

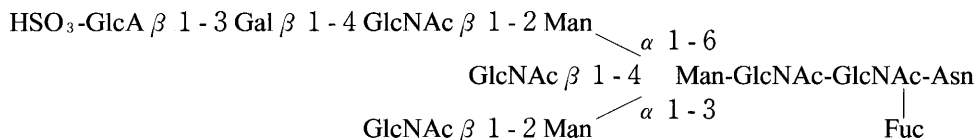
氏 名 生 木 尚 志
 学位(専攻分野) 博 士 (薬 学)
 学 位 記 番 号 薬 博 第 432 号
 学位授与の日付 平成 11 年 3 月 23 日
 学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当
 研究科・専攻 薬学研究科製薬化学専攻
 学位論文題目 HNK-1 糖鎖抗原の発現を調節するグルクロン酸転移酵素群の研究

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

論 文 内 容 の 要 旨

脊椎動物は進化の過程において高度な神経回路網を発達させてきた。その形成には様々な細胞接着分子やそのリガンドが関与している。また近年、細胞接着分子上に発現する糖鎖分子が細胞間相互作用に影響を与えることが明らかになってきた。そのような神経特異的に発現する糖鎖として、硫酸化されたグルクロン酸がN-アセチルラクトサミン構造の末端に結合するという特徴的な構造を持つHNK-1糖鎖抗原がある(図1)。この糖鎖は単クローン抗体HNK-1によって認識され、糖タンパク質や糖脂質分子上に時期特異的・部位特異的に発現する。マウス小脳の初代培養細胞に対しHNK-1抗体を添加すると細胞間の接着や神経突起伸長を阻害することより、HNK-1糖鎖抗原は神経回路網の形成において神経細胞の接着や移動に影響を及ぼすと考えられている。申請者はHNK-1糖鎖抗原の神経回路網形成における機能を調べるために、生合成に関わるグルクロン酸転移酵素に注目した。現在、糖タンパク質に含まれるHNK-1糖鎖抗原と糖脂質に含まれるHNK-1糖鎖抗原の生合成に対して各々別のグルクロン酸転移酵素が存在することが示唆されており、このうち糖タンパク質性糖鎖抗原の生合成に関与するグルクロン酸転移酵素(GlcAT-P)が単離、クローニングされている。

・糖タンパク質



・糖脂質



図1 HNK-1 糖鎖抗原の構造

第一章 グルクロン酸転移酵素活性とHNK-1糖鎖抗原発現の相関

糖タンパク質に対するグルクロン酸転移酵素に関して、ラット脳における酵素活性の変化とHNK-1糖鎖抗原の発現の相関を検討した。ラット脳の膜画分の界面活性剤抽出物を酵素源としてアシアロオロソムコイドを基質として酵素活性を測定した。生後14日齢において、大脳皮質、視床・視床下部、海馬などの組織では高い酵素活性を示したが、小脳ではその15%程度の活性しか示さなかった。次に大脳皮質と小脳について、成長過程における活性の変動を調べた。大脳皮質では生後14日齢に最大の活性を示したのち徐々に減少したのに対し、小脳では生後間もなく最大活性を示し、その後急激に減少した。また、各組織における糖タンパク質性HNK-1糖鎖抗原の発現量をウェスタンブロット解析したところ、酵素活性の変化と糖鎖発現の変化はよく一致していた。次に糖タンパク質性糖鎖抗原の発現が生合成のどの段階で制御されているのかを検討した。この解析ではHNK-1糖鎖抗原及び未硫酸化HNK-1糖鎖抗原構造を認識する単クローン抗体であるM6749抗体と、

HNK-1 糖鎖抗原のみを認識する HNK-1 抗体を使用した。ラットの成長各段階から調製した大脳皮質と小脳の膜画分をこれらの抗体を用いてウェスタンブロット解析したところ、2 種の抗体による染色パターンに差異はなかった。すなわち未硫酸化の中間体が検出されなかったことから、グルクロン酸転移酵素は HNK-1 糖鎖抗原の生合成過程において、発現の調節に関与する律速酵素であることが示唆された。

第二章 HNK-1 糖鎖抗原の生合成に関与する第二のグルクロン酸転移酵素のクローニング

HNK-1 糖鎖抗原の生合成に関与するグルクロン酸転移酵素は複数存在すると考えられたことより、先に単離された GlcAT-P の遺伝情報をもとに新たな酵素のクローニングを試みた。GlcAT-P の触媒ドメイン領域の cDNA をプローブとし、low stringency 条件下でのプライムハイブリダイゼーション法によって、胎生 18 日齢のラット脳 cDNA ライブラリー (50 万クローン) をスクリーニングした結果、陽性クローンを得た。この塩基配列から推定されるアミノ酸配列は、324 アミノ酸残基からなる II 型膜貫通タンパク質で、GlcAT-P とアミノ酸レベルで約 49% の相同性を示した。またノザンブロットで mRNA の局在を解析したところ、神経系においてのみ発現が確認され、この分布は HNK-1 糖鎖抗原が神経組織のみに発現している事実と一致した。更に、この cDNA を COS-1 細胞に一過性に発現させると、細胞表面上に HNK-1 糖鎖抗原の誘導が確認された。次に、膜貫通領域までの N 末端部分をプロテイン A タンパクに置換した分泌型融合タンパク質を作製し、in vitro で酵素活性を測定した。その結果、糖タンパク質基質に対して高い転移活性を示したのに対し、糖脂質基質に対してはほとんど活性を示さなかった。これらの結果より、単離されたクローンは HNK-1 糖鎖抗原の生合成に関与する GlcAT-P に次ぐ第二の酵素と考えられ GlcAT-S と命名した。

第三章 グルクロン酸転移酵素群の性質の比較

GlcAT-P と GlcAT-S の両酵素の性質を解析した。まず糖タンパク質基質に対する活性測定系に様々な糖供与体や基質糖鎖を添加し、その阻害効率を測定することで両酵素の特異性を解析した。この結果、糖供与体の影響は両酵素ともほぼ同様で、UDP-GlcA や UDP によって強い阻害がみられたが、GlcA は全く影響を与えなかった。このことから両酵素は UDP 構造を認識していると考えられた。一方、基質糖鎖では β 1-3 結合を持つラクト-N-ビオースはほとんど影響を与えなかったのに対し、 β 1-4 結合からなる N-アセチルラクトサミンによって強い阻害がみられた。また阻害効率は GlcAT-P が GlcAT-S よりも高かったことから両酵素の基質糖鎖認識に差があることが示唆された。そこで糖タンパク質であるアシアロオロソムコイドを基質として K_m 値を測定したところ、GlcAT-P は GlcAT-S よりも親和力が約 4 倍高いことが示された。次に二糖やオリゴ糖基質への転移活性を測定した。この結果、両酵素ともにラクト-N-ビオースやルイス X には全く転移活性を示さなかった。一方、N-アセチルラクトサミン構造を末端に持つ糖鎖に対しては、GlcAT-P は GlcAT-S よりも高い転移活性を示した。以上の結果から、基質糖鎖の認識が異なる 2 つの糖タンパク質性 HNK-1 糖鎖抗原の生合成に関与するグルクロン酸転移酵素が存在することが明らかになった。

論文審査の結果の要旨

高度のネットワークが張り巡らされる神経回路網の形成過程においては、細胞間あるいは細胞と細胞外マトリックスの間の相互作用が重要な役割を持つ。近年、これらの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、N-CAM など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-アセチルラクトサ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、特徴的なグルクロン酸転移酵素により、一般的に糖タンパク質糖鎖の周辺部に含まれる構造である N-アセチルラクトサミン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と考えられている。

申請者は、この HNK-1 糖鎖抗原の生合成機構の解明を目的として研究をすすめ、以下に示すような新たな知見を得た。

申請者はまず、HNK-1 糖鎖抗原の発現の律速段階となっている反応が、グルクロン酸転移酵素であるのか硫酸基転移酵素であるのかを知るため、HNK-1 糖鎖抗原と未硫酸化 HNK-1 糖鎖抗原との発現の関係、および、これらとグルクロン酸

転移酵素活性発現との相関性を生後2日齢から成体にわたり調べた。その結果、ラット脳におけるHNK-1糖鎖抗原の発現は脳皮質、海馬、視床、小脳で強く観察されたが、この発現パターンは未硫酸化HNK-1糖鎖抗原と全く同一であり、しかも、グルクロン酸転移酵素活性のパターンとよく一致していた。この結果は、HNK-1糖鎖抗原の発現の律速段階となっている反応は硫酸化ではなくグルクロン酸転移反応であることを示している。グルクロン酸転移酵素としてはすでにGlcAT-Pと呼ばれる酵素が申請者の属する研究グループによりクローニングされている。そこで申請者は、次にHNK-1糖鎖抗原の生合成に関与する第二のグルクロン酸転移酵素の存在を想定してその検索をすすめた。その結果成功し、これをGlcAT-Sと命名した。324個のアミノ酸より成り、GlcAT-Pとはアミノ酸レベルで48.5%の相同性を示すグルクロン酸転移酵素のクローニングに成功した。本酵素は、N-末端側の8アミノ酸を細胞質側に、C-末端側をゴルジ内腔側に配向したⅡ型の膜貫通タンパク質である。GlcAT-Sも神経組織に特異的に検出され、生後8日齢頃までは高発現しているが、成体での発現は低レベルに減少していた。本酵素をCOS-1細胞にトランスフェクトすると、細胞表面には、HNK-1糖鎖抗原が発現するとともに、神経細胞様の突起を生じるなどの顕著な形態変化を示した。これらの結果はGlcAT-SがHNK-1糖鎖抗原合成に関与する第二のグルクロン酸転移酵素であることを示している。

申請者はさらに、GlcAT-Sの生化学的な諸性質の解析をすすめ、GlcAT-SがGlcAT-Pとは異なる受容体特異性を持つことを明らかにした。

以上の研究は、神経系の回路形成に関与する糖鎖抗原の生合成の機作を解明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11年2月22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。