

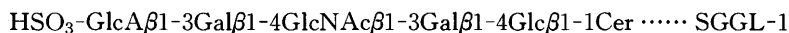
氏 名	てら やま こう じ 寺 山 浩 司
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学位記番号	薬 博 第 389 号
学位授与の日付	平 成 9 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	薬 学 研 究 科 製 薬 化 学 専 攻
学位論文題目	HNK-1 糖鎖抗原の生合成に関わるグルクロン酸転移酵素の研究
論文調査委員	(主 査) 教 授 川 寄 敏 祐 教 授 市 川 厚 教 授 伊 藤 信 行

論 文 内 容 の 要 旨

細胞表面上の糖タンパク質や糖脂質は、細胞間認識、細胞接着といった細胞間相互作用に重要な役割を果たしている。これらの細胞表面上の糖鎖のうち、単クローン抗体 HNK-1 によって認識される HNK-1 糖鎖抗原は、神経系組織に特異的に見いだされる糖鎖で、PO, NCAM, MAG, L1 といった免疫グロブリンスーパーファミリーに属する細胞接着分子上、および糖脂質 SGGL (sulfo-glucuronyl-glycolipid) に発現していることが知られている。HNK-1 糖鎖抗原はラクトサミン構造に、硫酸化したグルクロン酸が結合した、きわめて特徴的な構造を持っている (図 1 参照)。これら HNK-1 糖鎖抗原は時期特異的、領域特異的に発現することから、神経回路網形成における細胞間相互作用への関与が示唆されており、神経冠細胞の移動や、運動神経細胞からの神経突起の伸展、神経細胞-グリア細胞間の接着といった現象に、この HNK-1 糖鎖抗原が関与することが報告されている。

申請者は、この HNK-1 糖鎖の神経回路網形成における機能を分子レベルで理解するため、その生合成過程に注目し、末端グルクロン酸を転移するグルクロン酸転移酵素について解析し、以下に述べるような新知見を得た。

○糖脂質



○糖タンパク質

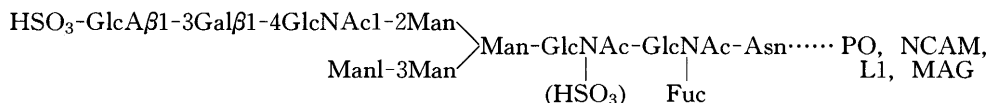


図 1 HNK-1 糖鎖抗原の構造

第一章 ラット脳グルクロン酸転移酵素の性質の解明

申請者は、合成糖脂質 nLc-PA14 (ネオラクトテトラオース-フェニルアルキル誘導体) および、糖タ

ンパク質 ASOR (アジアロオロソムコイド) を糖受容体とするグルクロン酸転移活性測定法を確立し、ラット脳内にそれぞれの糖受容体に対するグルクロン酸転移活性が存在していることを示した。さらに、糖脂質性受容体に対する活性と糖タンパク質性受容体に対する活性は、その至適 pH、二価カチオン要求性、糖供与体 (UDP-GlcA) に対する親和性などに相異が見られるなど、両活性は互いに異なる酵素学的性質を示した。そこで、UDP-GlcA を用いたアフィニティークロマトグラフィーで酵素源であるラット脳 NP-40 抽出物を処理したところ、糖タンパク質に対するグルクロン酸転移活性と糖脂質に対する活性は分離され、両活性が異なるグルクロン酸転移酵素によって触媒されていることが明らかとなった。

第二章 糖タンパク質性 HNK-1 糖鎖抗原の生合成に関わるグルクロン酸転移酵素の精製

ラット脳内のグルクロン酸転移酵素は、糖受容体特異性などから今まで知られていない新規なグルクロン酸転移酵素であると思われた。そこで、本酵素に焦点を絞り、ラット脳からその精製を試みた。比較的活性の高い生後14日齢のラット脳膜画分の 0.5%NP-40 抽出物を出発材料とし、糖供与体である UDP-GlcA や、糖受容体として用いている ASOR を用いたアフィニティークロマトグラフィーなどで順次処理することにより本酵素をほぼ均一に精製することが出来た。本酵素は、還元条件下の SDS-PAGE で約 45 kDa の単一のバンドを示したが、スーパーローズ12ゲルろ過では約 90 kDa の位置に溶出し、45 kDa のポリペプチドの二量体として機能していることが考えられた。また、精製酵素標品について糖脂質性受容体、糖タンパク質性受容体に対するグルクロン酸転移活性を測定したところ、本酵素は糖タンパク質のみにグルクロン酸を転移し、糖脂質に対しては全く反応性を示さないことが明らかとなった。さらに、精製酵素標品のグルクロン酸転移活性発現には、膜リン脂質成分であるスフィンゴミエリンが活性因子として必要であることが明らかとなった。

第三章 糖タンパク質性 HNK-1 糖鎖抗原の生合成に関わるグルクロン酸転移酵素 cDNA の単離と発現系を用いた HNK-1 糖鎖抗原の機能解析

精製したグルクロン酸転移酵素は極微量であり、詳細な構造的、機能的解析や他の糖転移酵素との比較を行うには cDNA のクローニングが必要と思われた。そこで、精製酵素標品をトリプシン消化し、得られたペプチド断片のアミノ酸配列を決定し、これを基にラット脳 cDNA ライブラリーをスクリーニングすることにより本酵素 cDNA を単離した。cDNA 塩基配列より予想されるアミノ酸一次構造は、本酵素が347個のアミノ酸からなる II 型の膜貫通タンパク質であることを示した。得られた cDNA をプロテイン A との分泌性融合タンパク質として培養細胞に強制的に発現させたところ、培養上清に高いグルクロン酸転移活性が検出された。さらに、全長域を COS-1 細胞に形質導入したところ、細胞表面に HNK-1 糖鎖抗原が誘導された。この結果は、本酵素が HNK-1 糖鎖抗原の生合成に関わるグルクロン酸転移酵素であることを示している。また、HNK-1 糖鎖抗原の発現細胞は形態が顕著に変化しており、長い枝分れした突起を持ち、細胞周辺やこの突起からは、さらに細かな突起が観測された。このような形態の変化は、HNK-1 糖鎖抗原が細胞-基質間の相互作用に関与していることを示している。

以上、本研究は HNK-1 糖鎖抗原の生合成に関わる新規なグルクロン酸転移酵素、およびその cDNA を単離、解析したもので、HNK-1 糖鎖抗原の生合成機構、生理的意義を明らかにする上で重要な知見を得たものである。

論文審査の結果の要旨

HNK-1 糖鎖抗原は、パラグロボシド型糖脂質や N-グリコシド型糖鎖の非還元末端に位置するラクトサミン構造に硫酸化したグルクロン酸が結合したきわめて特徴的な構造を持つ糖鎖抗原である。発生初期の神経組織において、N-CAM, L1, MAG, PO といったイムノグロブリンスーパーファミリーに属する細胞接着因子に高発現することから、神経回路網形成における細胞間相互作用への関与が示唆されている。本論文は HNK-1 糖鎖抗原の生合成に関わる新規なグルクロン酸転移酵素の単離、cDNA のクローニング、およびその解析に成功したもので、HNK-1 糖鎖抗原の生合成機構、生理的意義を明らかにする上でのブレイクスルーをもたらしたものである。

申請者はまず、合成糖脂質 nLc-PA14 (ネオラクトテトラオース-ファニキルアルキル誘導体) および、糖タンパク質 ASOR (アジアロオロソムコイド) を糖受容体とするグルクロン酸転移活性測定法を確立し、ラット脳内にそれぞれの糖受容体に対するグルクロン酸転移活性が存在することを示した。

次いで、ラット脳から糖タンパク質に対するグルクロン酸転移酵素の精製を試み、生後14日齢のラット脳膜画分の 0.5%NP-40 抽出物を出発材料とし、糖供与体である UDP-GlcA や、糖受容体として用いている ASOR を用いたアフィニティークロマトグラフィーなどで順次処理することにより本酵素をほぼ均一に精製することに成功した。本酵素は、還元条件下の SDS-PAGE で約 45 kDa の単一のバンドを示した。さらに、精製酵素標品のグルクロン酸転移活性発現には、膜リン脂質成分であるスフィンゴミエリンが活性化因子として必要であるとの興味深い新知見を得た。

次いで、この精製酵素標品をトリプシン消化し、得られたペプチド断切のアミノ酸配列を決定し、これを基にラット脳 cDNA ライブラリーをスクリーニングすることにより、本酵素 cDNA をクローニングすることに成功した。cDNA 塩基配列より予想されるアミノ酸一次構造は、本酵素が347個のアミノ酸からなる II 型の膜貫通タンパク質であることを示した。ノーザンブロット解析により本酵素 mRNA の組織分布を調べたところ、本酵素は神経系組織に特異的に発現していることが明らかとなった。さらに、得られた cDNA を培養細胞に強制的に発現させたところ、培養上清に高いグルクロン酸転移活性が検出された。また、本酵素 cDNA を COS-1 細胞に形質導入したところ、細胞表面に HNK-1 糖鎖抗原が誘導された。これらの結果は、本酵素が HNK-1 糖鎖抗原の生合成に関わるグルクロン酸転移酵素であることを証明したものである。大変興味あることに、HNK-1 糖鎖抗原の発現細胞は形態が顕著に変化しており、長い枝分れした突起を持ち、細胞体周辺やこの突起からは、さらに細かな突起が観測された。このような形態の変化は、HNK-1 糖鎖抗原が細胞-基質間の相互作用に関与し、その結果、細胞内骨格タンパク質の再編成を誘起したことを示している。

以上、本研究は HNK-1 糖鎖抗原の生合成の鍵となる新規なグルクロン酸転移酵素を単離精製し、その酵素化学的性質を明らかにすると共に、酵素 cDNA のクローニングに成功し、その塩基配列より全アミ

ノ酸配列を解明したもので、HNK-1 糖鎖抗原の生合成機構、生理的意義を明らかにする上で重要な知見を得たものである。よって本論文は博士（薬学）の論文として価値あるものと認める。更に、平成9年2月24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。