

氏 名	森 和 俊 もり かず とし
学位の種類	薬 学 博 士
学位記番号	論 薬 博 第 367 号
学位授与の日付	昭 和 62 年 9 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 5 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	肝臓マンナン結合タンパク質の生物学的意義に関する研究

論文調査委員 (主 査) 教授 山科 郁男 教授 市川 厚 教授 河合 明彦

論 文 内 容 の 要 旨

近年、動物体内にも糖タンパク質の糖鎖の微細な構造を識別し、これに結合するレクチン様物質が存在することが明らかにされ、糖タンパク質の血流から細胞内への取り込み、あるいは、糖タンパク質の細胞内輸送など高次の認識機構に関与することが示されている。これらのうち、糖タンパク質の糖鎖の非還元末端のマンノース（以下 Man と略す）および N-アセチルグルコサミン（以下 GlcNAc と略す）残基を特異的に認識し、カルシウム依存的に結合する動物レクチンは、これらの糖鎖と類似の構造を持つ酵母マンナンと強く結合することから、マンナン結合タンパク質（以下 MBP と略す）と総称され、いくつかの動物組織から単離されている。

著者は、肝臓より単離された MBP（肝臓 MBP）の生物学的意義を解明することを目的として本研究を行った。その結果、まずラットの肝臓 MBP が肝実質細胞に由来することを見だし、その細胞内分布および存在様式を明らかにした。また、肝細胞中に肝臓 MBP の内在性リガンドが存在することを見だし、その細胞内分布を調べた。さらに、内在性リガンドを単離してその性質を検討し、いくつかの内在性リガンドの同定を行うことが出来た。

(1) 肝臓中の MBP の局在性

ラット肝臓をコラーゲナーゼ灌流法により実質細胞と非実質細胞（類洞内皮細胞、Kupffer 細胞、および脂肪摂取細胞を含む）に分け、これらの細胞（群）における MBP の分布を調べた。

両細胞を可溶化して全マンナン結合活性を測定すると、実質細胞は非実質細胞の約 26 倍高い値を示し、実質細胞からは肝臓全体の場合と同様の収量および収率で肝臓 MBP が得られた。従って、肝臓 MBP は実質細胞に由来することが明らかとなった。肝臓 MBP は実質細胞表面には存在せず、また、実質細胞はマンナンを細胞内に取り込む活性を持たないことから、肝臓 MBP は細胞内に存在すると考えられた。

非実質細胞にはマンナンを特異的に細胞内に取り込む機構が存在し、細胞表面にマンナン結合活性が検出された。この取り込み機構に関与するレセプター MBP は、肝臓 MBP といくつかの点で類似した性質

を示したが、その活性が肝臓 MBP に対する抗体で中和されず、肝臓 MBP とは異なるタンパク質であることが明らかとなった。

(ii) 肝臓 MBP およびその内在性リガンドの細胞内分布

肝臓中には肝臓 MBP の拮抗的阻害物質（内在性リガンド）が検出された。そこで、マンナンを Sepharose 4B に結合させたアフィニティーカラムを用いて肝臓 MBP と内在性リガンドを分離した後、両者の細胞内分布を調べた。

ラット肝臓のホモジネートを常法に従い5分画すると、MBP は小胞体のマーカー酵素であるグルコース6-ホスファターゼ活性とよく一致した分布を示し、ミクロソーム画分に全活性の約75%が回収された。ミクロソーム内では、約75%のマンナン結合活性が粗面ミクロソームに回収され、タンパク質あたりの比活性も粗面ミクロソームが滑面ミクロソームの約2倍高い値を示した。滑面ミクロソームに含まれる細胞内顆粒のうち、原形質膜の MBP 量は非常に少なかったが、ゴルジ装置にはかなりの MBP が存在した。従って、MBP は粗面小胞体からゴルジ装置に至る細胞内膜系に広く分布しているが、粗面小胞体に多量かつ高濃度に存在していることが明らかになった。

次に、MBP のミクロソームでの存在様式を調べるため、界面活性剤処理とプロテアーゼ処理を組み合わせた実験を行った。その結果、MBP はミクロソームの内腔側に、膜にゆるく結合する形で存在していることが明らかになった。

内在性リガンドの細胞内分布は MBP の分布とほぼ一致し、粗面ミクロソームに約50%が存在するほか、滑面ミクロソーム、ゴルジ装置にも存在した。これらの膜系において、ほとんどの MBP は内在性リガンドと結合した状態で存在していることが示唆された。一方、リソソームには MBP は検出されなかったが、MBP に対する阻害物質が高度に濃縮されていた。

(iii) 肝臓 MBP の内在性リガンドの単離とその性質

粗面ミクロソームあるいは初代培養肝細胞の抽出物から、MBP を Sepharose 4B に結合させたアフィニティーカラムにより、肝臓 MBP の内在性リガンドの30~40%を単離することが出来た。

種々のアイソトープで標識した初代培養肝細胞から単離した内在性リガンドの性質を調べたところ、その約2/3は半減期約45分の比較的速い代謝回転速度を持つ糖タンパク質であった。

内在性リガンドの糖鎖構造は、約60%が $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ 、 $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ を主成分とする高マンノース型であり、シアル酸を含む複合型糖鎖は10%以下であった。これに対し、全細胞タンパク質の半減期は平均5時間であり、糖鎖の約70%はシアル酸を含む複合型であった。

粗面ミクロソームの内在性リガンドを SDS 電気泳動にかけて分析すると、主要な8本のバンドを示した。これらのバンドの分子量と、種々の特異的抗体との反応性から、8本のバンドのうち5本は、 α_1 -マクログロブリン、 α_1 -アンチトリプシン、 α_1 -酸性糖タンパク質などの血清糖タンパク質の細胞内前駆体であり、1本はリソソーム酵素である β -グルクロニダーゼと同定された。

最近の研究によると、糖タンパク質糖鎖の細胞内プロセッシング反応は、その糖タンパク質の細胞内輸送、特に粗面小胞体よりゴルジ装置、ゴルジ装置よりリソソーム顆粒への輸送、に重要な役割を持つことが示されている。本研究結果は、これらのオルガネラには同時に、糖タンパク質生成中間体と高い親和性を持って結合する内在性のレクチンが含まれることを初めて明らかにしたものであり、肝臓 MBP が、これらのオルガネラにおいて、糖タンパク質の細胞内輸送の際のキャリアーとして、あるいは、糖鎖のプロセッシング反応における調節タンパク質として重要な意味を持つことを示唆している。

論文審査の結果の要旨

生体内のタンパク質のほとんどが糖を含むことから、糖鎖の存在意義に関する研究が盛んに行われている。本論文は、レクチンの性質を明らかにすることを通じて糖タンパク質糖鎖の意義を解明しようとするものである。

レクチンとしては、哺乳動物のレクチンのうち、マンノースと N-アセチルグルコサミンを特異的に認識する、いわゆるマンナン結合タンパク質 (MBP) を採り上げ、その肝臓内分布、細胞内分布、内在性リガンドについて詳細に調べている。

ラット肝臓を実質細胞と非実質細胞に分けて、MBP の分布を調べ、MBP は実質細胞では細胞内に、非実質細胞では細胞表面に存在することを明らかにし、MBP の多様性を示した。実質細胞について細胞内分布を調べたところ、粗面小胞体からゴルジ装置に至る細胞内膜系の内腔に、膜にゆるく結合する形で存在することを明らかにしている。これらの知見から、実質細胞の MBP が、細胞外から糖タンパク質を取り込む機構に関与するのではなく、細胞内において糖タンパク質に関するなんらかの識別機構に関与していることが示唆されている。

細胞内にあって MBP と結合している、いわゆる内在性リガンドの探索が行われ、これらが粗面小胞体からゴルジ装置にかけて MBP を共存した形で存在することがつきとめられている。さらに、内在性リガンドの糖鎖が、MBP と高い親和性を持つ、高マンノース型の糖鎖であることが示され、さらに、リガンドそのものを抗体を用いて調べることにより、血清糖タンパク質の前駆体、リソソーム酵素の前駆体などが同定されている。

以上の研究により、実質細胞の MBP が糖タンパク質の細胞内輸送に関与することが強く示唆された。MBP の生物学的意義、ひいては糖タンパク質糖鎖の存在意義の解明に大きな貢献がなされている。従って、本論文は薬学博士の学位論文として価値あるものと認定する。

さらに昭和 62 年 7 月 31 日論文内容とそれに関連した事項につき試問を行った結果優秀と認定した