

氏 名	やまもと しょうじ 山 本 昌 司
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学 位 記 番 号	薬 博 第 488 号
学位授与の日付	平成 14 年 3 月 25 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 生 命 薬 科 学 専 攻
学位論文題目	ジーンターゲットイングによる HNK-1 糖鎖の生物学的機能解析と発現調節に関する研究

論文調査委員	(主 査) 教 授 川 寄 敏 祐	教 授 伊 藤 信 行	教 授 市 川 厚
--------	----------------------	-------------	-----------

論 文 内 容 の 要 旨

主に神経細胞上の種々の接着分子上に見出される HNK-1 糖鎖抗原は、特に中枢神経系において時期ないし部位特異的に厳密に制御された発現様式を示すことなどから神経系の発生や可塑性等に重要な機能を持つものと考えられている。構造的には N-アセチルラクトサミン構造の非還元末端に硫酸化グルクロン酸を有するという非常に特異な構造をとっていることが知られている。HNK-1 糖鎖抗原の生合成の律速段階を担う糖転移酵素として、これまでに申請者の所属する研究室において、ラット脳より 2 種類のグルクロン酸転移酵素 GlcAT-P および GlcAT-S が単離されていた。そこで本研究では、HNK-1 糖鎖抗原の生理的機能を詳細に解析することを目的に、マウス GlcAT-P の cDNA およびゲノム遺伝子の単離、GlcAT-P 遺伝子の転写調節領域の解析、および GlcAT-P 遺伝子欠損マウスを作成しその解析を行った。

第一章 マウスグルクロン酸転移酵素 GlcAT-P cDNA およびゲノム遺伝子の単離とその構造解析

先に得られていたラット GlcAT-P cDNA をプローブとして、マウス cDNA ライブラリーのスクリーニングによりマウス GlcAT-P の翻訳領域全長を含む cDNA のクローニングを行った。マウス GlcAT-P は塩基配列および予想されるアミノ酸配列においてラット及びヒト GlcAT-P と非常に高い相同性を持つことが明らかとなった。次に、得られたマウス cDNA をプローブとしてマウスゲノム DNA ライブラリーをスクリーニングし、得られたクローンの塩基配列から本酵素の遺伝子構造解析を行った。その結果、本酵素遺伝子の翻訳領域は約 6kb の範囲に 5 つのエクソンに分かれて存在することが明らかとなった。また、N 末側の長さが異なる 2 種類の本遺伝子転写物が存在する事を見出し、それらが選択的スプライシングにより生じることを明らかにした。さらにマウス染色体上における GlcAT-P 遺伝子の位置を 9 番染色体 A4 領域 (9A4) と決定した。

第二章 GlcAT-P 遺伝子の転写調節領域の解析

HNK-1 糖鎖抗原の発現は時期、部位特異的に厳密な制御をうけているが、その発現調節に、生合成酵素である GlcAT-P 遺伝子の転写調節が関わっていることを予想し、GlcAT-P の転写調節領域に関する研究を行った。まずプライマーエクステンション法により GlcAT-P 遺伝子の転写開始点を決定した。転写開始点より上流約 1.6kb の塩基配列を検討したところ、本酵素の遺伝子上流域には基本転写に参与する TATA-box 等のコンセンサス配列は見いだせなかったものの非常に GC rich な構造的特徴をもち、種々の転写因子の結合配列が存在することが明らかとなった。さらにこの領域について様々な長さの断片をルシフェラーゼ遺伝子の 5' 上流に組み込んだコンストラクトを作成し、HNK-1 糖鎖を発現する PC-12 細胞と HNK-1 糖鎖を発現しない COS-1 細胞に導入した後、ルシフェラーゼアッセイによる転写活性化能の解析を行った。その結果、転写開始点から上流 -207bp の領域が PC-12 細胞においてのみ有意に高い転写活性化能を示すことを見出した。この結果は HNK-1 糖鎖合成の律速酵素 GlcAT-P の転写調節機構が HNK-1 糖鎖抗原の発現調節に対して重要であることを示唆するものであった。

第三章 GlcAT-P 遺伝子欠損マウスの作成とその解析

HNK-1 糖鎖抗原の生体内での機能を明らかにする目的で、GlcAT-P のジーンターゲティングによる GlcAT-P 遺伝子欠損マウスの作成を行った。マウス GlcAT-P ゲノム DNA の詳細な制限酵素地図を作成し、酵素の活性領域の大半を占めるエクソン 4 と 5 をネオマイシン耐性遺伝子で置き換える方針でターゲティングベクターを構築した。このベクターをマウス ES 細胞へトランスフェクションした後、組換え体のスクリーニングを行って最終的に 2 クローンの相同組換え体を得た。この両クローンから GlcAT-P 遺伝子欠損マウスを得た。

GlcAT-P 遺伝子欠損マウスは正常に生まれ、見かけ遅延無く成長した。また脳の外観に野生型と比較して大きな差異はなく、脳切片の Nissl 染色による細胞染色でも明確な神経組織の異常は見いだせなかった。脳切片の HNK-1 抗体を用いた免疫組織染色により、GlcAT-P 欠損マウスの中枢神経系における HNK-1 糖鎖抗原は、ほとんどの領域で予想通り消失していることを確認した。一部の特徴的な領域ではごく少量の HNK-1 糖鎖の残存が確認され、第 2 のグルクロン酸転移酵素である GlcAT-S がその生合成に関与することが考えられた。また、GlcAT-P 欠損マウスの脳膜画分を酵素源としたグルクロン酸転移活性の測定を行ったところ、糖タンパク質性基質だけでなく糖脂質性基質に対する活性も著しく低下していた。このことから GlcAT-P は *in vivo* において両基質に対する活性を有することが明らかとなり、脳における HNK-1 糖鎖発現のほとんどを GlcAT-P が担うことが示された。また記憶形成のモデルとして神経可塑性の指標である海馬 CA1 領域における長期増強 LTP の検討を行ったところ、GlcAT-P 欠損マウスでは有意な LTP の減弱が認められた。さらに水迷路課題による行動学的な解析より、GlcAT-P 欠損マウスは学習障害を示すことが明らかとなった。これらの表現型より、記憶形成に重要な機能を持つ海馬領域で GlcAT-P が欠損した事により HNK-1 糖鎖が欠失し、神経系のシナプス可塑性に異常が生じて個体としての学習機能に障害を起こしたものと考えられた。このことから HNK-1 糖鎖は神経系の可塑性や認知学習に重要な機能を担っていることが示唆された。

以上、本研究は HNK-1 糖鎖の発現調節機構に関し重要な知見を与えるとともに、個体レベルでの解析は HNK-1 糖鎖の生理的機能に関する重要な知見を与えるものである。

論文審査の結果の要旨

HNK-1 糖鎖抗原は神経系に特異的な糖鎖抗原であり、NCAM, L1, MAG (Myelin-Associated Glycoprotein), P0 などの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に発現するほか、SGGL (Sulfo Glucuronyl Glyco Lipid) -1, SGGL-2 といった糖脂質上にも発現している。シナプス形成が盛んな時期に対応して HNK-1 糖鎖抗原の発現が上昇することなどから、脳内での神経回路網の形成およびその可塑性に関与する可能性が示唆されている。これまでに本糖鎖抗原の生合成に関与するグルクロン酸転移酵素として、GlcAT-P および GlcAT-S がクローニングされている。このうち、GlcAT-P は、個体発生期から生後まで発現量を変動させながらも、GlcAT-S と比較し一貫して高い発現量を示し、また、脳内でより広汎な分布を示すことが分かっていた。そこで本研究では HNK-1 糖鎖抗原の生理的機能と発現調節機構をより詳細に解析することを目的として、マウスグルクロン酸転移酵素 GlcAT-P の遺伝子構造と転写調節機構の解析、およびその遺伝子欠損マウスの作成と解析を行った。

申請者はまず、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うちマウス GlcAT-P の cDNA を新規に単離しその構造を決定した。ついで、GlcAT-P 遺伝子のマウスゲノム上での位置を 9 番染色体 A4 領域と決定した。また、マウス GlcAT-P 遺伝子の転写調節領域の塩基配列を決定し、転写開始点から上流 207bp までの領域が HNK-1 糖鎖抗原を発現する細胞特異的に有意に高い転写活性化能を示すことを見出した。ついで、定法に従い、ジーンターゲティングにより GlcAT-P 遺伝子欠損マウスの作成に着手し、これに成功した。GlcAT-P 遺伝子欠損マウスは、その出生個体数に減少傾向があるものの生まれたマウスはほぼ正常な発育を示した。GlcAT-P 欠損マウスは HNK-1 糖鎖抗原をほぼ完全に消失していたが、一部には特徴的な領域で微弱な HNK-1 糖鎖抗原が残存していた。この結果は、生体内における HNK-1 糖鎖抗原の生合成には GlcAT-P が主要な役割を果たしていることを明確に示している。また、弱い残存活性は GlcAT-S の活性によるものと推定された。さらに、CA1 領域における長期増強 LTP の解析を行ったところ GlcAT-P 欠損マウスはシナプス可塑性に異常を示すことが明らかとなった。この結果は行動解析における認知学習能力が低下していることから裏付けられた。すなわち、生体内における微量成分としての HNK-1 糖鎖抗原が実は個体レベルでの生理的機能の維持に重要

な役割を持つことを明らかにすることができた。

以上の研究は、神経系に特異的な糖鎖抗原が生理的に重要な働きを持つことを個体のレベルで明らかにしたものであり極めて重要な新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14年2月28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。