

報告番号

※ 第 3471 号

主論文の要旨

題名

ニワトリ胚角膜上皮の合成する硫酸化複合糖質の研究

氏名 米倉秀人

主論文の要旨

報告番号

※ 第

号

氏名

米倉秀人

発生における形態形成に、様々な複合糖質が関与していることが示されている。角膜の発生においても様々な複合糖質の関与が示唆されており、中でも、上皮が合成する硫酸化複合糖質の役割が注目される。形態形成後期において、角膜上皮は、重層化という大きな形態の変化と共にその角膜上皮の合成する硫酸化複合糖質も "an unidetified sulfated GAG" の出現と硫酸化グリコサミノグリカンの組成の逆転という大きな変化が報告されており (Meier, S. and Hay, E. D. Dev. Biol. 35, 318, 1973)、その役割が特に注目される。今回、本研究において初めて、これらの硫酸化複合糖質を組織に存在しているままの分子として抽出、分離し、その性質を明らかにした。

19日ニワトリ胚角膜上皮を、 $[^{35}\text{S}]$ 硫酸または $[^3\text{H}]$ グルコサミンで標識し、トリトン X-100 および蛋白分解酵素阻害剤を含む 4M グアニジン塩酸溶液で硫酸化複合糖質を抽出し、7M 尿素溶液に対して透析して平衡化した。この時、組織に取り込まれた ^{35}S -、 ^3H -標識高分子および組織蛋白の 95%以上が尿素可溶画分に回収され、角膜上皮の合成する硫酸化複合糖質を組織に存在しているままの分子として可溶化することに成功した。硫酸化複合糖質は、7M 尿素存在下での DEAE-Sepharose CL-6Bカラムにより、硫酸化糖蛋白(SGP)とプロテオグリカン(PG)とに分離された。

SGPは、角膜上皮が重層化する 11日から 19日の間で、合成が顕著に増大すること、そして、それは分子種の変化や硫酸化オリゴ糖鎖の構造変化をも伴っていることが明らかとなった。本研究での諸結果は、角膜上皮の重層化に伴うデスモソームおよびトノフィラメント形成の増加と並行して

合成活性が増大する "an unidentified sulfated GAG" の本体が SGPであることを強く示唆した。この SGPは、N-グリコシド型と O-グリコシド型の二種の硫酸化オリゴ糖鎖を含んでおり、これまで報告されていなかった特異な硫酸化糖蛋白であることが明らかとなった。SGPは、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)で、分子量の異なる以下の三群の SGP群に分離された。それは、1) 分子量 48,000-70,000を有し、角膜上皮のサイトケラチンと同一位置に泳動される SGP(48K-70K SGP)、2) 分子量 75,000-150,000に、幅広いバンドとして存在する SGP(75K-150K SGP)、3) 分子量 160,000-180,000付近に存在する SGP(160K-180K SGP)であった。本研究において、48K-70K SGPは細胞内に存在していることが示され、SDS-PAGEでサイトケラチンのバンドと一致すること、その生化学的性質および細胞内局在が一致することから、48K-70K SGPはトノフィラメントの構成蛋白であるサイトケラチンの一部が硫酸化オリゴ糖鎖で修飾されたものであることが示唆された。また、75K-150K SGPは細胞外あるいは細胞表面に存在していることが示され、分子量とその性質が既報のデスモソーム構成糖蛋白と類似していることから、デスモソーム構成糖蛋白のオリゴ糖鎖が硫酸基により修飾されている可能性が示唆された。この結果、SGPの合成の増大とデスモソーム/トノフィラメント形成の増加との関係がより明確となった。160K-180K SGPは、細胞外に存在していることが示され、分子量が一致することから、基底膜を構成する分子のひとつであるエンタクチン様の分子であると考えられた。また、ニワトリ19日胚皮膚上皮も、上記の三群の SGPを合成していることが明らかとなり、上皮一般にこれらの SGPが存在している可能性が考えられた。

ニワトリ19日胚角膜上皮が合成している、もう一種の硫酸化複合糖質である PGは、大部分が HS-PGであった。HS-PGは、いずれも鎖長約7,000-10,000の HSを持つ、分子量約150,000、125,000-56,000および 25,000-10,000の三種類の組織結合同型 HS-PGと鎖長約4,700- 7,000の HSを持ち培養液中に遊離される分子量約21,000-7,000の HS-PGの、分子量の異なる計四種類が単離された。これに対し、形態形成初期の 9日胚角膜上皮が合成する PGは、それぞれ独立の分子として存在する CS-PGと HS-PGであり、CS-PGが主成分であった。CS-PGは、HSと比較して顕著に大きな分子量の CSを持ち、PGとしては HS-PGとほぼ同一の分子量を有していた。CS-PGと HS-PGは9日から11日の間でその存在比が逆転することが明らかとなった。

本研究より、角膜上皮のみならず、上皮一般で上皮の成熟、完成とその維持に重要な役割を果たしている硫酸化複合糖質の化学的本体が初めて明らかとなった。