

氏 名	たけまつひろむ 竹 松 弘
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学位記番号	薬 博 第 368 号
学位授与の日付	平成 8 年 3 月 23 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	シトクロム b_5 の役割を中心とした CMP- <i>N</i> -アセチルノイラミン酸水酸化機構に関する研究

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

シアル酸は複合糖質の非還元末端に普遍的に存在する酸性の 9 炭糖であり、ノイラミン酸誘導体の総称である。このシアル酸は多様な分子種をもつが、5 位のアミノ基がアセチル化された *N*-アセチルノイラミン酸 (NeuAc) と、このアセチル基が水酸化された *N*-グリコリルノイラミン酸 (NeuGc) を基本構造とする。

NeuAc と NeuGc は動物種により特徴的な分布を示し、ヒトでは一般に NeuAc のみを含む。しかしある種の癌細胞は NeuGc を含むことが知られており、一種の癌胎性抗原として知られている。また動物由来の NeuGc を含む複合糖質は免疫原性を示し H-D 抗原と呼ばれている。この NeuGc は細胞内サイトゾールに含まれる CMP-*N*-アセチルノイラミン酸 (CMP-NeuAc) 水酸化反応により CMP-NeuAc から CMP-NeuGc に変換されることにより生合成されるという仮説が提唱されているが (図 1 参照)、その機序の詳細については不明である。申請者はこの反応の詳細な機構をシトクロム b_5 の役割を中心に解析し、以下に述べるような新知見を得た。

第 1 章 CMP-*N*-アセチルノイラミン酸水酸化反応の制御因子の解析

申請者は NeuGc を強く発現しているマウス肝臓のサイトゾール画分を酵素源として、CMP-NeuAc 水酸化反応の制御因子の解析を行った。まず、サイトゾール画分を DEAE-Sephrose およびリン酸セルロール P11 カラムクロマトグラフィーによりシトクロム b_5 を含む画分 X, Y を含む画分、そして CMP-NeuAc 水酸化酵素を含む画分の三つの画分をそれぞれ分離した。水酸化酵素活性の発現にはこれら三画

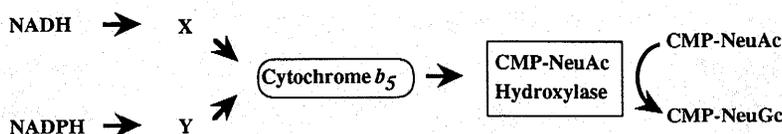


図 1 CMP-*N*-アセチルノイラミン酸水酸化反応に関する電子伝達系仮説

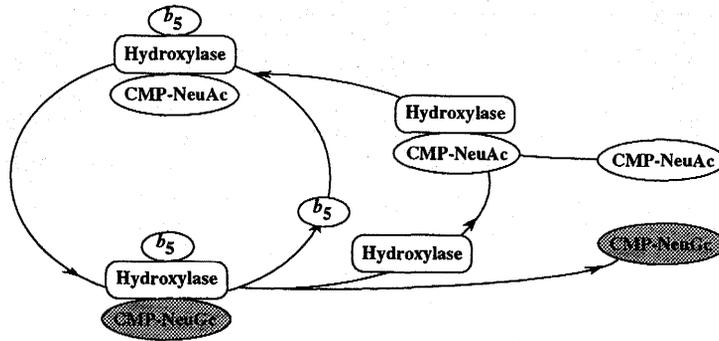


図2 CMP-NeuAc 水酸化反応の模式図
Hydroxylase は CMP-NeuAc 水酸化酵素を b_5 はシトクロム b_5 を示す。

分のすべての存在を必要とした。ただし、以降の実験ではシトクロム b_5 源として大量に入手可能なウマの赤血球より単離した可溶性シトクロム b_5 を使用した。X, Y 画分は CMP-NeuAc 水酸化酵素とシトクロム b_5 を反応系に供給することにより NADH または NADPH を電子供与体として濃度依存的に水酸化活性を調節することが示された。

次にシトクロム b_5 と水酸化酵素との反応を Lineweaver-Burk プロットにより解析したところシトクロム b_5 に対する K_m 値は $0.15\mu\text{M}$ と強い親和性を持つことが示された。そこでこのシトクロム b_5 を Sepharose-4B に固定化しアフィニティーカラムを作製し CMP-NeuAc 水酸化酵素との直接の相互作用を検討した。その結果、CMP-NeuAc 水酸化酵素は CMP-NeuAc の存在下でのみシトクロム b_5 カラムから遅れて溶出されることが見いだされた。この結果は図2に示すように、CMP-NeuAc 水酸化反応において水酸化酵素はまず CMP-NeuAc と結合し、ついでこれがシトクロム b_5 と結合した三重複合体を形成し、ここでシトクロム b_5 より電子が渡され、CMP-NeuGc が生成することを示している。すなわち、基質である CMP-NeuAc が酵素の高次構造を変化させ、これがシトクロム b_5 との結合に必要であることが明らかとなった。

第2章 膜結合型及び可溶性シトクロム b_5 の生成機構の解析

シトクロム b_5 には肝臓をはじめ多くの組織で発現の知られる膜結合型のものと、赤血球にはほぼ発現の限られる可溶性の二つの分子種が知られている。しかしながらこれらの生合成的関係については全く不明である。そこで、これまで遺伝子クローニングがなされていない可溶性シトクロム b_5 の cDNA およびゲノム遺伝子クローニングを行い、これらの関係を検討した。この結果、二種の b_5 は異なる mRNA より合成されること、可溶性 mRNA にのみ24塩基からなる終止コドンを含む挿入配列が存在すること、また、これらの二種のシトクロム b_5 は選択的スプライシングにより同一ゲノム遺伝子より生成することが明らかとなった。

第3章 CMP-N-アセチルノイラミン酸水酸化反応に関与するシトクロム b_5 分子種の同定

NeuGc を強く発現するマウス肝臓のサイトゾール画分にはこの水酸化反応に関与する三つのタンパク性の因子のうちシトクロム b_5 が欠乏しており、この反応の律速段階になっていることが予想される。そこで、マウス肝臓における可溶性シトクロム b_5 の発現の程度を、二種の型を区別して高感度で検出でき

る RT-PCR 法で調べた。その結果、膜結合型のみが発現がみられ、可溶型は発現していないことが判明した。この結果はマウス肝臓での NeuGc 合成には肝臓のミクロソーム画分に大量に発現する膜結合型シトクロム b_5 が利用されている可能性を示唆している。そこで、検討を重ねたところ適当な界面活性剤の存在下では膜結合型シトクロム b_5 が CMP-NeuAc 水酸化反応に利用されることが明らかになった。この結果は *in vitro* 再構成系では利用できない膜結合型シトクロム b_5 も細胞内では何らかの機構により水酸化酵素と結合できることを示している。

以上、本研究はシアル酸分子種の多様性の生合成機構を水酸化酵素とシトクロム b_5 の相互作用を中心に明らかにしたものであり、複合糖質生合成における重要な知見を得たものである。

論文審査の結果の要旨

シアル酸は複合糖質の非還元末端に位置する酸性の九単糖である。構造的多様性を示すが、5位のアミノ基がアセチル化された *N*-アセチルノイラミン酸 (NeuAc) とそのアセチル基が水酸化された *N*-グリコリルノイラミン酸 (NeuGc) を基本構造とする。ヒトでは一般に NeuAc のみを含むが、ある種の癌細胞で NeuGc が発現することも知られており、NeuGc は一種の癌胎児性抗原と考えられている。また、動物由来の NeuGc を含む複合糖質は免疫原性を示し、H-D 抗原とよばれている。この NeuGc は細胞内サイトゾルにおける CMP-*N*-アセチルノイラミン酸 (CMP-NeuAc) 水酸化反応により CMP-NeuAc から CMP-NeuGc に変換されるという仮説が提唱されているが、その機序の詳細については不明である。申請者はこの反応機構をシトクロム b_5 の役割を中心に解析し、以下に述べるような新知見を得た。

申請者はまず、NeuGc を強く発現しているマウス肝臓のサイトゾール画分を酵素源として、CMP-NeuAc 水酸化反応の制御因子の解析を行い、本酵素系は三つの画分に分かれることを示した。第一の画分は NADH または NADPH を電子供与体としてシトクロム b_5 を還元する活性を有し、第二の画分はシトクロム b_5 を含み、第三の画分は水酸化酵素を含んでいた。次にシトクロム b_5 と水酸化酵素との反応を速度論的に解析したところ、シトクロム b_5 に対する K_m 値は $0.15\mu\text{M}$ と強い親和性を持つことが示された。そこでシトクロム b_5 を Sepharose-4B に固定化したアフィニティーカラムを作製し CMP-NeuAc 水酸化酵素との直接の相互作用を検討した。その結果、CMP-NeuAc 水酸化酵素は CMP-NeuAc の存在下ではシトクロム b_5 カラムから遅れて溶出されることが見いだされた。このことは、CMP-NeuAc 水酸化反応において、水酸化酵素はまず CMP-NeuAc と結合し、ついでこれがシトクロム b_5 と結合した三重複合体を形成し、ここでシトクロム b_5 より電子が渡され、CMP-NeuGc が生成するという反応機構を示している。基質である CMP-NeuAc が酵素の高次構造を変化させ、シトクロム b_5 との結合を可能にしているものと思われる。

ところで、シトクロム b_5 には肝臓をはじめ多くの組織で発現の知られる膜結合型のものと、赤血球にほぼ発現の限られる可溶型の二つの分子種が知られている。しかしながらこれら相互の生合成的関係については全く不明である。そこで、申請者はシトクロム b_5 の cDNA およびゲノム遺伝子クローニングを行い、両者の関係を検討した。その結果、二種のシトクロム b_5 は異なる mRNA より合成されること、可溶型 mRNA にもみ24塩基からなる終止コドンを含む挿入配列が存在すること、また、これらの二種のシ

トクロム b_5 は選択的スプライシングにより同一ゲノム遺伝子より生成することが明らかとなった。

最後に、マウス肝臓における可溶型シトクロム b_5 の発現の程度を、可溶型および膜結合型の二種の型を区別して高感度で検出できる RT-PCR 法で調べた。その結果、膜結合型のみが発現がみられ、可溶型は発現していないことが判明した。しかし適当な界面活性剤の存在下では膜結合型シトクロム b_5 が CMP-NeuAc 水酸化反応に利用されることが示された。以上の結果は *in vitro* 再構成系では利用できない膜結合型シトクロム b_5 も細胞内では何らかの機構により水酸化酵素と結合し、肝における強い NeuGc の発現に関与していることを示している。

以上、本研究は、複合糖質の糖鎖末端に普遍的に見られるシアル酸の分子多様性の生成に重要な位置を占める *N*-グリコリルノイラミン酸の生成機構をシトクロム b_5 の役割を中心として明らかにしたものである。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 8 年 2 月 5 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。