による前処理や、塩素酸ナトリウム処理によるHNK-1糖鎖抗原からの硫酸基の消失に伴って細胞の凝集性が回復した。これらの結果はC6/GlcAT-P細胞における細胞間相互作用の減少が、HNK-1糖鎖抗原の発現によって引き起こされたことを示している。さらに、C6/GlcAT-P細胞のHNK-1糖鎖抗原は主にN-CAMとL1上に発現していることから、HNK-1糖鎖抗原はこれら細胞接着因子のホモフィリックな結合を阻害することによって、細胞間相互作用を弱める可能性が示された。また、HNK-1糖鎖抗原の共存によって、C6/GlcAT-P細胞の凝集性が回復したことなどの結果を基に、HNK-1糖鎖の発現がN-CAMなどの細胞接着分子の不活性化に関する新しい分子機構モデルを提出した。

以上、本研究はHNK-1糖鎖抗原の機能や、その発現調節機構に関して新しい知見を得たものであり、神経回路網形成という発生過程における大きな謎を紐解く一つの手がかりとなるだけでなく、Mタンパク質血症の発症のメカニズムやその治療法を探索する上での重要な知見となるものである。

論文審査の結果の要旨

神経回路網の形成には、細胞間や細胞と細胞外基質間の認識や接着の厳密な制御が必須であり、様々な接着分子やそのリガンドがこれに関与している。近年このような接着分子上に発現する糖鎖が、接着分子の機能調節に重要な働きを持つことが明らかにされてきている。単クローン抗体HNK-1によって認識されるエピトープであるHNK-1糖鎖抗原は、N-アセチルラクタサミン構造の非還元末端に、硫酸化されたグルクロン酸が付加した、他の糖鎖では見られない特徴的な構造を持っている。HNK-1糖鎖抗原の生合成は、まず、二種類のグルクロン酸転移酵素(GlcAT-PおよびGlcAT-S)によりN-アセチルラクタサミン構造の非還元末端にグルクロン酸が β 1-3で付加され、さらに末端グルクロン酸の3位が硫酸基転移酵素によって硫酸化されるという、二段階の反応によって生合成される。一方、ヒトにおいてHNK-1糖鎖抗原は、Mタンパク質血症と呼ばれる脱髄性の自己免疫疾患の自己抗原となることが知られている。本研究はHNK-1糖鎖抗原の発現を制御するグルクロン酸転移酵素について解析し、次のような成果を上げている。

申請者はまず、ヒトGlcAT-P cDNAのクローニング及びその解析を行った。ヒトGlcAT-Pのアミノ酸配列はラットGlcAT-Pと98.2%と非常に高い相同性を示した。また触媒領域の4つの高度に保存された領域では、完全に一致していた。ヒトGlcAT-PはラットGlcAT-Pと比較して細胞質領域が13アミノ酸残基欠失したトランケート型の構造を持っていた。これはラットGlcAT-Pでは開始コドンの直下に17塩基対からなる挿入配列を持ち、ラットGlcAT-Pと同位置からの翻訳開始では4番目が終始コドンとなるため、ラットにおける2番目のメチオニンを開始コドンとして用いているためであると考えられた。また、ヒトにおけるGlcAT-Pの臓器分布についてノーザンブロット解析を行ったところ、ヒトGlcAT-PのmRNAは脳で強い発現が見られた他、肝臓で弱い発現が見られた。この結果はHNK-1糖鎖抗原が神経系組織において高発現していることとよく一致していた。肝臓で発現するHNK-1糖鎖抗原は免疫系に由来する細胞であり、何らかの免疫作用に関与していると考えられた。また、ヒトGlcAT-P遺伝子はシングルコピーであり第11番染色体(11q25)に存在することを明らかにした。GlcAT-P、GlcAT-SがHNK-1糖鎖抗原発現部位に特異的な発現を示すのに対し、HNK-1特異的硫酸基転移酵素はほとんど全ての細胞において発現が見られた。このことはHNK-1糖鎖抗原の生合成において、2種のグルクロン酸転移酵素が律速的な働きをすることを示している。さらに、細胞表面にHNK-1糖鎖抗原が発現することにより、細胞凝集が低下することを示し、このような凝集の低下は、接着分子上に発現するHNK-1糖鎖抗原が、接着分子間の相互作用を低下させることによって起こることを明らかにした。また、接着分子間の相互作用の低下の機序として、HNK-1糖鎖抗原による接着分子の不活性化が生じるという新しい作用機構を提出した。

以上の研究は、神経系の回路形成に関与する糖鎖抗原の役割を理解す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。