

氏 名	川 崎 伸 子 かわ さき のぶ こ
学 位 の 種 類	薬 学 博 士
学 位 記 番 号	薬 博 第 81 号
学位授与の日付	昭 和 46 年 7 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 5 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	ラット肝細胞ミクロゾーム膜の糖タンパクに関する化学的研究
論文調査委員	(主 査) 教 授 山 科 郁 男 教 授 冨 田 謙 吉 教 授 高 木 博 司

論 文 内 容 の 要 旨

細胞の膜系成分にはタンパクとリピドのほかにヘキソサミン、シアル酸などの糖も存在していることが知られている。これらの糖は少量ながら膜系の構造と生理的機能に重要な役割を果していることが示唆されているが、その化学的性質についての研究はまだほとんどなされていない。

著者は肝細胞を用い、その主要な膜系を成すミクロゾームについて、糖タンパクを構成する糖の化学的研究を行った。

肝細胞ミクロゾーム膜に見いだされる糖の一つは血漿タンパクの生合成または分泌過程の中間体として、今一つはミクロゾーム膜に固有のものとして存在することが考えられるが、著者はこのうち、膜成分に固有とみられる糖の存在状態および組成の特徴を明らかにするため、糖の挙動に注目しつつ、ミクロゾームの細分画を行った。すなわち、ラット肝ミクロゾームから DOC による 2 段階の可溶性、SDS-フェノール処理による脱リピド、Bio-gel P-300 によるゲルろ過を経て、12%飽和の硫酸分画により、リピド、RNA を含まず、血漿タンパクも事実上混入していない、膜の基本構造を成すと考えられる画分を得て、これを仮に「構造タンパク」と名付けた。「構造タンパク」は脱リピドにより凝集しやすくなり、巨大分子として挙動するが、還元アルキル化により急激に低分子化した。「構造タンパク」のアミノ酸組成は赤血球、ミトコンドリアなどの他の膜タンパクのそれときわめて類似していた。「構造タンパク」は約1.5%の糖を含む糖タンパクであり、その糖組成はマンノース、ガラクトース、グルコース、ヘキソサミン、シアル酸より成り、マンノース、ガラクトースの比は2.1:1、グルコサミン、ガラクトサミンの比は12.1:1であった。これらの値は全ミクロゾーム、血漿タンパクのそれと異なり、膜タンパクに固有のものと考えられる。

次に、この糖タンパクにおける糖部分の化学的性質を明らかにするために、プロナーゼ消化により糖ペプチドを調製し、分画した。消化物を Sephadex G-50 のゲルろ過および DEAE-Sephadex A-50 のカラムクロマトグラフィーにかけることにより、大別して2種の型の糖ペプチドを単離することができた。

一つはシアル酸を含み、糖部分の比較的大きい糖ペプチドで、グルコサミン、中性糖、シアル酸をモル比で 1:1.5:0.8 の割合で含んでいた。中性糖としてはマンノースとガラクトースが 1:1.35 の割合で存在し、他に微量のフコースとグルコースが存在していた。今一つはシアル酸を含まず、グルコサミンとマンノースのみをモル比で約 1:3 の割合で含む、糖部分の比較的小さい中性の糖ペプチドであった。中性の糖ペプチドは電気泳動的にほぼ均一であるのに対し、酸性のものはきわめて不均一で、細胞性多糖の不均一性を反映しているものと考えられる。いずれの糖ペプチドもアミノ酸としてはアスパラギン酸が最も多く、糖ペプチドの糖部分とペプチド部分はアスパラギン酸を介して結合していることが推定される。

ミクロゾームは Endoplasmic Reticulum (ER) のほかに、原形質膜を含むことから、これらの糖ペプチドの細胞内起源を明らかにすることを試みた。 ^{14}C -グルコサミンで標識した原形質膜をラット肝細胞より単離し、これに大量の、無標識構造タンパクを加えてプロナーゼ消化し、糖ペプチドを単離したのち、前述と同様に分画した。その結果、放射活性は事実上酸性の糖ペプチドにのみ局在していた。中性の糖ペプチドに見いだされたわずかの放射活性は、原形質膜標品への ER の混入量で説明できた。

以上の結果から、細胞表面の膜である原形質膜は糖鎖としてシアル酸を含む酸性のもののみを含むこと、中性の糖ペプチドは ER、あるいはその近縁の膜にのみ局在していることを明らかにすることができた。

さらに、原形質膜を含まず、ほとんど ER からのみ成るミクロゾームとして粗面ミクロゾームを調製し、その糖組成を分析した結果、有意量のシアル酸が存在することが明らかとなった。したがって、細胞内膜系の ER にも原形質膜の糖鎖とよく似た酸性の糖鎖が存在することが示唆された。

以上、細胞の膜系に存在する糖の性格を明らかにしたことは、膜の生物学的機能を考察する上できわめて意義をもつものと考えられる。

論文審査の結果の要旨

細胞膜に存在する糖タンパクは膜の構造と機能にとって重要な成分であるといはれているがその化学的性質についての知見はきわめて乏しい。

本論文はラット肝細胞の小胞体膜および原形質膜を構成する構造タンパクを調製し、これが糖タンパクであることを明らかにしたのち、それぞれの膜構造タンパクに由来する糖ペプチドを調製し、その糖部分の性質を明らかにしたものである。

まず、肝細胞ミクロゾームから構造タンパクを調製する方法を詳しく検討し、化学的免疫学的に高純度のものを得てこれが糖タンパクであることを明らかにしている。これは膜に存在する糖タンパクが膜の基本的な構成成分であることをはじめて実証したものである。

構造タンパクの糖部分の性質を知るためタンパク分解酵素で処理して糖ペプチドを調製し、分画して2種の糖ペプチド画分を得た。それらの化学的組成を決定した結果、一つはシアル酸のほか種々の糖を含む酸性で高分子量の糖鎖をもち、他はマンノースと N-アセチルグルコサミンのみから成る中性で低分子量の糖鎖をもつことが明らかにされた。一方、予め ^{14}C -グルコサミンで標識した原形質膜からも構造タンパクを調製し、ミクロゾーム由来の膜構造タンパクと混じて酵素分解し、糖ペプチドを分画し、その標識の所在の追跡から原形質膜の糖がすべて酸性の糖鎖から成ることを決定している。これらの結果は動物細

胞の膜に存在する糖タンパクの糖部分の性質を明らかにした最初のものである。

これらの知見は糖の関与する細胞膜の機能を糖部分の構造と結びつけて考察することを可能にするものであり、また、小胞体膜と原形質膜とが異なる糖鎖をもつことから糖が細胞の種々の膜構造を特徴づけていることが示唆され、細胞化学上きわめて意義ある発見となっている。同時に、薬学領域における細胞膜に関する研究にとっても重要な知見が得られたものと考えられる。

よって、本論文は薬学博士の学位論文として価値あるものと認める。