

糖鎖生物学の新展開

(研究課題番号 03304050)

文部省科学研究費補助金(総合研究A)
研究成果報告書

平成6年3月

研究代表者 村松 喬
(名古屋大学医学部教授)

KAKEN
03304050

図・本誌

集

はしがき

文部省総合研究（A）「糖鎖生物学の新展開」の3年間に渡る研究成果の報告書をお届けいたします。活発に研究を進めて頂きました分担者とその協力者の方々、また、終始ご援助を賜りました文部省学術国際局研究助成課に厚く御礼申し上げます。

村松 喬

| | |
|---------|-------|
| 名古屋大学図書 | |
| 和B | 83895 |

研究組織

- 研究代表者 村松 喬（名古屋大学・医学部・教授）
- 研究分担者 斎藤政樹（自治医科大学・医学部・教授）
- 高崎誠一（東京大学・医科学研究所・助教授）
- 平林義雄（理化学研究所・研究員）
- 堀田恭子（北里大学・医学部・教授）
- 山科郁男（京都産業大学・工学部・教授）
- 成松 久（創価大学・生命科学研究所・教授）
- 鈴木明身（東京都臨床医学総合研究所・部長）
- 永井克孝（東京都臨床医学総合研究所・所長）
- 牧田章（北海道大学・医学部・教授）
- 遠藤正彦（弘前大学・医学部・教授）
- 長谷純宏（大阪大学・理学部・教授）
- 鈴木 旺（愛知医科大学・分子医科学研究所・教授）
- 川寄敏祐（京都大学・薬学部・教授）
- 松本勲武（お茶の水女子大学・理学部・教授）
- 山下克子（佐々木研究所・部長）
- 小川智也（東京大学・農学部・教授）
- 稲垣冬彦（東京都臨床医学総合研究所・部長）
- 入村達郎（東京大学・薬学部・教授）

研究経費

| | | |
|----|-----|---------|
| 平成 | 3年度 | 8700千円 |
| 平成 | 4年度 | 7600千円 |
| 平成 | 5年度 | 3000千円 |
| | 計 | 19300千円 |

研究発表

研究代表者の成果については以下に記す。分担者の成果については誌上発表を中心に各分担者の報告で述べる。

ア) 学会誌等

1. Kamada, Y., Muramatsu, H., Arita, Y., Yamada, T. and Muramatsu, T., Structural studies on a binding site for Dolichos biflorus agglutinin in the small intestine of the mouse, *J. Biochem.*, 109, 178-183 (1991).
2. Suganuma, T., Muramatsu, H., Muramatsu, T., Ihida, K., Kawano, J. and Murata, F., Subcellular localization of N-acetylglucosaminide $\beta 1 \rightarrow 4$ galactosyltransferase revealed by immunoelectron microscopy, *J. Histochem. Cytochem.*, 39, 299-309 (1991).
3. Yoshinaga, K., Muramatsu, H. and Muramatsu, T., Immunohistochemical localization of the carbohydrate antigen 4C9 in the mouse embryo: a reliable marker of mouse primordial germ cells, *Differentiation*, 48, 75-82 (1991).
4. Matsusako, T., Muramatsu, H., Shirahama, T., Muramatsu, T. and Ohi, Y., Expression of a carbohydrate signal, sialyl dimeric Le^X antigen is associated with metastatic potential of transitional cell carcinoma of the human urinary bladder, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 181, 1218-1222 (1991).
5. Matsumoto, H., Muramatsu, H., Muramatsu, T. and Shimazu, H., Carbohydrate profiles revealed by a lectin and a monoclonal antibody correlate with metastatic potential and prognosis of human lung carcinomas, *Cancer*, 69, 2084-2090 (1992).

6. Hokita, S., Takao, S., Muramatsu, T. and Shimazu, H., Monoclonal antibodies against a human gastric cancer cell line with lung metastatic potential in nude mice define antigens whose expression is different between the primary and metastatic liver lesions, *J. Cancer Res. Clin.Oncol.*, 118, 228-234 (1992).
7. Shirahama, T., Ikoma, M., Muramatsu, H., Muramatsu, T. and Ohi, Y., Reactivity to fucose-binding proteins of Lotus tetragonolobus correlates with metastatic phenotype of transitional cell carcinoma of the bladder, *J. Urol.*, 147, 1659-1664 (1992).
8. Shirahama, T., Ikoma, M., Muramatsu, T. and Ohi, Y., Expression of SSEA-1 carbohydrate antigen correlates with stage, grade and metastatic potential of transitional cell carcinoma of the bladder, *J. Urol.*, 148, 1319-1322 (1992).
9. Matsusako, T., Muramatsu, H., Shirahama, T., Muramatsu, T. and Ohi, Y., A metastasis-associated antigen is present on a 60 KDa glycoprotein in transitional cell carcinoma of the human urinary bladder, *Histochem. J.*, 24, 805-810 (1992).
10. Masuzawa, Y., Miyauchi, T., Hamanoue, M., Ando, S., Yoshida, J., Takao, S., Shimazu, H., Adachi, T. and Muramatsu, T., A novel core protein as well as polymorphic epithelial mucin carry peanut agglutinin binding sites in human gastric carcinoma cells: sequence analysis and examination of gene expression, *J. Biochem.*, 112, 609-615 (1992).
11. Uehara, F., Ohba, N., Nakashima, Y., Yanagita, T., Ozawa, M. and Muramatsu, T., Developmental change of distribution of β -galactoside α -2,6-sialyltransferase mRNA in rat retina, *Exp. Eye Res.*, 56, 89-93 (1993).
12. Huang, R.-P., Ozawa, M., Kadomatsu, K. and Muramatsu, T., Embigin, a member of the immunoglobulin superfamily expressed in embryonic cells, enhances cell-substratum adhesion, *Dev. Biol.*, 155, 307-314 (1993).
13. Matsumoto, H., Muramatsu, H., Shimotakahara, T., Nishijima, H., Mitani, N., Baba, K., Muramatsu, T. and Shimazu, H., Correlation of expression of ABH blood group carbohydrate antigens with metastatic potential in human lung carcinoma, *Cancer*, 72, 75-81 (1993).

14. Uehara, F., Ohba, N., Nakashima, Y., Yanagita, T., Ozawa, M. and Muramatsu, T., A fixative suitable for in situ hybridization histochemistry, *J. Histochem. Cytochem.*, 41, 947-953 (1993).
15. Shirahama, T., Ikoma, M., Muramatsu, T., Kayajima, T., Ohi, Y., Tsushima, T., Akebi, N., Ohmori, H., Hirao, Y. and Okajima, E., The binding site for fucose-binding proteins of *Lotus tetragonolobus* is a prognostic marker for transitional cell carcinoma of the human urinary bladder, *Cancer*, 72, 1329-1334 (1993).
16. Ikematsu, S., Kaname, T., Ozawa, M., Yonezawa, S., Sato, E., Uehara, F., Obama, H., Yamamura, K. and Muramatsu, T., Transgenic mouse lines with ectopic expression of α -1,3-galactosyltransferase: production and characteristics, *Glycobiology*, 3, 575-580 (1993).
17. Muramatsu, T., Carbohydrate signals in metastasis and prognosis of human carcinomas, *Glycobiology*, 3, 291-296 (1993)

イ) 口頭発表

1. 池松真也、要匡、小沢政之、山村研一、村松喬. α 1-3ガラクトース転移酵素のcDNAの多型、活性発現そして受精卵への導入. 第65回日本生化学会大会 (平成4年10月9日)
2. 村松喬、池松真也、要匡、須藤明治、小沢政之. 糖鎖変換トランジェニックマウスの作成と異常、第66回 第66回日本生化学会大会 (平成5年10月3日)
3. 小沢政之、村松喬. マウス α 1,3フコース転移酵素のクローニング 第66回日本生化学会大会 (平成5年10月4日)
4. 須藤明治、小沢政之、村松喬. α 1 \rightarrow 3フコシルトランスフェラーゼのcDNAの導入による細胞基質接着の増大 第66回日本分子生物学会大会 (平成5年12月16日)

ウ) 書籍など

1. Muramatsu, T., Early embryogenesis, Cell Surface Carbohydrates and Cell Development, Fukuda, M. Ed., CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, London, pp239-256 (1991).

研究成果

次頁以下に、各研究者ごとに記す。

初期発生における糖タンパク質糖鎖の機能

村松 喬

(名古屋大学・医学部・教授)

[研究目的]

哺乳類の初期発生過程において、細胞膜の糖タンパク質糖鎖は大幅な構造変化を遂げる。本研究では、その生理的意義を分子生物学、細胞生物学、免疫生化学の手法を併用して、解明しようと考えた。

[研究成果]

(1) 細胞接着を阻害する単クローン抗体4C9のエピトープ決定および応用

初期胚の多分化能を持つ細胞に類似するEC細胞のクローンであるF9をラットに免疫して単クローン抗体を得たところ、その1つ4C9はF9細胞とシャーレの接着を阻害する抗糖鎖抗体であることを既に報告している。このエピトープは高分子量糖鎖エンブリオグリカン上に発現され、しかもアーモンドの α -L-フコシダーゼIで失活するので、 Le^X である可能性が強いと考えられた。この点について、より確実な証拠を得るために、以下の実験を行った。まず Le^X 構造を持つラクト-N-フコペンタオースIIIの4C9抗体阻害能を調べると、 Le^a 構造を持つラクト-N-フコペンタオースIIよりも強かった。次に α -1,3-フコース転移酵素cDNAをCOS細胞に導入して発現させると、4C9陰性の細胞が4C9抗原陽性に変化した。以上の知見から、4C9のエピトープは Le^X であると結論した。初期胚性細胞のマーカーであるSSEA-1と4C9の2つの抗原の分布を比較した。すると両者は類似するものの、4C9のほうが分布が狭く、多分化能を持つ幹細胞から始原生殖細胞に到る細胞系図のマーカーとしては、より優れていることが判明した。 Le^X 構造の周辺構造の、抗原性に対する影響が4C9とSSEA-1では若干異なるであろう。また、4C9抗原とN-アセチルガラクトサミン識別レクチン Dolichos biflorus 凝集素の結合部位(DBA)の発現パターンをヒト肺がんの原発巣に於て比較すると4C9(-)DBA(+)の腫瘍は他の糖鎖パターンの腫瘍に比べて、血行性転移が少なく、かつ患者の予後も良好であった。

(2) α -1,3-フコース転移酵素cDNAの遺伝子導入による細胞と基質の接着性の増

大

Le^X エピトープと反応する 4C9 抗体が F9 細胞のシャーレとの接着を阻害することは、Le^X 構造が細胞と基質の接着に何らかの影響を持つことを示唆する。この点について、より直接的に検証するため、Le^X 抗原陰性の L 細胞に α -1,3-フコース転移酵素 cDNA を導入し、Le^X 抗原を強制発現させた。すると Le^X 陽性細胞は陰性のコントロール L 細胞に比べてシャーレーの接着が 2 倍程度増大していた。この増大した接着はカルシウムイオンを必要とし、インテグリンの阻害剤である RGD ペプチドによって阻害された。そこで私達は Le^X 構造はインテグリンの作用を促進すると考えた。cDNA 導入 L 細胞で Le^X 抗原を担うタンパク質を免疫沈降法によって調べるとインテグリンとベイシジンが浮かび上がった。ベイシジンは免疫グロブリンスーパーファミリーに属する分子でヒト、マウス、ラットおよびニワトリで私達や他のグループによって cDNA クローニングされている。F9 細胞に於て、Le^X 構造の担い手であることが既に判明しているし、免疫沈降によって、インテグリンと共役することも判明している。さらにベイシジンとホモロジーの高い分子であるエンピジンがインテグリン依存性の細胞と基質の接着を促進することを見い出している。

従って、Le^X 構造は、インテグリン、そしてこれと複合体を作るベイシジンの立体構造、あるいは、オリゴマー構造に影響を与え、その結果、細胞と基質の接着が促進されると考えている。

(3) 糖鎖変換トランスジェニックマウスの作成

糖鎖の個体レベルでの機能を解析するために、糖転移酵素 cDNA を導入したトランスジェニックマウスの作成を試みた。 α -1,3-フコース転移酵素 cDNA を導入したマウスは生まれず、胚発生に重大な障害を生じたことが示唆された。詳しい機作を解析中である。 α -1,3-ガラクトース転移酵素 cDNA を導入したマウスは誕生した。この酵素活性が異所性に発現していることは、 α -ガラクトース特異的な GS1-B4 レクチンによる染色で確認できた。トランスジェニックマウス由来の着床前の胚でも GS1-B4 結合性が、新たに見られ、導入 cDNA が発現していることは確実であった。 α -ガラクトース構造の異所性の発現は、発生を大きく妨げることはない結論できた。

GS1-B4 染色により成体のトランスジェニックマウスでは、目の網膜、小腸の胚細胞、精原細胞に新たに α -1,3-ガラクトース構造が出現し、また、肺胞上皮と腎尿細管も α -1,3-ガラクトース構造が増加することが判明した。肝臓では α -1,3-ガラクトース転移酵素 mRNA が強く発現するにもかかわらず、GS1-B4 染色性は通常、出現しなかった。このことは、肝臓では、シアル酸転移酵素活性が強く α -1,3-ガラクトース転移酵素の基質である N-アセチルラクタミン構造が十分に提供されないためと考えられる。なお、

ランスジェニックマウスでは、野性型のマウスに比べ、尿タンパクの量が多く、低体重、突然死、脱毛の頻度も高かった。 α -ガラクトース糖鎖の異所性の発現がいかなる機作でこのような異常を生ずるのかに興味深い。

[研究報告]

1. Kamada, Y., Muramatsu, H., Arita, Y., Yamada, T. and Muramatsu, T., Structural studies on a binding site for Dolichos biflorus agglutinin in the small intestine of the mouse, *J. Biochem.*, 109, 178-183 (1991).
2. Suganuma, T., Muramatsu, H., Muramatsu, T., Ihida, K., Kawano, J. and Murata, F., Subcellular localization of N-acetylglucosaminide $\beta 1 \rightarrow 4$ galactosyltransferase revealed by immunoelectron microscopy, *J. Histochem. Cytochem.*, 39, 299-309 (1991).
3. Yoshinaga, K., Muramatsu, H. and Muramatsu, T., Immunohistochemical localization of the carbohydrate antigen 4C9 in the mouse embryo: a reliable marker of mouse primordial germ cells, *Differentiation*, 48, 75-82 (1991).
4. Matsusako, T., Muramatsu, H., Shirahama, T., Muramatsu, T. and Ohi, Y., Expression of a carbohydrate signal, sialyl dimeric Le^X antigen is associated with metastatic potential of transitional cell carcinoma of the human urinary bladder, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 181, 1218-1222 (1991).
5. Matsumoto, H., Muramatsu, H., Muramatsu, T. and Shimazu, H., Carbohydrate profiles revealed by a lectin and a monoclonal antibody correlate with metastatic potential and prognosis of human lung carcinomas, *Cancer*, 69, 2084-2090 (1992).
6. Hokita, S., Takao, S., Muramatsu, T. and Shimazu, H., Monoclonal antibodies against a human gastric cancer cell line with lung metastatic potential in nude mice define antigens whose expression is different between the primary and metastatic liver lesions, *J. Cancer Res. Clin.Oncol.*, 118, 228-234 (1992).
7. Shirahama, T., Ikoma, M., Muramatsu, H., Muramatsu, T. and Ohi, Y., Reactivity to fucose-binding proteins of Lotus tetragonolobus correlates with metastatic phenotype of transitional cell carcinoma of the bladder, *J. Urol.*, 147, 1659-1664 (1992).
8. Shirahama, T., Ikoma, M., Muramatsu, T. and Ohi, Y., Expression of SSEA-1 carbohydrate antigen correlates with stage, grade and metastatic potential of

transitional cell carcinoma of the bladder, *J. Urol.*, 148, 1319-1322 (1992).

9. Matsusako, T., Muramatsu, H., Shirahama, T., Muramatsu, T. and Ohi, Y., A metastasis-associated antigen is present on a 60 KDa glycoprotein in transitional cell carcinoma of the human urinary bladder, *Histochem. J.*, 24, 805-810 (1992).
10. Masuzawa, Y., Miyauchi, T., Hamanoue, M., Ando, S., Yoshida, J., Takao, S., Shimazu, H., Adachi, T. and Muramatsu, T., A novel core protein as well as polymorphic epithelial mucin carry peanut agglutinin binding sites in human gastric carcinoma cells: sequence analysis and examination of gene expression, *J. Biochem.*, 112, 609-615 (1992).
11. Uehara, F., Ohba, N., Nakashima, Y., Yanagita, T., Ozawa, M. and Muramatsu, T., Developmental change of distribution of β -galactoside α -2, sialyltransferase mRNA in rat retina, *Exp. Eye Res.*, 56, 89-93 (1993).
12. Huang, R.-P., Ozawa, M., Kadomatsu, K. and Muramatsu, T., Embigin, a member of the immunoglobulin superfamily expressed in embryonic cells, enhances cell-substratum adhesion, *Dev. Biol.*, 155, 307-314 (1993).
13. Matsumoto, H., Muramatsu, H., Shimotakahara, T., Nishijima, H., Mitani, N., Baba, K., Muramatsu, T. and Shimazu, H., Correlation of expression of ABH blood group carbohydrate antigens with metastatic potential in human lung carcinoma, *Cancer*, 72, 75-81 (1993).
14. Uehara, F., Ohba, N., Nakashima, Y., Yanagita, T., Ozawa, M. and Muramatsu, T., A fixative suitable for in situ hybridization histochemistry, *J. Histochem. Cytochem.*, 41, 947-953 (1993).
15. Shirahama, T., Ikoma, M., Muramatsu, T., Kayajima, T., Ohi, Y., Tsushima, T., Akebi, N., Ohmori, H., Hirao, Y. and Okajima, E., The binding site fucose-binding proteins of Lotus tetragonolobus is a prognostic marker for transitional cell carcinoma of the human urinary bladder, *Cancer*, 72, 1329-1334 (1993).
16. Ikematsu, S., Kaname, T., Ozawa, M., Yonezawa, S., Sato, E., Uehara, F., Obama, H., Yamamura, K. and Muramatsu, T., Transgenic mouse lines with ectopic expression of α -1,3-galactosyltransferase: production and characteristics, *Glycobiology*, 3, 575-580 (1993).
17. Muramatsu, T., Carbohydrate signals in metastasis and prognosis of human carcinomas, *Glycobiology*, 3, 291-296 (1993)

造血系細胞の分化・増殖を調節する糖脂質の生物情報

斎藤 政樹 (自治医大・血液研・造血発生)

共同研究者 中村 充 (同上)

【研究の目的】

糖脂質糖鎖は、細胞分化や細胞増殖・細胞成熟・細胞接着に関与していることが知られている。我々がかねてから、ガングリオシドGM3が血液幹細胞を単球系へ、ネオラクト系ガングリオシドが顆粒球系への分化を誘導することを報告してきた。しかしながら、これらの糖脂質の糖鎖発現制御ないしは律速段階については研究が進められていなかった。

また、ガングリオシドがチロシンリン酸化酵素ドメインを有する細胞増殖因子レセプターファミリーの機能をモジュレートして細胞増殖の調節に与っているとされている。しかし、我々が扱っている血液細胞の増殖因子である造血因子レセプターファミリーに関しては、糖脂質の関与が全く知られていなかった。従って勿論、関与している糖脂質の糖鎖発現制御ないしは律速段階についても全く解明されてこなかった。

そこで本研究では、血液細胞分化・増殖の鍵の一つを握る糖脂質の発現制御メカニズムおよび糖脂質全体の構築メカニズムを解明する目的で、主に律速段階の糖転移酵素がどのようなものであるかを中心に解析し考察した。

【研究の方法】

細胞分化におけるガングリオシド糖鎖発現制御に関しては、ヒト骨髄性白血病細胞株HL-60を用いた。HL-60細胞の分化は8 nM 12-O-テトラデカノイルホルボール-13-O-アセテート (TPA) で単球系に、1 μM レチノイン酸で顆粒球系に誘導した。血液細胞増殖のモデルとして、インターロイキン-3 (IL-3) 依存性株NFS60-I7とIL-3遺伝子を導入して造血因子非依存性となった導入株NFS60-H7を調製した。糖脂質はクロロホルム・メタノール抽出とDEAE-Sephadex A-25などを組み合わせて調製し、HPTLCで分離後嶋津CS-9000により解析した。中性糖脂質と酸性糖脂質の定量・発色はフェノール硫酸法・オルシノール硫酸法・レゾルシノール塩酸法を用いた。糖転移酵素活性は放射標識糖ヌクレオチドからアクセプター糖脂質への放射標識糖の転移をもって測定した。

【研究の結果と考察】

ヒト骨髄球系細胞では、LacCerから出発して現在計6種類の糖転移酵素が働いているものとされている。それらは大きく次の3つに分けられる。すなわち、(A) ガングリオシド系ガングリオシドのGM3を合成するシアル酸転移酵素、(B) ネオラクト系ガングリオシド系列にコミットする最初(最上流)のステップであるLc3Cerを合成するN-アセチルグルコサミン転移酵素、および(C) その下流域にあって実際にネオラクト系中性糖脂質やネオラクト系ガングリオシドの

生合成に与る4種の糖転移酵素群である。単球系分化ではガングリオシドGM3が著増してネオラクト系ガングリオシドが減少し、顆粒球系分化では逆にGM3が減少してネオラクト系ガングリオシドが増加することから、上記の6種類の糖転

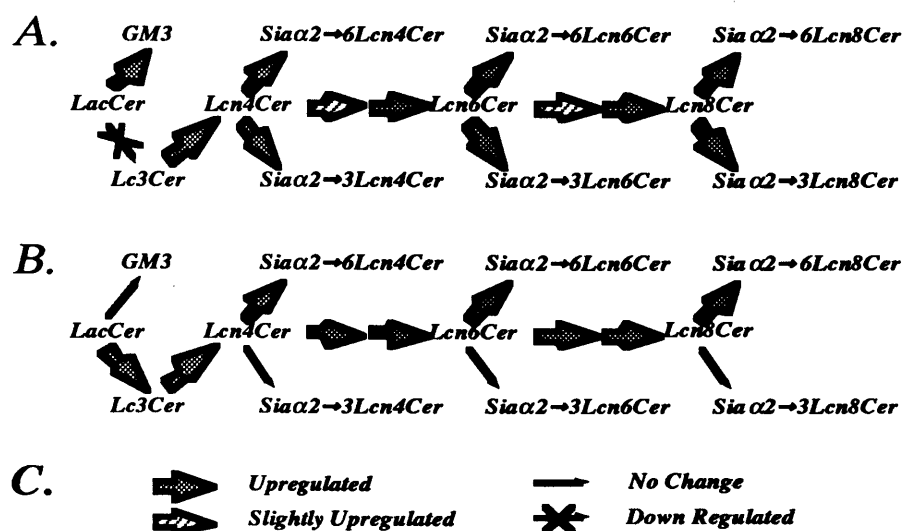


Fig.1 Lineage specific regulation of glycosyltransferases in HL-60 cells

A; Monocytic, B; granulocytic lineage.

移酵素活性の変動もそれを裏付けるものであろうと考えられていた。つまり、単球系分化では (A) のGM3合成酵素のみが活性化されて (B) および (C) のネオラクト系ガングリオシド合成に与る酵素群全体が不活化され、顆粒球系分化では (A) のGM3合成酵素活性が減少して (B) および (C) のネオラクト系ガングリオシド合成に与る酵素群全体が活性化されると予想されていた。しかし実際は、(A) のGM3合成酵素に関しては予想通りだったものの、ネオラクト系ガングリオシド合成に与る酵素群全体については予想に反して大変興味ある結果が得られた。即ち、確かに顆粒球系分化では (B) と (C) のどちらもアップレギュレートされていたが、単球系分化では (C) のネオラクト系ガングリオシド合成の下流域の酵素群の活性が上昇していた。驚くべきことに、(B) のネオラクト系ガングリオシド生合成の最上流のN-アセチルグルコサミン転移酵素がダウンレギュレートされて、下流の酵素群の活性上昇を打ち消していたのである。このことは、ネオラクト系ガングリオシド発現、つまり生合成の流れ全体が、最初のN-アセチルグルコサミン転移酵素のステップだけでコントロールされていることを明かに示している。以上から、細胞分化の方向性特有のガングリオシドの発現には、全部の糖転移酵素が均一な役割を果たしているというより、むしろ最上流のGM3合成酵素とLc3Cer合成酵素の2つがキーエンザイムとなっていることが強く示唆されたわけである。

造血因子レセプターファミリーに特にアソシエートする糖脂質を解析するために我々のとった方法は次の通りである。即ち、広く血液幹細胞の増殖を支持するIL-3を血液系細胞増殖の研究のモデルとして選び、IL-3依存性細胞株を調製してそれにIL-3遺伝子を導入する。これによりIL-3遺伝子導入株はIL-3非依存性となり、自立性増殖を始めて造腫瘍性まで獲得する。そして、このIL-3依存性の親株と導入株の糖脂質をまず分析したのである。ガングリオシドを解析

した結果、親株では主に2つのコンポーネント、X1およびX2からなり、導入株では驚くべきことにそれら2つに加えて新たにもう一つのガングリオシド、X3が出現することが判明した。DEAE-Iatrobeadsカラムを用いたHPLCやシアリダーゼをHPTLC上で働かせて行った免疫染色、ならびにFAB-Mass、特異抗体を用いたTLC-Immunostainingなどにより構造決定を行った。その結果、親株・導入株ともに存在するX1及びX2はそれぞれ、GM1bとGD1αであることが明らかとなり、導入株で新たに出現するIL-3遺伝子にアソシエートしたX3はGD1aであることが判明した。このことからIL-3遺伝子導入により、いわゆるアジア

Before Acquiring Autonomous Growth



After Acquiring Autonomous Growth



Fig.2 Schematic presentation of the shift of glycosphingo-lipid metabolic flow from "asialo"-pathway alone to "asialo" plus "a" pathway after IL-3 gene transfection into mouse myelogenous leukemia cell line NFS60. After acquiring autonomous cell growth by IL-3 gene transfection, IL-3 associated ganglioside GD1a was newly synthesized according to the key up-regulation of GM3 synthase.

ロ系列のみからアジアロ系プラスいわゆる"a"系列へと糖脂質生合成系がシフトしたことがわかる。この合成系のシフトは単なるフェノタイプの変化に留まるといふよりむしろ、IL-3遺伝子がコンステイテューティブに発現して自立的増殖するようになったそ

のメカニズムに積極的に関わるものであることが強く示唆された。次に、このGD1aの発現調節機構を調べる目的でその発現に関与している糖転移酵素群（GM3合成酵素、GM2合成酵素、GM1a合成酵素、GD1a合成酵素）の活性を測定・解析してみた。予想としては、親株でこれらの酵素群はどれも発現しておらず、導入株で活性が誘導されるのだろうと考えていた。しかし大変驚くべきことに、GD1aを合成するための最上流の糖転移酵素GM3合成酵素以外、すなわちメタボリックフローの下流域の糖転移酵素群はどれも、親株でも導入株でも活性が十分に存在して差が観察されなかったのに対し、唯一最上流のGM3合成酵素だけが親株にほとんど存在せず、導入株でアップレギュレートされていた。以上から、細胞増殖に強く関与する、即ち腫瘍性のステージがワンステップ進展する際に特徴的に発現するガングリオシドは、メタボリックフロー全体の中で、その生合成に与る全部の糖転移酵素が均一な役割を果たしているというより、むしろ最上流のGM3合成酵素がキーエンザイムとなっていることが強く示唆されたわけである。

これらのことから、異なったシステムで同様な結論が導き出されたことにな

る。つまり、特定の機能性の糖鎖発現には、その糖鎖構造の末端の糖鎖を転移する酵素ではなく、最上流の糖転移酵素が律速段階となって機能性糖鎖の発現を決定している系が複数存在しているということである。これらが例外的なシステムではなく、一般的なものである可能性は、こういった我々の研究のみならず、他のラボからも同様なデータが出ていることから伺える。すなわち、E.Holmesらの大腸癌におけるGlcNAc転移酵素、ならびにF.JungalwalaらのHNK-1エピトープの発現における同じくGlcNAc転移酵素の報告である。我々のデータは、こういった興味あるシステムがネオラクト系糖脂質のみならず、ガングリオ系ガングリオシドにも存在していることを示している。こういったメタボリックフロー最上流の糖転移酵素が本当に糖脂質生合成全体の律速段階の酵素であるかどうかについて、ならびにこれらが機能性糖鎖の発現に決定的な役割を果たしているか否かについては、今後遺伝子レベルでの解析を進めていくことが不可欠・急務であろうと考えられる。

【研究業績】

- 1) Nakamura, M., Kirito, K., Yamanoi, J., Wainai, K., Nojiri, H., & **Saito, M.**: Ganglioside GM3 Can Induce Megakaryocytoid Differentiation of Human Leukemia Cell Line K562 Cells. *Cancer Res.* **51**:1940-1945, 1991.
- 2) Nakamura, M., Tsunoda, A., & **Saito, M.**: Radioimmune Assay of Sialyltransferase and N-Acetyl-galactosaminyltransferase Activities Using Specific Antibodies on 96-well Filtration Plate of MultiScreen Assay System. *Anal. Biochem.* **198**:154-159, 1991.
- 3) **Saito, M.**, Nakamura, M., Kitagawa, S., Ohta, M., Gallagher, R.E., Nojiri, H., & Hakomori, S.: Bioactive Gangliosides and Related Compounds: Potent Differentiation-inducers for Human Leukemia Cells and Their Mechanism(s) of Action. "The Status of Differentiation Therapy of Cancer." Waxman, S., Rossi, G.B., & Takaku, F., eds.; Raven Press, New York, 1991, p169-175.
- 4) Nakamura, M., Tsunoda, Sakoe, K., Gu, J., Nishikawa, A., Taniguchi, N., & **Saito, M.**: Total Metabolic Flow of Glycosphingolipid Biosynthesis Is Regulated by Activities of UDP-GlcNAc:Lactosylceramide $\beta 1 \rightarrow 3N$ -Acetylglucosaminy-ltransferase and CMP-NeuAc: Lactosylceramide $\alpha 2 \rightarrow 3$ Sialyltransferase in Human Hematopoietic Cell Line HL-60 During Differentiation. *J. Biol. Chem.* **267**: 23507-14, 1992.
- 5) Yuo, A., Kitagawa, S., Azuma, E., Natori, Y., Togawa, A., **Saito, M.**, and Takaku, F.: Tyrosine phosphorylation and intracellular alkalization are early events in human neutrophils stimulated by tumor necrosis factor, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and granulocyte colony-stimulating factor. *Biochim. Biophys. Acta*, **1156**: 197-203, (1993).
- 6) Sakai, T., Kawakatsu, H., Hirota, N., Yokoyama, T., Takaoka, T., Sakakura, T., and **Saito, M.**: Tenascin Expression *in vitro* and *in vivo*:

Comparison between Epithelial and Nonepithelial Rat Cell Lines. *Exp. Cell Res.*, 206: 244-254, (1993).

7) Saito, M.: Bioactive Gangliosides: Differentiation Inducers for Hematopoietic Cells and Their Mechanism(s) of Actions. *In: Advances in Lipid Research*, Vol. 25, (ed. by Merrill, Bell, and Hannun), pp. 303-327, Academic Press, New York, 1993.

8) Nakamura, M., Tsunoda, A., Sakoe, K., and Saito, M.: A Monoclonal Antibody Reactive With Terminal Lactotriaoysl Residue-containing Oligosaccharides and Its Application to Characterizing Cell Surface Expression of the Glyco-epitopes in COS-1 Cells. 1993, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 197: 1025-1033, 1994.

9) 中村 充、齋藤政樹 : 白血病細胞の分化と糖鎖。 *BIOmedica* 6:771-777, 1991.

10) 中村 充、齋藤政樹 : 白血病細胞の分化と糖脂質変化。 *In* 鈴木明身、谷口直之、古川 清、井上圭三編 : 蛋白質・核酸・酵素別冊「複合糖質 --- 細胞認識から病態まで」。 東京、共立出版、1839-1846, 1992.

11) 齋藤政樹 : なぜ今、糖鎖遺伝子に注目するか ----- ダイナミックな糖鎖の遺伝子背景を探る ----- *細胞工学* 12: 689-695, (1993).

血球分化における糖蛋白質糖鎖の機能の解析

高崎誠一

東京大学医科学研究所 細胞生物化学研究部

「研究の目的」

外部情報を受信し、それを細胞内に伝達する重要な機能を持つ細胞表面レセプター分子とその機能の発現は、細胞の分化過程で厳密に制御されている。レセプター分子を含む細胞表面分子の多くは糖タンパク質であり、その糖鎖の生合成は分化の方向や成熟の度合いに応じて変化することから、細胞表面糖鎖の構造変化が特定のレセプターの機能発現に何らかの役割を持つのではと考えられる。そこで、マクロファージの特異機能の一つであるFcレセプターを介する免疫複合体の貪食に着目し、貪食能の誘導における糖鎖の役割を明らかにすることを目的として研究を実施した。

「研究の方法」

マウスのマクロファージ細胞株P388D1はFcレセプターを介して免疫複合体を結合するにもかかわらず、これを取り込むことが出来ない。この細胞を1.5% DMSOの存在下で2日間培養してFcレセプター介在性貪食能を誘導する。誘導前後の細胞をNP-40で可溶化し、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、ウエスタンブロットの後、Con Aを用いてレクチン染色する。又、細胞膜画分を調製し、膜糖蛋白質からヒドラジン分解によってAsn結合型糖鎖を遊離し、 NaB^3H_4 で還元して標識少糖を調製する。濾紙電気泳動、各種レクチンカラムクロマトグラフィー、Bio-Gel P-4カラムクロマトグラフィー等を用いて遊離少糖を分画し、エキソグリコシダーゼによる逐次消化等により構造を解析する。

細胞表面糖鎖の構造修飾は、種々濃度のプロセッシング阻害剤（スワインソニンおよびカスチノスベルミン）や糖鎖生合成阻害剤であるツニカマイシンの存在下で培養したり、細胞をシアリダーゼで処理する方法を用いる。貪食能のアッセイは、羊の赤血球をウサギの抗羊赤血球抗体（IgG）でコートし、これを細胞に加えて2時間培養した後、細胞表面に結合した赤血球を低張破壊後に細胞内に取り込まれた赤血球の数を顕微鏡下で計測する。

蛋白質のリン酸化実験は、糖鎖構造修飾前後の細胞を抗体でコートした赤血球の存在下、あるいは非存在下で ^{32}P -標識リン酸とともに保温する。十分に洗浄の後、NP-40で可溶化し、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動後にオートラジオグラフィーにより分析する。

「研究の結果」

DMSOによるP388D1細胞のFcレセプター介在性貪食能の誘導に伴う糖蛋白質糖鎖の構造変化を、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動後に蛋白質をニトロセルロース膜に転写しCon A染色法で調べたところ、図1に示したように数種の糖蛋白質が誘導後に強く染色されることが分かった。

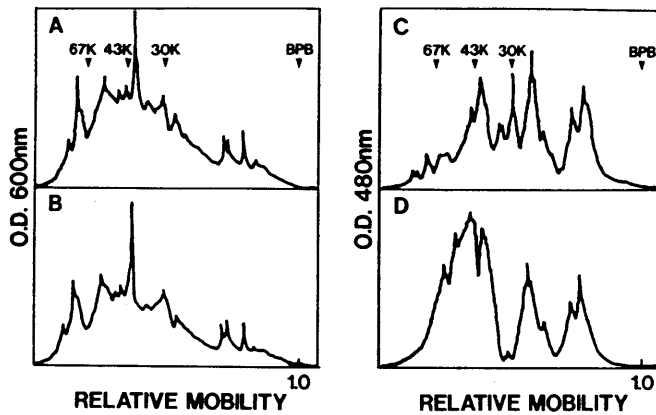


図1. DMSO誘導前 (A、C) および後 (B、D) の細胞の蛋白質および糖蛋白質のSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動による分析。

A、B：蛋白質染色、
C、D：Con A染色

そこで、Asn結合糖鎖の構造変化をより詳細に解析した結果、DMSO誘導細胞においては高マンノース型糖鎖が増加し、逆にシアル酸を含む高分岐複合型糖鎖が減少することが判明した。従って、糖鎖のプロセッシングの障害が構造変化の背景にあるものと予想された。そこで、類似の構造変化を起こすことが期待される2種のプロセッシング阻害剤、スワインソニン (図2) およびカスタノスペルミン (図3) を培養液に添加して、貪食能の誘導の有無を観察した。その結果、いずれの薬剤とも用量、時間に依存して貪食能を誘導することが判明した。

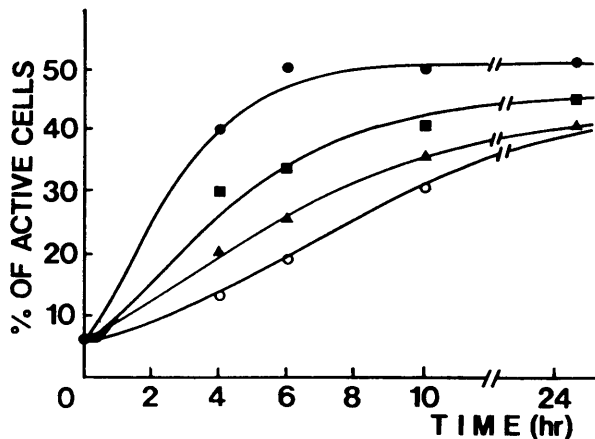


図2. スワインソニンによる貪食能の誘導

○ 0.1μg/ml
▲ 0.2μg/ml
■ 0.5μg/ml
● 1.0μg/ml

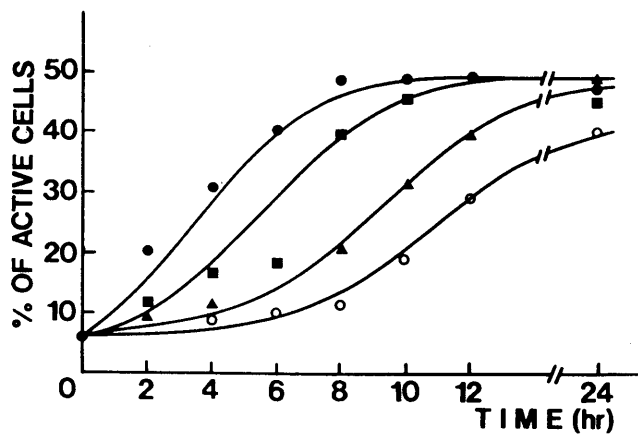


図3. カスタノスペルミンによる貪食能の誘導

- 0.1μg/ml
- ▲ 0.2μg/ml
- 0.5μg/ml
- 1.0μg/ml

以上の結果は、糖鎖の構造変化が貪食能の誘導の要因として積極的に関わっていることを示す。プロセッシング阻害による高マンノース型あるいは混成型糖鎖の発現の増加、あるいはシアル酸含有複合型糖鎖の発現の抑制のいずれかが貪食能誘導に重要と考えられた。そこで、この点を明らかにするため、細胞をツニカマイシン存在下で培養したところ、用量、時間に依存して貪食能の誘導が認められた(図4)。

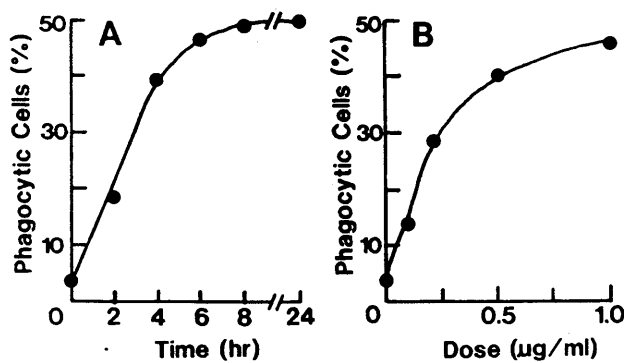


図4. ツニカマイシンA1による貪食能の誘導

- A: 1μg/mlの薬剤による誘導の経時変化
- B: 種々濃度の薬剤存在下で6時間培養後の貪食能

更に、細胞をシアリダーゼで処理した場合にもシアル酸の遊離に伴って貪食能の誘導が観察できた。したがって、シアル酸含有複合型糖鎖は貪食機能の発現に対して抑制的に働いており、このような糖鎖の減少あるいは構造修飾によって貪食能が誘導されるものと考えられた。

糖鎖構造修飾による貪食能の誘導前後で、リガンド(抗体をコートした羊赤血球)のFcレセプターへの結合には違いが認められないことから、結合段階以後の過程に着目して蛋白質のリン酸化を調べた。その結果、貪食能を誘導した細胞にのみ、リガンドの結合に依存してリン酸化される数種の蛋白質が検出された。貪食機能の発

現における蛋白質リン酸化の重要性を更に明らかにするために、アデニル酸シクラーゼの活性化剤（フォルスコリン）を貪食能誘導前の細胞の培養液に添加したところ、蛋白質リン酸化の昂進を伴って貪食能を誘導することが観察された。従って、糖鎖を修飾した細胞では、レセプターへのリガンドの結合がcAMP濃度の上昇を伴って蛋白質のリン酸化を昂進することによって貪食作用の発現に導くのに対し、糖鎖修飾前の細胞ではリガンドの結合が蛋白質のリン酸化に連動しないために、貪食作用を示さないものと考えられる。

「研究の考察」

細胞表面糖蛋白質の糖鎖の構造修飾あるいは糖鎖の付加を阻害することにより、マクロファージの特異機能の一つであるFcレセプターを介する貪食能を誘導することができた。この知見は、分化や成熟に伴う表面糖鎖の構造変化が、細胞機能の発現の調節に重要な役割を果たしていることを示す。特に、糖鎖がリガンドのFcレセプターへの結合以後のシグナル伝達過程に影響を与えていることが示唆され、その機構の解明が興味ある問題として浮上してきた。

「研究業績」

1. Kawano, T., Takasaki, S., Tao, Tien-wen and Kobata, A. : Altered glycosylation of β 1 integrins associated with reduced adhesiveness to fibronectin and laminin. Int. J. Cancer, **53**, 1-6 (1993).
2. Inoue, N., Takeuchi, M., Asano, K., Shimizu, R., Takasaki, S. and Kobata, A. : Structures of mucin-type sugar chains on human erythropoietin purified from urine and the culture medium of recombinant Chinese hamster ovary cells. Arch. Biochem. Biophys., **301**(2) 375-378 (1993).
3. Hirano, T., Takasaki, S., Hedrick, J. L., Wardrip, N. J., Amano, J. and Kobata, A. : O-Linked neutral sugar chains of porcine zona pellucida glycoproteins. Eur. J. Biochem., **214**, 763-769 (1993).
4. Fukushima, K. and Takasaki, S. : Processing inhibition of N-linked sugar chains associated with induction of Fc receptor-mediated phagocytosis in the mouse monocytoïd cells. Glycobiology, **3**(1), 15-22 (1993).
5. Fukushima, K. and Takasaki, S. : Suppressive role of sialylated N-glycans in Fc receptor-mediated phagocytosis by macrophages. Biochem. Biophys. Res. Commun., **192**, 333-337 (1993).
6. 森悦子, 高崎誠一: 哺乳類の受精と糖鎖、蛋白質核酸酵素、**37**、94-97 (1992)。
7. 高崎誠一: 受精における糖の役割、化学増刊、**122**、65-73 (1992)。

神経系における α -系列ガングリオシドの発現と機能解析

平林義雄

理化学研究所国際フロンティア糖細胞情報

(研究の目的)

シアル酸を含む糖脂質であるガングリオシドは、特に神経系組織に特徴的に存在しており、神経機能と何らかのかかわりがあると信じられてきた。筆者らは、神経系ガングリオシドのなかでも、極微量成分にこそ機能的に重要な分子が隠されているとの仮定のもとに研究を進めてきている。我々は既にこれらガングリオシドの中でも α -系列に属する GM1b、GD1 α がラット、ニワトリの脳組織に存在していることを見いだしている。本研究では、両抗原に対する単クローン抗体を作成し、特異抗体による神経系でのガングリオシド抗原の発現様式を解析した。更に、糖転移酵素の中でも糖脂質合成経路の重要な位置に存在し、かつ α -系列ガングリオシドの合成の鍵を握ると考えられるアジアロ GM2 合成酵素である β 1-4 N-アセチルガラクトサミン転移酵素 (GalNAc-T) に注目し、この酵素遺伝子の単離、および本酵素の基質特異性などを明らかにした。

(研究の方法)

GM1b, GD1 α は牛脳ガングリオシドより Q-セファロースカラムクロマトグラフィーにより精製した。

NeuAc α 2-3Gal β 1-3GalNAc β 1-4Gal β 1-4Glc1-1'Cer : GM1b

NeuAc α 2

6

NeuAc α 2-3Gal β 1-3GalNAc β 1-4Gal β 1-4Glc1-1'Cer : GD1 α

GM1b, GD1 α に特異的なマウス単クローン抗体は、既報の方法に従って得た。正常マウス小脳およびミュータントマウス (pcd, staggerer) のガングリオシド分析は 2次元の薄層クロマト/酵素抗体染色法によりおこなった。

アジアロ GM2 合成酵素 (GalNAc-T) を発現しているラット腹水肝癌細胞株 AH7974F 細胞より cDNA ライブラリーを作成した。GalNAc-T の cDNA クローニングは、既知のヒト GM2 合成酵素の cDNA の塩基配列をもとに、PCR 法により得た。

(研究の結果)

中枢神経系におけるGM1およびGD1 α ガングリオシドの局在

GM1bおよびGD1 α を特異的に認識するマウス単クローン抗体NA-6,KA-17をそれぞれ得ることができた。いずれもIgM抗体であった。両者の抗体を用いて、ラット成体脳、特に小脳での発現を検索したところ、GM1bは顆粒細胞の細胞表面に強い染色が見られた。また、ゴルジ細胞、サテライト細胞、バスケット細胞等の抑制性介在ニューロンにも存在していた。一方、GD1 α はプルキンエ細胞(図1)に局在していた。従って、両者の抗原はそれぞれ異なる神経細胞集団に分布していることが示された。

図1. ラット小脳におけるGD1 α ガングリオシドの発現。

プルキンエ細胞の細胞体および樹状突起がKA-17抗体により染色される。



アジアロGM2合成酵素の遺伝子と基質特異性

アジアロ系列への代謝経路のキイとなるGalNAc-T酵素の遺伝子をラット腹水肝癌由来の株化培養細胞から作製したcDNAライブラリーから単離してその構造を明らかにした。533個のアミノ酸をコードしている2166bpの長さを持つcDNAクローンが得られた。本酵素は、これまでに報告のあった他の糖転移酵素と同様にタイプII型の膜タンパク質であることが疎水性プロットから予想された。

CHO-leu-Py細胞で一過性に発現させた本酵素を用いて基質特異性を調べた。本酵素は糖脂質のみに特異的にGalNAcを転移し、糖タンパク質及びオリゴ糖は全く基質とならなかった。糖脂質については、ラクトシルセラミド、GM3、GD3を基質としてそれぞれアジアロGM2、GM2、GD2を合成した。以上の結果から単一の酵素によってこれら3種類の糖脂質が合成されることが明らか

かとなった。

単離した糖鎖合成酵素遺伝子(pGNA56)をカルシウムリン酸法を用いてCHO-K1細胞に導入し、安定な遺伝子発現系を確立した。新たな糖鎖の発現は、特異的に反応する抗体を用いた直接あるいは間接蛍光抗体法により蛍光顕微鏡及びセルソーターを利用して検出した。本酵素を安定に発現している細胞をクローン化してその糖脂質発現を調べた結果、アシアロGM2、GM2の同時発現が認められ、in vitroで得られた結果とよく一致していることが確認された(図2)。

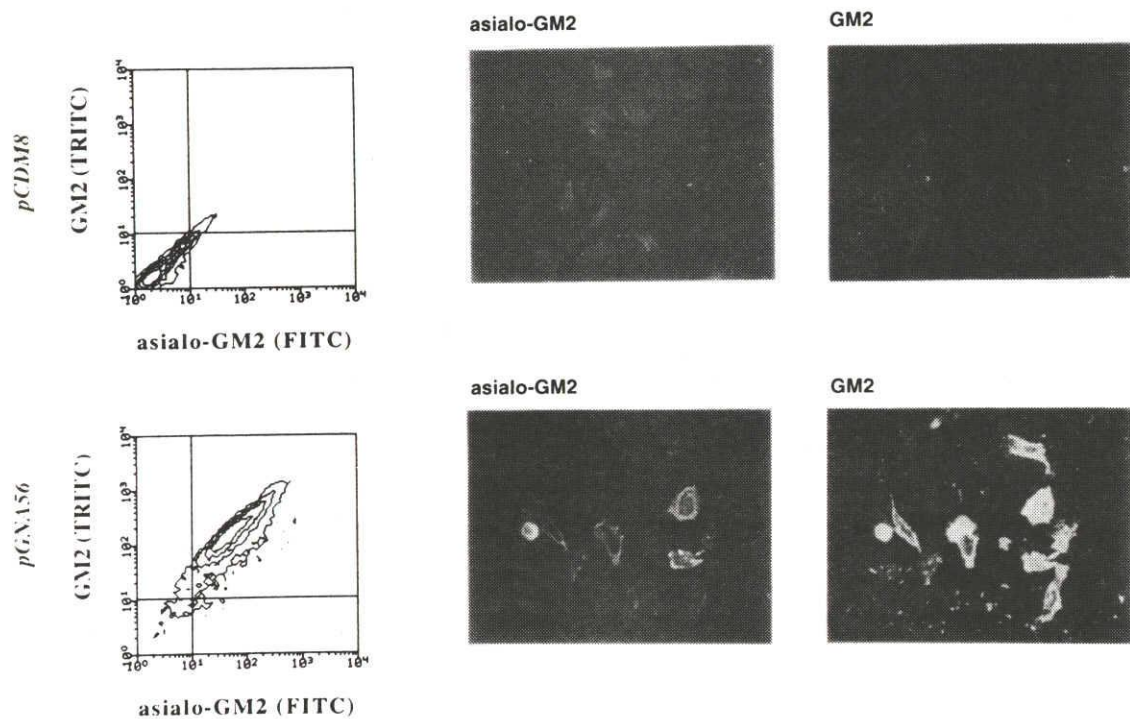


図2 GalNAc-T遺伝子導入によるアシアロ系列糖脂質の発現

(研究の考察)

特異抗体による組織染色の結果は、微量成分ガングリオシドがニューロンのネットワーク形成に重要な役割を演じている可能性を示唆していた。また、プルキンエ細胞はアシアロ系列を経てガングリオシドが合成される α 系列が存在していることを示していた。

アシアロ系列の発現の鍵を握るアシアロGM2合成は、GM2合成酵素と同一の酵素により触媒されることが示された。アシアロ系列を決定している因子の

一つとして、GM3を合成するシアル酸転移酵素とGalNAc-T活性の比が重要であると考えられる。即ち、前者に比べ後者の活性が高いことが必要である。実際、AH7974F細胞ではGM3合成酵素活性がほとんど存在しないために、ラクトシルセラミドはほとんどすべてアシアロGM2へ変換されていく。

以上の結果から小脳のプルキンエ細胞においてはアシアロ系列が活発に代謝されているものと予想された。実際、プルキンエ細胞の欠いたミュータントマウスではGD1 α が顕著に減少していることを見いだしている。

最近、神経系に存在する微量成分のガングリオシドの機能に関心に移りつつある。筆者らは、今回の成果とは別に、コリン作動性ニューロンに特異的に存在する新しいタイプの構造を持った微量成分ポリシアロガングリオシドを見いだしている。特定の神経細胞に特異的に存在する極微量ガングリオシドの意義を今後明らかにしていきたい。

(研究業績)

- 1) Ichikawa, S., Nakajyo, S., Sakiyama, H., and Hirabayashi, Y.: A mouse melanoma mutant deficient in glycolipids, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1994, in press
- 2) Hidari KIPJ, Irie F., Suzuki M., Kon K., Ando S., and Hirabayashi Y.: A novel ganglioside with free amino group in bovine brain. Biochem. J. 296, 259-263, 1993
- 3) Nakao T., Kon S., Ando S., Miyatake T., Yuki N., Li Y.-T., Furuya S. and Hirabayashi Y. : Novel lacto- ganglio type gangliosides with GM2-epitope in bovine brain which are the possible antigens responsible for inducing the amyotrophic lateral sclerosis-like disorder. J. Biol. Chem. 268, 21028-21034, 1993
- 4) Kusunoki S., Chiba A., Hirabayashi Y., Irie F., Kotani M., Kawashima I., Tai T., and Nagai Y. : Generation of a monoclonal antibody specific for a new class of minor ganglioside antigens, GQ1b α and GT1a α : Its binding to dorsal and lateral horn of human thoracic cord. Brain Research, 623, 83-88, 1993
- 5) Nakayama J., Katsuyama T., Sugiyama E., and Hirabayashi Y. : Polysialosyl glycoconjugates defined by a monoclonal antibody M6704 are expressed in human gliomas and embryonic neurons. J. Histochem. Cytochem. 1993 (in press)
- 6) Izumi K., Yamamoto K., Tochikura T., Hirabayashi Y.: Serological study using α -N-acetylgalactosaminidase from *Acremonium* sp. Biochim. Biophys. Acta 1116, 72-74, 1992
- 7) Hirabayashi Y., Nakao T., Irie F., Whittaker V.P., Kon K., and Ando S.: Structural characterization of a novel cholinergic-neuron specific ganglioside in bovine brain. J. Biol Chem., 267, 12973-12978, 1992
- 8) Ando S., Hirabayashi Y., Kon K., Inagaki F., Tate S., and Whittaker V.P. : A trisialoganglioside with cholinergic neuron specificity. J. Biochem., 111, 287-290, 1992
- 9) Naskayama J., Ota H., Katauyama T., Kanai M., Taki T., Hirabayashi Y., Suzuki Y.: Immunochemical demonstration of glycoconjugates bearing type 2 chain backbone structure in human fetal, normal, neoplastic gastrointestinal tract. Histochem. 97, 303-310, 1992

10) Suzuki Y., Nishi H., Hidari K., Hirabayashi Y., Matsumoto M., Kobayashi T., Watarai S., Yasuda T., Nakayama J., Maeda S., Katsuyama T., Kanai M., Kiso M., Hasegawa A.: A new monoclonal antibody directed to sialyla2-3 lactoneotetraosylceramide and its applications for human gastrointestinal neoplasmas. J. Biochem. (Tokyo) **109**, 354-360, 1991

11) Nakao T., Kon K., Ando S., and Hirabayashi Y.: A NeuGc-containing trisialoganglioside of bovine brain. Biochim. Biophys. Acta, **1086**, 305-309, 1991

12) Hirabayashi Y., Kon K., Fujita S., and Ando S. : Characterization of a novel ganglioside from chick intestinal tissues recognized by 188C1 murine monoclonal antibody. J. Biol. Chem., **266**, 10268-10274, 1991

(和文総説)

- 1) 平林義雄：糖脂質と神経化学 ブレインサイエンス、4、55-64、1993
- 2) 平林義雄：微量糖脂質の生理活性 蛋白質・核酸・酵素 (印刷中)
- 3) 平林義雄：糖と脂質の接点、糖鎖の多様な世界 講談社グリコバイオロジーシリーズ1、pp57-104、1993
- 4) 入江史敏、平林義雄：極微量ガングリオシドの新しい世界を探る 化学と生物、**31**、213-216、1993
- 5) 平林義雄：神経系糖脂質の新しいマーカー Dementia, **6**, 302-303, 1992
- 6) 中山 淳, 勝山 努, 平林義雄：神経の発生分化と糖鎖 蛋白質核酸酵素、**37**, 240-245, 1992
- 7) 平林義雄：糖脂質、特にガングリオシドの分離、精製、構造決定の進展 糖鎖工学、産業調査会バイオテクノロジー情報センター、pp. 215-224, 1992
- 8) 谷口 克、平林義雄：モノクローナル抗体とその応用、医科分子生物学 (第2版) 320-334、1991

消化管ムチン糖鎖の解析と病態

堀田恭子、五艘行信
北里大学医学部 生化学

[研究の目的]

消化管粘液細胞が産生するムチン（高分子粘液糖タンパク質）はゲル層を形成し、消化管上皮を様々な攻撃因子から防御する機能を担っている。このムチンの糖鎖は消化管の部位ごとに異なっており、それぞれの部位におけるムチンの防御機能に密接に関係すると考えられる。これは、種々の病態においてムチンの糖鎖が変化することからも支持される。したがって、消化管ムチン糖鎖の構造、部位による違い、その原因となる生合成機構、さらに病態による変化を知ることは重要である。そこで本研究では消化管ムチン糖鎖（特に硫酸化糖鎖）について、その構造、生合成機構および存在部位による構造の違いについて解析し考察した。

[研究の方法]

ラット消化管組織切片（胃体部、胃前庭部、十二指腸、空腸、回腸および結腸）を放射性無機硫酸の存在下で培養した後、ムチンを2%トライトンX-100で抽出した。塩化セシウム密度勾配遠心法で精製後、ムチン糖鎖を1M水素化ホウ素ナトリウムの存在下0.05M水酸化ナトリウム処理で遊離させた。薄層クロマトグラフィーで精製した糖鎖をトヨパールHW-50Sカラムクロマトグラフィーとアミノプレート薄層クロマトグラフィーによる2次元マッピング法により解析した。

硫酸化糖鎖をさらにヒドラジン、亜硝酸で処理した後、生じたアンヒドロ糖の構造をゲルろ過、イオン交換クロマトグラフィー、エキソグリコシダーゼ処理、過ヨウ素酸酸化などの方法を用いて決定した。得られた結果から硫酸基の結合糖残基および結合位置を決定した。

一方、硫酸化糖鎖の生合成にあずかる硫酸転移酵素の性質はラット胃体部のミクロソーム画分を用いて検討した。酵素画分を放射性硫酸供与体および構造既知の種々のオリゴ糖とともにインキュベーションし、生じた硫酸化オリゴ糖をイオン交換および薄層クロマトグラフィーで精製しその量を測定した。また生成物の構造を、前述したヒドラジン・亜硝酸分解法で決定した。

[研究の結果]

消化管ムチンの硫酸化オリゴ糖をクロマトグラフィーによる2次元マッピング法で分析したところ、予想したようにその構造は消化管部位により異なることがわかった（図1）。同じ胃でも体部ではサイズの大きな硫酸化糖鎖が存在するのに対し前庭部ではわずかであった。小腸および大腸ムチンでも硫酸化糖鎖のサイズは小さかった。小腸では、十二指腸、空腸、回腸で良く似た糖鎖のパターンが得られたが、個々の糖鎖の量比は部位により異っていた。胃体部、胃前庭部、小腸、大腸間で比較すると、糖鎖のパターンはそれぞれ大きく異っていたが、一部の糖鎖は二つある

いは三つの部位で共通に認められた。

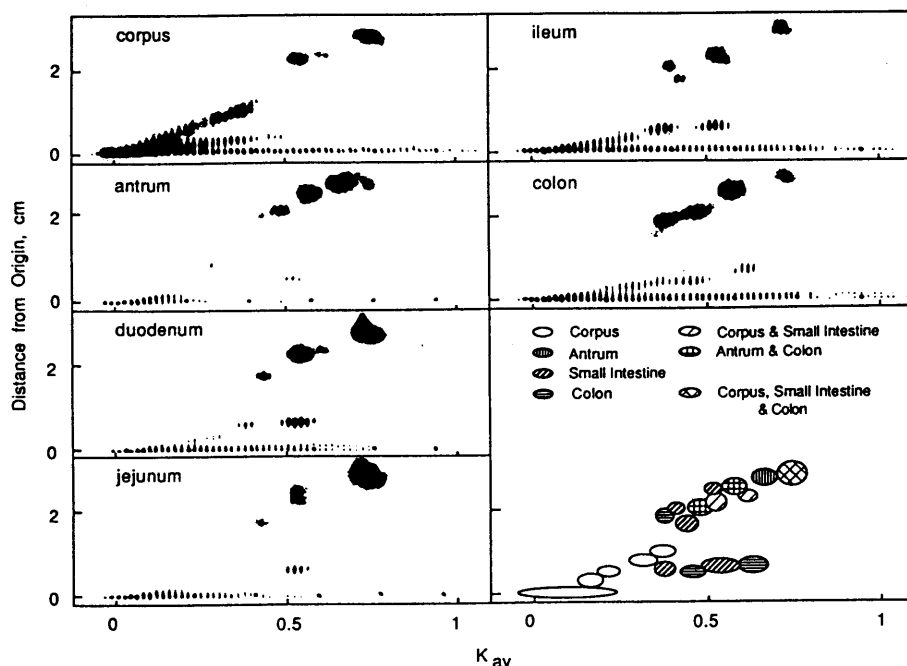


図1. ラット消化管ムチン硫酸化糖鎖の2次元マッピング法による解析

胃体部および胃前庭部ムチンの硫酸化オリゴ糖について硫酸化糖残基の同定を行なった結果、硫酸基はN-アセチルグルコサミンの6位に結合していることが明らかとなった。しかし、前庭部ではほとんどの硫酸化N-アセチルグルコサミンが糖鎖の非還元末端に存在したのに対し胃体部では糖鎖内部にも存在し、両部位の糖鎖に違いが認められた。さらに胃体部ではGal β 1-4GlcNAc(6-SO₄)とFuc α 1-2Gal β 1-4GlcNAc(6-SO₄)の2つの配列の存在が明らかとなった。

表1. ラット胃体部硫酸転移酵素の基質特異性

| Acceptor | Enzyme activity (dpm/0.5h) | Relative activity |
|---|----------------------------|-------------------|
| GlcNAc β -O-Me | 15,400 | 100 |
| GlcNAc α -O-Me | 260 | 2 |
| GlcNAc β 1-3Gal β -O-Me | 14,700 | 95 |
| GlcNAc β 1-6Gal | 16,200 | 105 |
| GlcNAc β 1-6Man α -O-Me | 17,700 | 115 |
| Gal β 1-3GlcNAc | 130 | 1 |
| Gal β 1-4GlcNAc | 120 | 1 |
| Gal β 1-6GlcNAc | 200 | 1 |
| Gal β 1-4GlcNAc β -O-Et | 5 | 0 |
| Gal β 1-4GlcNAc β 1-6Gal | 150 | 1 |
| Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc | 20 | 0 |

胃体部における上記硫酸化糖鎖の成因を検討するために硫酸転移酵素について検討した。GlcNAc β -O-Meを基質として反応条件を検討した結果、至適pHは7.5であり2価金属イオンは要求せずむしろ阻害的に働くことなどがわかった。基質特異性の検討では、この酵素は非還元末端に β -GlcNAcを持つ糖鎖に硫酸基を転移することが明らかとなった(表1)。しかし、内部に β -GlcNAcを持つ糖鎖への転移は見られなかった。GlcNAc β -O-Meを基質として得られた生成物の構造を解析したところ、生成物はSO₄→6GlcNAc β -O-Meであることがわかった。

[研究の考察]

ムチン硫酸化糖鎖の量が消化管部位により異なることは組織化学的研究によりわかっていたが、本研究により糖鎖の構造も異なることが明らかとなった。胃において体部ムチンに大きな硫酸化糖鎖が存在し、また糖鎖内部にも硫酸化糖残基があることは、この部位が胃酸やペプシンといった攻撃因子に常に曝されていることへの適応と解釈できる。さらに小腸ムチンと大腸ムチンの糖鎖が部位特異的構造であることも、それぞれの部位におけるムチンの機能、十二指腸にあっては胆汁や膵液に対する防御、大腸にあっては共存する腸内細菌からの防御、を反映している可能性が考えられる。今後、病態によるムチン糖鎖の変化をも考慮に入れて解析していく必要がある。

多様な硫酸化糖鎖を生み出す原因の一つである硫酸転移酵素について解析したところ、糖鎖の非還元末端のN-アセチルグルコサミン残基に硫酸を転移する酵素が見つかった。しかし糖鎖内部のN-アセチルグルコサミン残基への硫酸転移は認められず、硫酸化糖鎖の生合成機構に新たな疑問が生じた。これからの課題と考えられる。

[研究業績]

1. Goso, Y., & Hotta, K.: Regional differences in sulfated oligosaccharides of rat gastrointestinal mucin as detected by two-dimensional chromatography. Arch. Biochem. Biophys., **302**, 212-217 (1993)
2. Ishihara, K., Kurihara, M., Eto, H., Kasai, K., Shimauchi, S., & Hotta, K.: A monoclonal antibody against carbohydrate moiety of rat gastric surface epithelial cell-derived mucin. Hybridoma, **12**, 609-620 (1993)
3. Ishihara, K., & Hotta, K.: Comparison of the mucus glycoproteins present in the different layers of rat gastric mucosa. Comp. Biochem. Physiol., **104B**, 315-319 (1993)
4. Ishihara, K., Kameyama, J., & Hotta, K.: Development of an HPLC method to estimate hexosamines and its application to determine mucin content in rat and human gastric

- mucosa. Comp. Biochem. Physiol., 104B, 781-786 (1993)
5. Ohara, S., Ishihara, K., & Hotta, K.: Comparative study on rat enteromucins. Comp. Biochem. Physiol., 106B, 147-152 (1993)
 6. Ohara, S., Ishihara, K., & Hotta, K.: Regional differences in pig gastric mucins. Comp. Biochem. Physiol., 106B, 153-158 (1993)
 7. Iwase, H., & Hotta, K.: Release of O-linked glycoprotein glycans by endo- α -N-Acetylgalactosaminidase. Methods Mol. Biol., 14, 151-159 (1993)
 8. Ishii-Karakasa, I., Iwase, H., Hotta, K., Tanaka, Y., & Omura, S.: Partial purification and characterization of an endo- α -N-acetylgalactosaminidase from the culture medium of *Streptomyces* sp.OH-11242. Biochem. J., 288, 475-482 (1992)
 9. Iwase, H., Ishii-Karakasa, I., Fujii, E., Hotta, K., Hiki, Y., & Kobayashi, Y.: Analysis of glycoform of O-glycan from human myeloma immunoglobulin A1 by gas-phase hydrazinolysis following pyridylation of oligosaccharides. Anal. Biochem., 206, 202-205 (1992)
 10. Hotta, K.: Mucus and mucin: Fundamental aspects, Cytoprotection and Cytobiology, 9, 3-15 (1992)
 11. Komuro, Y., Ishihara, K., Ohara, S., Saigenji, K., & Hotta, K.: A new method of separation and quantitation of mucus glycoprotein in rat gastric mucus gel layer and its application to mucus secretion induced by 16,16-dimethyl PGE₂. Gastroenterol. Jpn., 26, 582-587 (1991)
 12. 堀田恭子: 胃粘膜防御機構－粘液、最新内科学体系 4 1 胃炎 (井村、尾形、高久、垂井／編) pp.17-26 (1993) 中山書店, 東京
 13. 五艘行信、堀田恭子: ムチンの癌性変化とムチン型糖鎖の異常、グリコパソロジー (箱守、永井、木幡／編) pp.65-76 (1993) 講談社, 東京
 14. 石原和彦、堀田恭子: 粘液の生化学、細胞, 25, 195-199 (1993)

ムチン抗原の特異性

山科郁男
京都産業大学工学部

[研究の目的]

ムチンは上皮性細胞をはじめとして多くの細胞の表面物質として細胞表面の挙動に関与している。その際糖鎖は周辺のペプチド構造も含めてムチンの機能の支配的因子である。われわれはムチンに特異的な単クローン抗体を作成し、これらの抗体を用いてムチンの微細構造を解明する。さらに微細構造の生成の機作、生物学的意義を明らかにすることを目的とする。

[研究の方法]

ムチン産生能の高いヒト結腸癌細胞を免疫抗原とし、ムチン型糖ペプチドとの反応性を目安にして作成した単クローン抗体を用いて、ムチンの微細構造を解明する。エピトープの解析には、ヒツジ顎下腺ムチン (OSM)、グリコホリンA、ロイコシアリン、ヒト初乳オリゴ糖およびヒト結腸癌組織より抽出した糖脂質を用いた。

[研究の結果]

ムチン糖鎖識別単クローン抗体のうち、抗Tn-抗体 (MLS 128)、抗シアリルTn-抗体 (MLS 102) および抗シアリルLea^a-抗体 (MSW 113) を当面の研究に用いた。

MSL 128については、真のエピトープ構造の解明を行って一つの結論を得た。すでに、OSMについてはSer^{*}-Thr^{*}-Thr^{*}(*はGalNAcの結合を意味する)を含む糖ペプチドが抗体と強く反応し、Ser^{*}-Ser^{*}, Thr^{*}-Thr^{*}のような2連構造および連続していないSer^{*}, Thr^{*}の抗体との反応性は3連構造の1~2%であることを報告した。本年度はグリコホリンAとロイコシアリンについて同様な研究を行った。

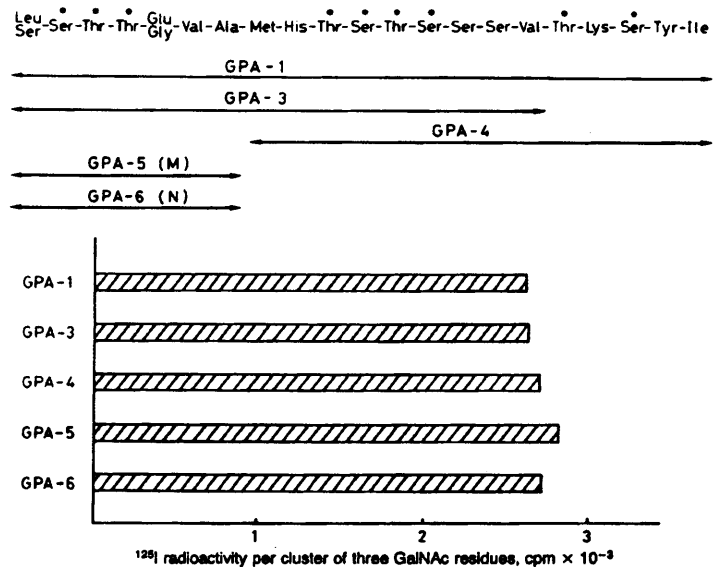


図-1 TnグリコホリンAのTn抗原。
活性は3連または4連構造当りで表わした。

グリコホリンAをグリコペプチダーゼで消化し、消化物をMLS 128のアフィニティーカラムにかけ、結合物を溶出したのち、HPLCで分画した。得られた糖ペプチドはアッセイ用のプラスチックプレートに固相化したのち、シアリダーゼとβ-ガラクトシダーゼで処理して、MLS 128との反応をアッセイした。GPA-1~GPA-6の6個の糖ペプチドが均一状態に単離された。このうちGPA-2のみが抗体と事実上反応しなかった。GPA-2はSer-22~Ala-36の15個のアミノ酸から成り、Ser-22, Thr-25, Thr-33に糖が結合していた。他の糖ペプチドは図-1に示すように、3連または4連、あるいはその両者を含み、MLS 128と強く反応した。3連構造と4連構造は同じ強さの反応性を示した。図-1は反応性を3連(または4連)構造当りで表したものである。アッセイは¹²⁵Iで標識したプロテインAを用いて行った。

ロイコシアリンについてはトリプシン消化物をイムノアフィニティーカラムとHPLCで精製して抗体と強く反応する糖ペプチドを分離した。これらの糖ペプチドはいずれもSer*またはThr*の3連または4連構造を含んでいた。

抗Tn-抗体としてはすでに2種の抗体(NCC-LU-35, CA3239)が報告されている。これらの抗体の分与をうけて各種の糖ペプチドとの反応性を調べたところ、それらの反応性はMLS 128と全く同じであった。

以上の結果から抗Tn-抗体の真のエピトープはSer*またはThr*の3連または4連構造であることが明らかとなった。

MLS 102については、抗シアリルTn抗体であることをすでに明らかにしている。OSMを用いてエピトープ構造を明らかにしつつ、あるが、予備的研究の結果は、Tn抗原と同様、3連のSia-GalNAc-Ser/Thrが真のエピトープである可能性を示唆している。

なお、OSMにおいても、癌細胞のムチンにおいても、Tn抗原とシアリルTn抗原とが同一ポリペプチド鎖上に発現していることが明らかになった。

MSW 113はシアリルLe^a構造を認識することをすでに報告した。しかし、同様にシアリルLe^a構造を認識するNS19-9と異なり、末端にシアリルLe^a構造をもちながら、様々な内部構造をもつオリゴ糖と強く反応することが明らかになった。本年度明らかにした、MSW 113と強く結合する、ヒト初乳オリゴ糖(表-1)と、ヒト結腸腺癌のガングリオシドの糖鎖(表-2)の構造は以下に示す通りである。

表-1 はシアリルLe^a 構造と i 抗原構造、あるいはシアリルLe^a とLe^x 構造が同一糖鎖に発現していることを示す。また、表-2 は糖脂質糖鎖とムチン糖鎖が同じ抗体で認識される構造を有し、その中にもまた、シアリルLe^a とLe^x 構造の共存が認められた。これらはシアリル-Le^a-X 構造と呼ぶことができる。

[研究の考察]

ムチンは一般に、SerまたはThrに糖鎖の結合した糖タンパク質ではあるが、これらのアミノ酸の分布や糖鎖の結合の状況については特別な生物学的意義が賦与されていなかった。結合力の強い、抗ムチン抗体を作成することによっていくつかの新しい事実を明らかにすることができた。すなわち、Ser*やThr*は広く分布しているが、Ser*-Thr*-Thr*のような3連（または4連）の構造の分布は限られている。抗Tn-抗体や抗シアリルTn-抗体は癌抗原を認識する抗体で、とくに消化管の上皮性癌組織と強く反応し、正常組織との反応は特殊な部位に限られている。したがって、Ser*やThr*の3連（または4連）構造は癌組織や一部の正常組織（顎下腺など）に特有の構造であると考えられる。これらの構造には、必要なトランスフェラーゼが存在するにも拘わらずガラクトースやシアル酸が付加されることがな

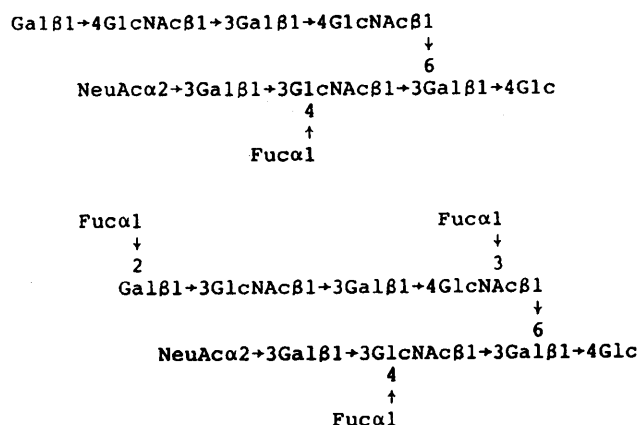


表-1 ヒト初乳のシアリルLe^a オリゴ糖

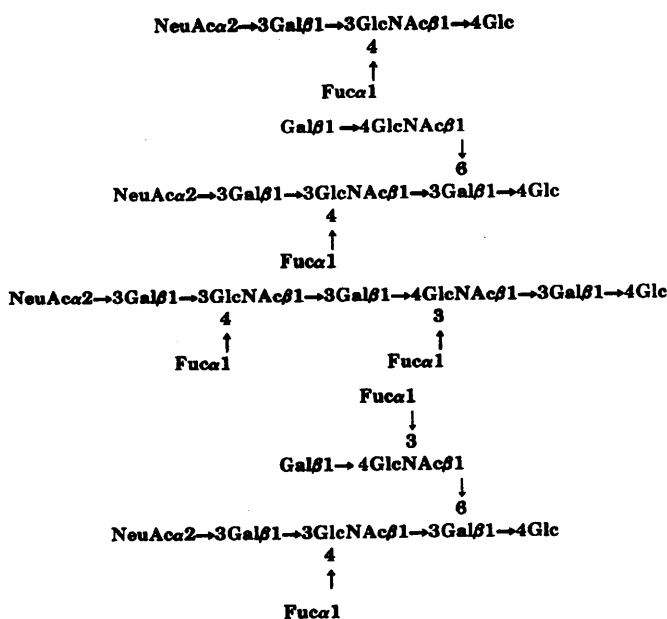


表-2 ヒト結腸癌組織のシアリルLe^a 糖脂質の糖鎖構造

い。一方、他の正常組織（造血組織）ではグリコホリンAに見られるようにガラクトースとシアル酸が結合している。糖鎖発現の機作における糖トランスフェラーゼ以外の要因について新たな問題を提起したものと考えらる。

新しい強力な抗体は、ミルクオリゴ糖や、糖脂質、ムチンの糖鎖にも新しい型の存在することを示した。こゝに示したものよりもはるかに高分子で複雑な構造の糖鎖の存在も見出されており、生物学的意義とともに今後の展開に大きな興味もたれる。

[研究業績]

Nakada, H., Inoue, M., Numata, Y., Tanaka, N., Funakoshi, I., Fukui, S., Mellors, A. and Yamashina, I.: Epitopic structure of Tn glycoprotein A for an anti-Tn antibody (MLS 128). Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 90: 2495-2499, 1993.

Kitagawa, H., Nakada, H., Fukui, S., Funakoshi, I., Kawasaki, T., Yamashina, I., Tate, S. and Inagaki, F.: Novel oligosaccharides with the sialyl-Le^a structure in human milk. J. Biochem., 114: 504-508, 1993.

Kitagawa, H., Nakada, H., Fukui, S., Funakoshi, I., Kawasaki, T., Tate, S., Inagaki, F. and Yamashina, I.: Novel oligosaccharides containing the sialyl-Le^a structure from a human rectal adenocarcinoma. J. Biol. Chem., 268: 26541-26545, 1993.

Inoue, M., Nakada, H., Tanaka, N. and Yamashina, I.: Tn antigen is expressed on leukosialin from T lymphoid cells. Cancer Res.: 54: in press.

胚性腫瘍細胞における糖転移酵素遺伝子の発現制御

成松 久

創価大学生命科学研究所 細胞生物学部門

「研究の目的」

初期発生時の受精卵において、もっとも劇的に変化するのは、その糖鎖構造である。その中でも、SSEA-1(stage specific embryonal antigen-1)は、細胞間認識物質として興味を惹いてきた。この抗原合成に関わる酵素として、 β 1-4ガラクトース転移酵素(以下 β 1-4GT)、 β 1-3N-アセチルグルコサミン転移酵素(β 1-3GlcNAcT)、 α 1-3フコース転移酵素(α 1-3FucT)の3つが、最小限必要とされる。初期発生のモデル細胞系として、マウスF9テラトカルシノーマ細胞、ヒトNT2テラトカルシノーマ細胞を、レチノイン酸(RA)やジブチリルcAMP(dbtcAMP)で分化誘導した際の、SSEA-1発現量と β 1-4GTおよび α 1-3FucT量の経時的变化をまず解析した。さらに、 β 1-4GT遺伝子発現量の調節機構を解析することにより、初期発生時における糖鎖構造の変化に関わる分子機構を解明することを目的とした。 α 1-3FucT遺伝子については、multi-gene familyを形成しているため、現時点では、そのうちのどの α 1-3FucT遺伝子が初期発生時に機能しているかは定かではない。まず、テラトカルシノーマ細胞で発現され機能している α 1-3FucT遺伝子を同定することを試みた。

「研究の方法」

全RNAは、AGPC法により精製し、Northern解析は通常の方法によった。マウス β 1-4GT遺伝子上流領域をルシフェラーゼcDNAに組み替えて、F9細胞にリン酸カルシウム法により一過性トランスフェクションして、転写活性を測定した。*de novo*のmRNA合成能を測定するため、 5×10^7 個の細胞より核を抽出して、Nuclear Run-Off Assayを行なった。 β 1-4GTと α 1-3FucTおよび α 1-4FucT活性を定量し、ヒト β 1-4GTの酵素タンパク量の検出には、ウエスタン解析も併用した。SSEA-1抗原は、抗SSEA-1抗体による蛍光染色を行なった。mRNAの半減期の定量には、細胞をactinomycin Dで処理した後、その全RNAを用いてNorthern解析を行なった。

ヒト α 1-3FucT(α 1-4FucT)遺伝子のクローニングを行なった。既知の塩基配列をもとに合成したプライマーをプローブとして、ヒトのコスミドライブラリーをスクリーニングすることにより、FucT IIIとFucT VI遺伝子をクローニングできた。FucT IVとFucT Vは、ORF領域をPCR法にてクローニングした。NT2における

α 1-3FucT遺伝子の発現を検討する前に、ルイス血液型陰性の個体でのFucT III遺伝子のゲノム解析を行なった。末梢白血球よりのゲノムDNAから、PCR法によりFucT III、V、VI 遺伝子をクローニングして、塩基配列を決定した後、発現ベクターに組み替えて、その酵素活性を定量した。

「研究の結果」

β 1-4GT遺伝子のマウスF9細胞分化誘導時における発現調節機構の解析；マウス胚芽腫幹細胞F9を $1\mu\text{M}$ のRAあるいは、 $0.1\mu\text{M}$ のRAと 1mM のdbtcAMPで内胚葉様細胞へ分化させて、ノーザン解析により β 1.4GTmRNAの発現の変化を見た。 $1\mu\text{M}$ RA処理では、6日目まで徐々に2倍の増加が見られた。 $0.1\mu\text{M}$ RAと 1mM dbtcAMP処理でも、6日目まで徐々に6倍の増加が見られ、8日目まで増加した。 β 1-4GTの転写活性を解析するために、上流領域約 1.6kb をルシフェラーゼ遺伝子をリポーターにもつ転写活性用プラスミドに組み込み、F9細胞の分化の各段階で一過性トランスフェクションを行った。転写活性は誘導1日目に上昇して、その後低下して4日目以降未分化の転写活性よりも低下した。また、誘導1日目の転写活性の上昇は、RAの濃度に依存していた。核Run-offアッセイによる*de novo*の合成量は、未分化時と分化時で変化はなく、分化誘導時における β 1-4GTmRNAの増量は転写活性の増強によるものではないことが確認された。さらに、分化時には β 1-4GTmRNAの半減期が有意に延長しており、このことからmRNA量の増量は、転写の亢進ではなくmRNAが安定化された結果であることが判明した。ちなみに、 β 1-4GT活性はそのmRNA量と一致して変化した。F9細胞では、分化誘導とともにSSEA-1抗原が消失してくるのとは逆に β 1-4GT活性は上昇する、という逆相関関係となった。。

ヒトNT2テラトカルシノーマ細胞における β 1-4GTと α 1-3 FucT遺伝子の発現制御； NT2細胞は、F9細胞とは、その反映している発生段階が異なることが知られている。RAによる分化誘導後、3-4日でSSEA-1抗原を発現し、その後再び消失する。 β 1-4GTと α 1-3 FucTの経時的変化をSSEA-1抗原の動きとともに解析した。 β 1-4GTは、 β 1-4GT酵素活性、Northern解析によるmRNA量、Western解析による酵素タンパク質量ともに、RA誘導後3-4日目に一過性に発現がみられた。これは、SSEA-1抗原の経時的変化と一致した。 α 1-3 FucT活性を測定したが、これも同様の経時的変化を示した。

ヒト α 1-3 FucT遺伝子のクローニングとその解析

α 1-3FucT は、gene family を形成していることがわかっていた。そこで既知の3種の α 1-3FucT (FucT III, IV, V) に共通する塩基配列をオリゴヌクレオチドとして合成した。これを持ちいてヒトゲノムコスミドライブラリーをスクリーニングしたところ、新しい α 1-3FucTをクローニングすることができた。これは、後にFucT VIと名付けられたものと同じであった。FucT IIIとFucTVI は、一つのコスミドクローンにのっており、その遺伝子間の距離はわずか 13kb であった(文献3)。

両者が、かなり近い過去にgene duplicationにより生じたことを推測させた。NT2細胞のSSEA-1抗原を合成している α 1-3FucT遺伝子は、複数あるうちのどれであろうか。あるいは、まだ未知の α 1-3FucT遺伝子が存在しているのであろうか。まだ結論は出ていない。

ルイス式血液型陰性の個体におけるFucT-III遺伝子の変異の解析； ヒトの血液型抗原の一種であるLewis式血液型抗原 (Le型抗原) は、赤血球や分泌液、分泌組織中に存在するが、その発現には α (1,3/1,4)fucosyltransferase (FucT-III)遺伝子がかかわると考えられている。我々は、Le(-)の個体におけるFucT-III遺伝子のゲノム構造を明らかにするため、Le(-)のヒト末梢血から分離した白血球よりDNAを抽出し、以下の実験を行なった。

8例のLe(-)の個体からのDNAに対し、FucT-III遺伝子の catalytic region をプローブとして Southern blot 解析を行なったところ、すべての例において、FucT-III遺伝子の大きな欠損は認められなかった。4例のLe(-)の個体、及び、2例のLe(+)の個体からのDNAを鋳型とし、PCR法によりFucT-III遺伝子の coding region のDNAを増幅し、シーケンスを行った。また、Le(-)のFucT-III遺伝子すべてにおいて、ATGから59番目のTのGへの変異が認められた。約半数のLe(-)のFucT-III遺伝子においては、508番目のGがAに変異し、新しく PvuII site が出現していた。この他にも、いくつかのアミノ酸の置換を伴う点突然変異が認められた。このLe(-)の個体由来のFucT-III遺伝子をCOS細胞において発現させ、活性を測定したところ、 α 1-3FucT, α 1-4FucT 活性共に、完全に不活性化されていた。結論として、Le(-)の個体のFucT-III遺伝子は、1アミノ酸残基の置換により、その遺伝子が不活性化されることが判明した (文献1)。

「研究の考察」

F9細胞での分化誘導時における β 1-4GTのmRNAの増量は、転写後の機構によりmRNAの安定性が増すことによる蓄積の結果であることが判明した (論文投稿中)。細胞の分化により、mRNAを消化する因子が減少してくるか、あるいは安定化する因子が発現してくるか、のどちらかであろう。 β 1-4GTのmRNAの3'非翻訳領域は、2.8kbもありきわめて長いものの一つである。このことも、転写後の安定性の影響を受けやすい原因の一つと考えられる。3'非翻訳領域の機能について、研究の対象にすることを計画中である。今後、他の糖転移酵素遺伝子の発現機構についても同様の機構が発見されてくる可能性が強い。F9細胞におけるSSEA-1抗原と β 1-4GT量の逆相関関係は、一見、矛盾しているように思えるが、可能性として次のようなことが考えられた。1) β 1-4GTはあくまで基本骨格を合成する酵素であり、そのポリ-N-アセチルラクタミン骨格の長さを決定しているのは、 β 1-4GTではなく、 β 1-3GnTである可能性がある。2) SSEA-1抗原エピトープは α 1-3Fucが転移されて、はじめて抗体により認識される。したがって、SSEA-1抗原量と挙動を共にするのは α 1-3FucTである。実際に α 1-3FucT活

性を測定したところ、SSEA-1抗原の変化ときわめてよく一致した。3) この β 1-4GTは、F9細胞では短鎖のアスパラギン結合型糖鎖を合成するが、*in vivo*では、ポリ-N-アセチルラクトサミンは合成していないかも知れない。*in vitro*で合成することは、我々の研究により証明されたけれども(文献2)。この問題はまだ未解決のまま残された。

NT2細胞においては、SSEA-1抗原と β 1-4GT量は一致した相関関係を示した。F9細胞との比較から、分化段階の異なる細胞においては、 β 1-4GT遺伝子の発現調節機構が異なっているらしい、との示唆が得られた。NT2細胞におけるmRNAの増量は、転写活性の増強によるものかも知れない、との予備データの元に、現在解析を計画中である。

初期発生時にSSEA-1抗原を合成する α 1-3 FucT遺伝子はどれか、という疑問については未だ解決されていない。各 α 1-3 FucT遺伝子について、さらに詳細な解析が必要とされると同時に、未知の α 1-3 FucT遺伝子のクローニングをも試みている。少なくとも、Le(-)の個体においてはFucT III遺伝子のゲノムそのものが不活性化されていることより、これが初期発生時のSSEA-1抗原合成に関与する可能性は否定された。

「研究業績」

1. Nishihara, S., Yazawa, S., Iwasaki, H., Nakazato, M., Kudo, T., Ando, T. and Narimatsu, H. : α (1-3/1-4)fucosyltransferase(FucT-III) gene is inactivated by a single amino acid substitution in Lewis histo-blood type negative individuals. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 196, 624-631(1993).
2. Nakazawa, K., Furukawa, K., Narimatsu, H. and Kobata, A. : Kinetic study of human β 1-4galactosyltransferase expressed in E.coli. *J. Biochem.*, 113, 747-753(1993).
3. Nishihara, S., Nakazato, M., Kudo, T., Kimura, H., Ando, T. and Narimatsu, H.: Human α -1,3fucosyltransferase(FucT VI) gene is located at only 13kb 3' to the Lewis type fucosyltransferase(FucT-III)gene on chromosome 19. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 190, 1, 42-44(1993).
4. Uejima, T., Uemura, M., Nozawa, S. & Narimatsu, H. : Complementary DNA cloning for galactosyltransferase associated with tumor and determination of antigenic epitopes recognized by specific monoclonal antibodies. *Cancer Res.*, 52, 6158-6163(1992).
5. Uemura, M., Sakaguchi, T., Nozawa, S. & Narimatsu, H. : Mouse monoclonal antibodies which recognize a human β 1-4galactosyltransferase associated with tumor in body fluids. *Cancer Res.*, 52, 6153-6157(1992).
6. Nakazawa, K., Furukawa, K., Kobata, A. and Narimatsu, H. : Characterization of a murine β 1-4galactosyltransferase expressed in COS-1 cells. *Eur. J. Biochem.*, 196,

363-368(1991)

7. 成松 久：ガラクトース転移酵素とフコース転移酵素、細胞工学、12、702-711 (1993)
8. 成松 久：糖転移酵素群の遺伝子クローニング Annual Review 細胞生物学 1993、107-123 (1992)、中外医学社。
9. 成松 久：真核生物の糖鎖合成に関わる糖転移酵素遺伝子群、医学生物学の新しい展開、加藤延夫編、63-79 (1993)、菜根出版。
10. 成松 久：生体成分糖鎖構造の分子生物学 日本臨床、50、2783-2795、1992。
11. 植嶋 孝夫、植村盛人、成松 久：癌関連ガラクトース転移酵素 (GAT) のcDNAクローニング 蛋白質・核酸・酵素、37、1683-1688 (1992)。
12. 成松 久：分子生物学による糖鎖工学 生物物理化学、35、427-433 (1991)。
13. 成松 久：糖転移酵素の遺伝情報 BIOmedica、6 (8)、756-763 (1991)。

糖脂質糖鎖発現に関する発現制御因子の解析

鈴木明身

東京都臨床医学総合研究所 生体膜研究部門

[目的]

糖鎖を介する認識が生物現象の一部で重要な役割をはたすことが明らかにされてきている。生物が糖鎖を認識に使うことの利点は、少ない構成要素で極めて多くの構造を作り出すことができる糖鎖の構造特性にある。この糖鎖の特性を生物が利用するためには、どの糖鎖を、どの部位で、どの時期に発現するか、制御する必要があるが、これまでに行なわれてきた広範な糖鎖の構造解析から、生物は精緻な糖鎖の発現制御を行なっていることが示されている。即ち、糖鎖の生物活性を発現させるための根本は糖鎖の発現制御にあるとすることができる。しかし、制御機構は単純でない。一つの糖鎖発現にも複数の遺伝子一次産物が関与する。遺伝子による直接の制御に加えて、翻訳後修飾、複数の酵素による競合も問題になる。糖鎖発現制御機構は多くの因子の関与によって作り上げられている複合体である。複合体の実体はほとんど明らかになっていない。そこで、制御機構の解明を目標にして解析を行なった。機構の骨格を形成するのは遺伝子に直接規定される因子であると考えることができる。そこで、まずこの骨格を明らかにするために、糖鎖の多型を基に、遺伝学解析法を使って解析を行う事とした。これまでに、我々の研究室ではマウスの糖鎖発現制御遺伝子を7個同定し、現在そのうちの3個について遺伝子自体の解析が進行している。大変興味深いことに、これらの多型を基に同定された糖鎖遺伝子（糖鎖発現制御遺伝子を糖鎖遺伝子と呼ぶことにする）のいくつかは、糖転移酵素の転写のレベルで働く可能性が示めされ始めた。ここでは、*Gsl-5*糖鎖遺伝子による発現制御、遺伝子の実体の解析について報告する。

*Gsl-5*糖鎖遺伝子はマウス腎臓の糖脂質(GL-Y, Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-6 (Gal β 1-3)GalNAc β 1-3Gal α 1-4Gal β 1-4Glc β 1-Cer)の発現を制御する遺伝子として同定された。GL-Yの発現を欠くDBA/2マウスは糖脂質(GL-X, Gal β 1-3GalNAc β 1-3Gal α 1-4Gal β 1-4Glc β 1-Cer)をGL-Yとほぼ同じ量発現することから、DBA/2の欠損はGL-XにGlcNAc β 1-6を転移する酵素活性にある事が考えられ、酵素活性の測定でそのことが確認された。即ち*Gsl-5*糖鎖遺伝子は β -1,6-GlcNAc転移酵素活性を制御することによりGL-Yの発現を制御していることが証明された。そこで、*Gsl-5*糖鎖遺伝子の実体を探るために、 β -1,6-GlcNAc転移酵素の精製を行なった。

[方法]

マウス腎臓から常法に従ってミクロソーム画分を得た。Triton X-100で可溶化し、

105,000 x gで1時間遠心して上清を可溶性酵素源とした。これを、CM-Sepharoseカラムにかけ、非結合部分を除いた後、酵素活性を300mMの食塩で溶出した。この画分を、30 mM食塩濃度に調製しUDP-hexanolamineカラムにかけ、300mM食塩で溶出した。この画分の食塩濃度を30 mMに調製後、再度UDP-hexanolamineカラムにかけ、1mM UDPで活性を溶出した。この画分をGg4Ose-Aminocellulofineカラムにかけ、0.5mM Gg4Oseで活性を溶出した。

酵素活性の測定は、GL-X(9 µg), UDP-[³H]GlcNAc(50 nmol), Zwittergent 3-16(30 µg), EDTA(1 mM), CDP-choline(250 nmol), 100 mM sodium cacodylate buffer (pH 6.4)で酵素存在下に37°Cで反応させ、糖脂質への放射活性の転移をSep-Pak C16を使って測定した。ミクロソーム画分を酵素源とした時、GlcNAcがGL-XのGalNAcにβ1-6結合で導入されていることを¹H-NMRとメチル化分析により既に確認している。

[結果]

β-1,6-GlcNAc転移酵素は下の表に示すように、腎臓のミクロソーム画分から約1万倍に精製された。精製標品で得られた比活性26.15µmol/min/mg proteinは、これまでに精製され、部分アミノ酸配列が報告されている糖転移酵素と比較して、充分高いものである。この精製の過程で、重要な段階はUDP-hexanolamineカラムからUDPで酵素活性が特異的に溶出できたこと、Gg4Oseを非動化したGg4Ose-Aminocellulofineカラムからオリゴ糖Gg4Oseで溶出できたことである。酵素は後者のカラムには、UDPの存在下に初めて結合した点も重要である。

| | Total Activity | Total Protein | Specific Activity | Yield | purification |
|--------------------------------------|--------------------|---------------------|-------------------|-------|--------------|
| | units | mg | units/mg | % | fold |
| microsomal fr. | 4.337 | 1820 | 0.0024 | 100 | 1 |
| Solubilized | 1.853 ^b | 1898 | 0.0010 | | |
| CM-Sepharose | 2.380 | 87.5 | 0.0272 | 55 | 11 |
| UDP-hexanolamine-Sepharose(NaCl) | 0.602 | 1.3 ^a | 0.463 | 14 | 193 |
| UDP-Hexanolamine Sepharose(UDP) | 0.323 | 0.21 ^a | 1.54 | 7.5 | 642 |
| Gg ₄ Ose-Aminocellulofine | 0.068 | 0.0026 ^a | 26.15 | 1.6 | 10896 |

Results are based on a preparation of the enzyme from 100 g of mouse kidney.

a) Values are determined by amino acid analysis.

b) It could not indicate true activity since Triton X-1100 inhibits GNT activity.

精製された酵素はSDS-PAGEで約50 kDaの単一バンドとして検出された。一次元でIEFあるいはnative-PAGEで分離し、ゲルをスライスして活性を測定し、同時に作成した別のゲルを二次元目の分析であるSDS-PAGEで分離し、蛋白バンドを解析した。この分析でも50 kDaのバンドが目的とする β -1,6-GlcNAc転移酵素である事が確認された。SDS-PAGE上のバンドをlysylendopeptidaseで処理し、得られるペプチドのアミノ酸配列を解析していただいた（理研瀧尾博士との共同研究）。その結果、得られた4ペプチド35残基分の配列には、既にFukudaらが報告しているヒトのcore 2 GlcNAc transferase (core 2 GnT)の配列と80%のホモロジーが存在した。

精製酵素は基質として、糖脂質ではGL-X, Gg4Cerを使ったが、GM1, Gb4Cer, Lc3Cer, nLc4Cerは使わなかった。即ち、I構造を作る酵素ではないと結論できる。オリゴ糖ではGal β 1-3GalNAc α 1-p-nitrophenol, Gal β 1-3GalNAc β 1-benzyl（基督教大吉野博士から恵与）の両者が基質となり、GlcNAc β 1-3GalNAc α 1-p-nitrophenylは基質とならなかった。これらの結果はGal-GalNAcのGalNAcが α 結合でも β 結合でも良いことを示しており、本酵素がcore 2 GnTと良く似た基質特異性を持つことを示している。

[考察]

*Gsl-5*糖鎖遺伝子は β -1,6-GlcNAc転移酵素活性発現を制御することによりGL-XからGlcNAc β 1-6を介して伸長する糖鎖の発現制御を行なっている。この酵素は基質特異性、蛋白質の一次構造上既にクローニングされているヒトのcore 2 GnTと極めて類似することが明らかになってきた。これまでのところ、この二つの酵素が異なる蛋白質である可能性を積極的に支持する結果は得られていない。マウスの酵素の一次構造がcDNAのクローニングにより明らかにされ、マウスのcore 2 GnTの塩基配列と比較されれば、結論が導かれる。一方、興味深いことに、ヒトのcore 2 GnTの遺伝子座は既にFukudaらによってヒト9q21にマップされている。我々も既に*Gsl-5*遺伝子座をマウスの第19染色体動源体から13cMほどの位置にマップしている。ヒトの9qとマウスの19染色体中央から動源体側にはsynteny (linkage conservation)が存在し、この点からも、二つの酵素は極めて近い関係にあると考えられる。

もし、二つが同じ酵素だとすると、DBA/2マウスの本酵素活性発現欠損は何を意味するか、即ち、糖蛋白糖鎖の変異も存在するのか、もし存在するなら、機能の変異は生じていないのかが問題になる。同時に、DBA/2マウスの*Gsl-5*遺伝子の変異は塩基配列のどこにあるのか大変興味深い。もし、異なる酵素だとすると、糖転移酵素の遺伝子進化、増殖の観点から興味深い。

現在、得られたアミノ酸配列を使ってcDNAのクローニングを進めており、DBA/2における*Gsl-5*遺伝子の変異の実体が明かにされる事を期待している。これらの解析から、これまでに予測されていない発現制御の機序が明かにされる可能性もあると考えている。

本研究は生体膜研究部門関根美知子研究員によって行なわれた。

[業績]

1. Kono, M., Sekine, M., Nakamura, K., Hashimoto, Y., Seyama, Y., Yamakawa, T. and Suzuki, A.: Two pathways for GM2(NeuGc) expression in mice: Genetic analysis. *J. Biochem.* 109, 132-136 (1991)
2. Suzuki, M., Yamakawa, T. and Suzuki, A.: A micro method involving micro high-performance liquid chromatography-mass spectrometry for the structural characterization of neutral glycosphingolipids and monosialogangliosides. *J. Biochem.* 109, 503-506 (1991)
3. Kozutsumi, Y., Kawano, T., Kawasaki, H., Suzuki, K., Yamakawa, T. and Suzuki, A.: Reconstitution of CMP-N-acetylneuraminic acid hydroxylation activity using a mouse liver cytosol fraction and soluble cytochrome b5 purified from horse erythrocytes. *J. Biochem.* 110, 429-435 (1991)
4. Nakamura, K., Suzuki, M., Taya, C., Inagaki, F., Yamakawa, T. and Suzuki, A.: A sialidase-susceptible ganglioside, IV³ α (NeuGc α 2-8NeuGc)-Gg4Cer, is a major disialoganglioside in WHT/Ht mouse thymoma and thymocytes. *J. Biochem.* 110, 832-841 (1991)
5. Suzuki, A. and Yamakawa, T.: Gangliosides. *Encyclopedia of Human Biology* vol.3, 725-735 (1991), Academic Press
6. Hamanaka, S., Takemoto, T., Hamanaka, Y., Asagami, C., Suzuki, M., Suzuki, A. and Otsuka, F.: Structure determination of glycosphingolipids of cultured human keratinocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 1167, 1-8 (1993)
7. Kawano, T., Kozutsumi, Y., Takematsu, H., Kawasaki, T. and Suzuki, A.: Regulation of biosynthesis of N-glycolylneuraminic acid-containing glycoconjugates: Characterization of factors required for NADH-dependent cytidine 5' monophosphate-N-acetylneuraminic acid hydroxylation. *Glycoconjugate J.* 10, 109-115 (1993)
8. Hashimoto, Y., Sekine, M., Iwasaki, K. and Suzuki, A.: Purification and characterization of UDP-N-acetylgalactosaminyltransferase from mouse liver. *J. Biol. Chem.* 268, 25857-25864 (1993)
9. Kawano, T., Kozutsumi, Y., Kawasaki, T. and Suzuki, A.: Biosynthesis of N-glycolylneuraminic acid-containing glycoconjugates: Purification of the key enzyme of the cytidine monophosphate-N-acetylneuraminic acid hydroxylation system. *J. Biol. Chem.* (1994) in press

糖脂質糖鎖発現の分子制御機構の解析

永井克孝（東京都臨床医学総合研究所）

【研究目的】 糖脂質や糖たんぱく質などの複合糖質には数種の糖より構成される特定の配列からなる糖鎖が付加している。興味あることに、これらの糖鎖は、発生や分化さらに癌化によって劇的に変化することが知られており、糖鎖とこれら基本的な生物現象との関連を予想させる。私達は、このような糖鎖の変化がどのような機構によって起こり、その糖鎖変化がどのように細胞の発生や分化とかかわるのかを明らかにすることを目的とし、(1)ラット肝細胞の細胞接着および増殖制御における糖鎖の役割、(2)生理活性を持つガングリオシドの合成に直接関与するシアル酸転移酵素の発現調節を研究課題としてとりあげた。

【研究成果】

(1) ラット初代培養肝細胞の増殖抑制の解析：通常、静止期にある肝臓は、高度に分化しその臓器としての機能を有している。しかしながら、一度肝臓に障害が引き起こされると（例えば、外科的肝切除、肝癌、肝炎、胆管結紮など）肝臓細胞は、増殖期に移行することが知られている。そこでこのような肝臓細胞の増殖制御や機能分化に及ぼす細胞間接触の関与について解析した。その結果、静止期にある肝臓細胞の増殖期への移行は細胞間接着により抑制され（図1）、この抑制は培養肝細胞に細胞膜の添加することにより *in vitro* で再現でき（図2）、この細胞間接着には肝細胞膜表面糖鎖が関与することを明かにした。つぎに、蛍光標識遊離肝細胞を用いて、糖鎖が介在する細胞間接着のリガンド糖鎖特異性、肝切除により惹起される増殖期肝細胞にお

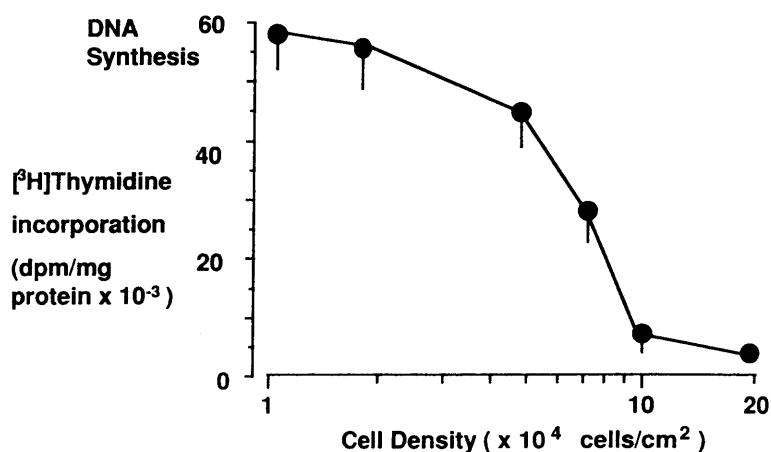


図1 ラット肝細胞の増殖の細胞密度依存性

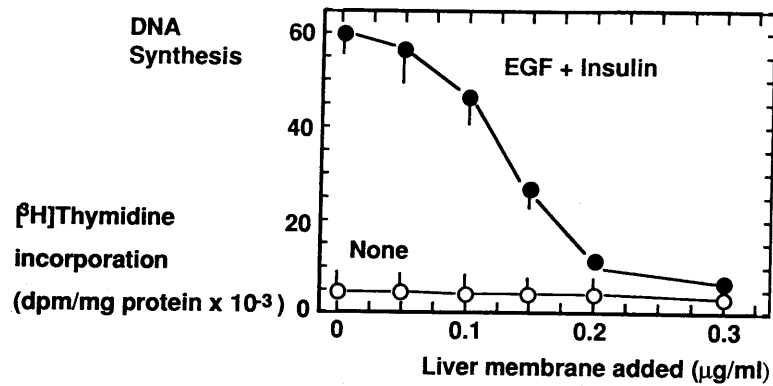


図2 細胞膜添加によるラット肝細胞の増殖抑制

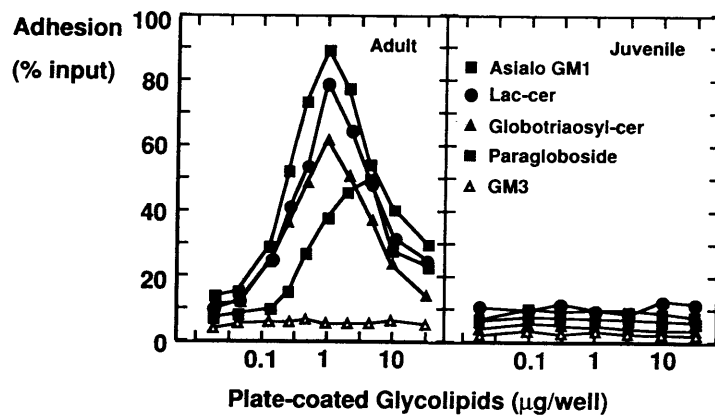


図3 糖脂質に対するラット肝細胞の接着

ける細胞接着について解析した。成熟ラットの肝細胞は、成熟ラットの肝細胞に非常に強く接着した。ところがβ-galactosidaseおよびglycopeptidase F処理肝細胞膜に対しては、ほとんど接着しなかった。このことから、成熟ラット肝細胞は、N-結合性糖鎖の末端β-galactosideを介して同種肝細胞と接着していることが示唆された。

そこで肝細胞接着の糖鎖特異性を明らかにする目的で、種々の糖たんぱく質、糖鎖構造既知の糖脂質との接着性を調べた。その結果、末端β-galactoseを有する asialofetuin、asialo GM1、lactosyl ceramide、paragloboside、globo-CTHと成熟ラットの肝細胞は接着した。末端β-galactoseがシアリル化されたfetuinやGM3とはほとんど接着しなかった(図3)。以上の結果は、成熟ラットの肝細胞が、結合位およびアノマーに

関係なく糖鎖非還元性末端galactoseを認識していることを示唆した。

肝細胞表面にはアシアロ糖たんぱく質受容体が存在し、血流中の複合糖質や赤血球の寿命に関与していることが知られている。そこで、肝細胞の接着にアシアロ糖たんぱく質受容体が関与するか否かを調べるために二価イオンの効果を調べた。その結果、成熟ラットの肝細胞の接着は成熟ラット肝細胞膜に対して、Ca²⁺が存在しなくとも接着し、Mg²⁺の存在が必須であることがわかった。さらに、肝細胞表面に強く発現しているアシアロ糖たんぱく質受容体に対する抗血清を成熟肝細胞に処理しても、肝細胞の接着には影響を及ぼさなかった。従って、肝細胞間の接着には、いわゆるC型レクチンが関与していないことが示唆された。

次に、増殖期における細胞間接着について検討した。増殖期の肝細胞として、70%肝切除後の遊離肝細胞を使用し、asialo GM1、lactosylceramideに対する接着性を評価した。その結果、肝切除後24時間経過するとasialo GM1、lactosylceramideに対する接着性が減弱した。肝切除後24時間程度で肝細胞は細胞周期上のS期に移行することが知られていることから、末端b-galactosideに対する接着性が細胞周期と相関することが示唆された(図4)。

以上の結果から、肝細胞膜の表層の糖鎖末端b-galactosideが肝細胞間接着に関与し、さらにこの反応が細胞周期や増殖、分化により影響を受けることがわかった。現在、肝細胞膜より、関連するガラクトース結合蛋白質を精製している。

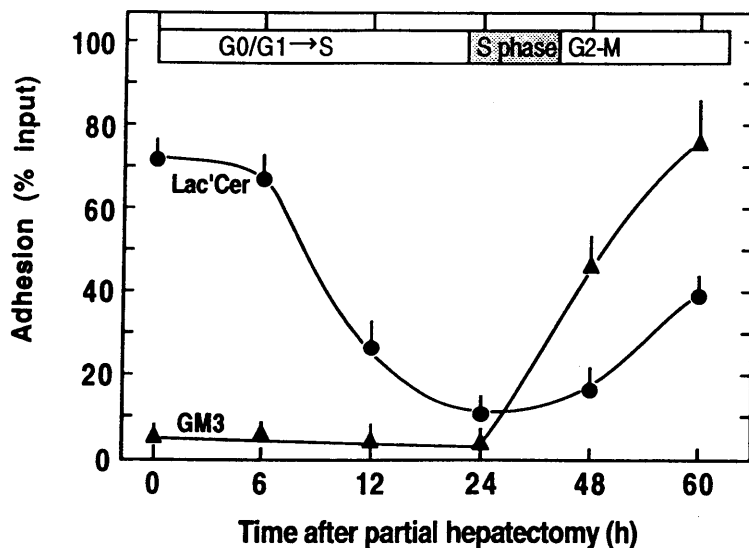


図4 肝切除後の肝細胞の糖脂質に対する接着性の変化

(2) 生理活性を持つガングリオシドの合成に直接関与するシアル酸転移酵素の発現調節：

ガングリオシド糖鎖の機能を解析する上でそれらの生合成に関与する糖転移酵素を理解することは決定的に重要である。しかしながら、これまで報告されている糖転移酵素の活性測定法は極めて煩雑であるために、その解析は容易ではなかった。そこで今回、逆相薄層クロマトグラフィーとイメージアナライザーを組み合わせた高感度かつ簡便な活性測定法を開発した。その結果、これまで困難であった細胞粗抽出液中の酵素活性を容易に測定することが可能となった(Ref.1)。

つぎに、ラット肝臓ゴルジ装置膜を用いてガングリオシド合成経路を調べたところ、新規なガングリオシドであるGD1 α を合成する経路を見いだした(Ref.2)。単離ゴルジ装置を用いて各種糖転移酵素活性を調べた結果、GD1 α がasialo-GM1 \rightarrow GM1b \rightarrow GD1 α の経路(α 経路)を経て生合成されることを証明した。GD1 α は脳の微量ガングリオシドとして存在することが報告されており、コリン作動性ニューロンの特異抗原として注目されている。さらに、ある種のラット腹水肝がん細胞でこのガングリオシドが特徴的に出現し、興味深いことに細胞接着分子のリガンドとして機能すると考えられている。正常肝臓組織におけるGD1 α の発現の抑制はアシアロガングリオシド合成経路の遮断によるとものと推定され、細胞がん化に関連するなんらかの機構によりアシアロガングリオシド合成経路が活性化されてGD1 α が出現すると考えられた。

【論文発表と口頭発表】

- (1) Kasahara, K., Guo, L., Nagai, Y., Sanai, Y. :Enzymatic assay of glycosphingolipid sialyltransferase using reverse-phase thin-layer chromatography. Anal. Biochem. in press.
- (2) Hidari, K., Kawashima, I., Tai, T., Inagaki, F., Nagai, F., Sanai, Y. : In vitro synthesis of disialoganglioside (GD1 α) from asialo-GM1 using sialyltransferases in rat liver Golgi vesicles. Eur. J. Biochem. in press.
- (3) Kajiyama, Y., Sanai, Y., Ui, M., Nagai, Y.:Possible involvment of β -galactoside in hepatocyte proliferation. Glycoconjugate. J., 10, 243-244, 1993.
- (4) 山岡和子、佐内 豊、永井克孝： β ガラクトシド結合活性を持つ腫瘍化増殖因子(TGF γ 2)について 第15回糖質シンポジウム、1993年7月29日、仙台
- (5) 笠原浩二、郭雷、永井克孝、佐内 豊：簡便な糖脂質シアル酸転移酵素活性測定法の開発 第66回日本生化学会大会、1993年10月4日、東京
- (6) 梶山泰生、永井克孝、佐内 豊：肝細胞接着における β ガラクトースの関与 第66回日本生化学会大会、1993年10月4日、東京

異染性脳白質変性症におけるアリルスルファターゼA遺伝子の変異

牧田 章、 本家 孝一

北海道大学医学部癌研究施設生化学部門

【目的】

異染性脳白質変性症 (metachromatic leukodystrophy; MLD) は、リソゾーム水解酵素のひとつであるアリルスルファターゼA (ASA) の欠損により、その基質である硫酸化糖脂質が脳ミエリンや腎臓などに蓄積をきたす脂質蓄積症で、常染色体劣性遺伝形式をとる。発症年齢、臨床症状の重症度から、乳幼児型、若年型、成人型の3つの臨床型に分類される。この臨床的表現型の多様性は遺伝型の多様性で説明されるが、MLDにおけるASA遺伝子の変異および変異酵素の分子解析の報告は少なく、遺伝型と表現型の相関関係は十分解明されているとは言い難い。また、同一遺伝病でも人種や地域により遺伝子変異の型が異なり、本邦での遺伝子変異の型を調べることは遺伝子診断上価値がある。本研究では、本邦における成人型MLD患者に新しいASA遺伝子の変異を見だし、変異ASA酵素蛋白質の運命を調べた。

【方法】

患者は女性で、33歳時に発症し、白血球のASA活性が健常人の6%と低下していたことから成人型MLDと診断された。患者組織のASA蛋白量を、抗ヒト胎盤ASAウサギIgGを用いた酵素免疫測定法で定量した。患者ゲノムDNAを鋳型として、ポリメラーゼチェーン反応 (PCR) によりASA遺伝子を2分割して増幅した。PCR産物をM13ファージにサブクローン化し、ジデオキシ法によりヌクレオチド配列解析を行った。患者ASA遺伝子の突然変異部位を含む領域をPCRで増幅し、産物をHpaIIで消化して制限酵素切断片長多型性 (RFLP) を解析した。発現ベクターに組み込まれた野生型ASA cDNA (pcD2-ASA8) に、部位特異的突然変異を誘発し、変異ASA cDNA (pcD2-ASA8M) を作製し、COS-1細胞にトランスフェクトしてASA活性の発現を調べた。さらに、ASA蛋白の発現を抗ヒト胎盤ASA抗体を用いたウエスタンブロットングで解析した。転写レベルは逆転写反応-PCR (RT-PCR)

法で調べた。

【結果】

患者肝臓ホモジェネートにおけるASA蛋白量は正常対照の10%以下で、活性低下は蛋白量低下に基づくと考えられた。ASA遺伝子は全長約 3 kbpと比較的短く、8つのエクソンから成る。PCRクローニングの技法を用いて、患者ASA遺伝子の全コーディング領域とエクソン、イントロン接合部位のヌクレオチド配列を調べ、正常ASA遺伝子と比較検討した。その結果、エクソン2にグアニンからアデニンへの塩基置換が見い出された。これにより122番目のグリシンがセリンにアミノ酸置換が起こることが推定された。制限酵素HpaIIによるRFLP解析により、見い出された変異がPCRクローニングによる2次産物ではなく、患者ゲノムDNA上に存在することを確認するとともに、患者ASA遺伝子はその変異に関してヘテロ接合体であることがわかった。同様の結果がダイレクトシーケンシング法によっても得られた。次に、この変異をもつcDNAを合成し、COS細胞で発現させたところ、mRNA量は対照と差がないにも拘わらず、酵素活性は発現されず（図1）、ウエスタンブロッティングで成熟型ASA酵素蛋白質は検出されなかった。従って、変異酵素蛋白質は合成後速やかに分解されてしまうとみられる。

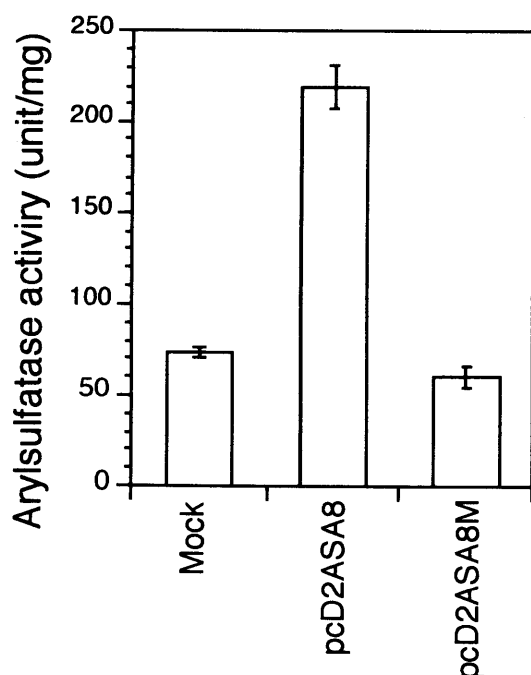


図1. 変異ASAcDNAの発現実験

pcD2-ASA8：野生型ASAcDNA、 pcD2-ASA8M：変異ASAcDNA

【考察】

本研究により、成人型MLDの原因となる新しい点突然変異がエクソン2に見い出された。HpaIIによるRFLP解析やダイレクトシーケンシングで明らかとなったように、この変異は対立遺伝子の一方にのみ見られ、本疾患が劣性遺伝形式をとることから、他方のASA遺伝子には未同定の他の変異が存在するはずである。これまで、MLDの原因となる数種の突然変異が見い出されているが、点突然変異はエクソン2に集積している。本研究で見い出された変異もエクソン2の点突然変異であった。ヒトのASA、ASB、ステロイドスルファターゼ(ASC)、ウニのアリルスルファターゼの間には有意な相同性があり、特にエクソン2でコードされるアミノ酸配列には高い相同性がある。このことから、エクソン2でコードされるドメインがASA酵素蛋白の構造を安定に保ち、活性を発現するために重要な領域と示唆される。

我々はこれまで、正常のASAやASBの成熟過程(翻訳後修飾)でのペプチド切断点を解析してきたが、MLD酵素の変異点とは一致しなかった。成熟過程の切断は特定の部位で起こり、酵素蛋白質の保持に働くと考えられるのに対し、MLDの変異はもっとランダムな切断である可能性が高い。変異酵素の分解に働くプロテアーゼは不明であるが、アミノ酸1個の置換による構造の違いにより、このようなプロテアーゼの標的になりやすくなるという現象は、他のリソゾーム蓄積症における変異酵素でも共通の現象かもしれない。

【業績】

1. Fujii, T., Kobayashi, T., Honke, K., Gasa, S., Ishikawa, M., Shimizu, T., & Makita, A.: Proteolytic processing of human lysosomal arylsulfatase A. Biochim. Biophys. Acta. 1122, 93-98 (1992).
2. Kobayashi, T., Honke, K., Jin, T., Gasa, S., Miyazaki, T., & Makita, A.: Components and proteolytic processing sites of arylsulfatase B from human placenta. Biochim. Biophys. Acta 1159, 243-247 (1992).
3. Kobayashi, T., Honke, K., Kamio, K., Sakakibara, N., Gasa, S., Miyao, N., Tsukamoto, T., Ishizuka, I., Miyazaki, T., & Makita, A.: Sulfolipids and glycolipid sulfotransferase activities in human renal cell carcinoma cells. Brit. J. Cancer 67, 76-80 (1993)

4. Kobayashi, T., Honke, K., Gasa, S., Sugiura, M., Miyazaki, T., Ishizuka, I., & Makita, A.: Involvement of protein kinase C in the regulation of glycolipid sulfotransferase activity levels in renal cell carcinoma cells. Cancer Res., 53, 2484-2489 (1993)
5. Miyagishima, T., Gasa, S., Honke, K., Miyazaki, T., & Makita, A.: Preparation of a photoaffinity probe for the Man6P/IGF-II receptor. Biol. Chem. Hoppe-Seyler, 374, 281-286 (1993)
6. Honke, K., Kobayashi, T., Fujii, T., Gasa, S., Xu, M., Takamaru, Y., Kondo, R., Tsuji, S., & Makita, A.: An adult-type metachromatic leukodystrophy caused by substitution of serine for glycine-122 of arylsulfatase A. Hum. Genet., 92, 451-456 (1993)
7. Kobayashi, T., Honke, K., Gasa, S., Kato, N., Miyazaki, T., & Makita, A.: Epidermal growth factor elevates the activity levels of glycolipid sulfotransferase in renal cell carcinoma cells. Int. J. Cancer, 55, 448-452 (1993)
8. Kobayashi, T., Honke, K., Gasa, S., Imai, S., Tanaka, J., Miyazaki, T., & Makita, A.: Regulation of the activity levels of glycolipid sulfotransferases by transforming growth factor- α in renal cell carcinoma cells. Cancer Res., 53, 5638-5642 (1993)
9. Kobayashi, T., Honke, K., Gasa, S., Miyazaki, T., Tajima, H., Matsumoto, K., Nakamura, T., & Makita, A.: Hepatocyte growth factor elevates the activity levels of glycolipid sulfotransferase in renal cell carcinoma cells. Eur. J. Biochem., (1994) in press
10. Kobayashi, T., Honke, K., Kuramitsu, Y., Hosokawa, M., Miyazaki, T., Murata, J., Saiki, I., Ishizuka, I., & Makita, A.: Cell surface sulfoglycolipids are involved in the attachment of renal cancer cells to laminin. Int. J. Cancer, (1994) in press
11. Kobayashi, T., Honke, K., Miyazaki, T., Matsumoto, K., Nakamura, T., Ishizuka, I., & Makita, A.: Hepatocyte growth factor specifically binds to sulfoglycolipids. J. Biol. Chem., (1994) in press

エンド型グリコシダーゼの糖転移活性を用いたグリコサミノグリカン糖鎖の再構築

遠藤 正彦

弘前大学医学部第一生化学教室

[研究の目的]

現在の遺伝子工学のように糖鎖もまた人為的にコントロールできる技術の開発が求められている。このため本研究は、特にプロテオグリカンのグリコサミノグリカン糖鎖中の生理活性ドメイン構造を、人為的に構築することを目的としている。しかし、遺伝子工学のDNAに対するごとく、グリコサミノグリカン糖鎖を任意に切り出し、更に任意に再構築させ得るような酵素は見い出されていない。したがって、これらの酵素の発掘と同時に、既知の酵素の特性を最大限に生かす工夫が求められる。そこで本研究では、エンド型グリコシダーゼのもつ加水分解反応と、その逆反応としての糖転移反応を糖鎖再構築の手段として使用する方法について検討した。

[研究の方法]

酵素：市販のウシ精巢性ヒアルロニダーゼ（以下ヒアルロニダーゼと云う）を、イオン交換クロマトとゲルろ過により更に精製して用いた。

糖残基の供与体：ヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン4-硫酸、コンドロイチン6-硫酸、デルマトン硫酸、及び、それらのヒアルロニダーゼで部分消化産物より精製された二、四、六、八、十、十二糖のオリゴ糖を糖残基の供与体とした。

糖残基の受容体：前述のオリゴ糖を2-アミノピリジンによって還元末端側を蛍光標識（PA化）した。またウシ気管軟骨プロテオグリカンをプロナーゼ消化とエンド- β -キシロシダーゼにより消化した後PA化し、更にヒアルロニダーゼで消化して、ペプチドと糖鎖の橋渡し構造をもつPA化オリゴ糖GlcA-GalNAc-GlcA-Gal-Gal-Xyl-PAを調製した。

反応条件：酵素、受容体としてのPA化オリゴ糖、供与体としてのグリコサミノグリカンを0.1 M Tris-HCl緩衝液（pH 7.0）、37°C、1時間インキュベートした。

反応生成物の検索法：反応生成物はHPLC(Palpak Type S, 4.6 x 250 mm)で調べ、その糖鎖の配列の決定は、イオンスプレー型質量分析計で行った。

[研究の結果]

糖転移反応の至適条件 - 加水分解反応と糖転移反応の比較

酵素、受容体、供与体を、pHを変えた各種の緩衝液で1時間インキュベートし、受容体より伸長した糖鎖長の測定から糖転移活性を、また、ヒアルロン酸を基質

としてのオリゴ糖の生成から加水分解活性を比較した。

その結果、ヒアルロニダーゼの加水分解反応は従来の報告通り、0.1 M acetate buffer (pH 5.0)で0.15 M NaClを含む反応条件が至適であった。一方、ヒアルロニダーゼによる糖転移反応はNaClを全く含まない0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7.0)が至適であった。したがって、ヒアルロニダーゼによる加水分解反応と糖転移反応の至適条件が大きく異なっているため、糖転移反応をより優先的に進行させ得る条件が見い出された。

糖転移反応の受容体

糖転移反応としてグリコサミノグリカンは、ヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン4-硫酸、コンドロイチン6-硫酸のいずれもが受容体としての活性をもった。しかし、デルマトン硫酸は受容体とはなり得なかった。糖鎖長としては四糖以上のオリゴ糖がすべて受容体としての活性を有するが、PA化されたオリゴ糖としてはPA化六糖が最低糖鎖長であった(図1, c)。また、プロテオグリカンのペプチドと糖鎖の橋渡し部分由来の六糖・GlcA-GalNAc-GlcA-Gal-Gal-Xyl-PAも受容体活性を有していた。

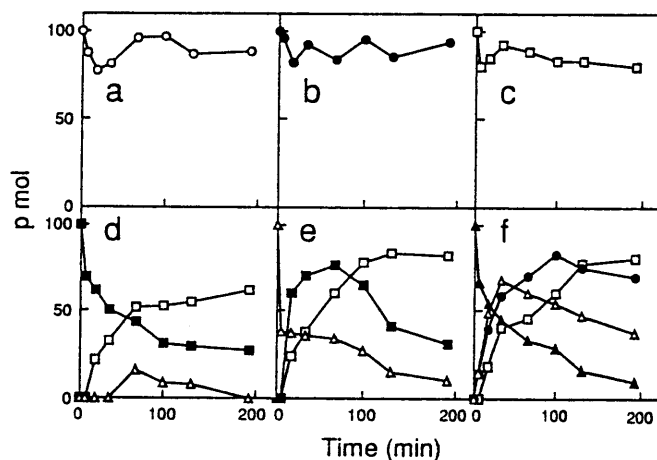


図1. PA化ヒアルロン酸オリゴ糖のヒアルロニダーゼ消化による時間的経過. a, PA化二糖(○); b, PA化四糖(●); c, PA化六糖(□); d, PA化八糖(■); e, PA化十糖(△); f, PA化十二糖(▲)をそれぞれ基質として加え、経時的に反応液中の反応生成物を質量分析計で分別測定した。

糖転移反応の供与体

糖転移反応の供与体としてはヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン4-硫酸、コンドロイチン6-硫酸いずれもが供与体となり得た。その供与体となり得る最低糖鎖長は六糖であった。しかし、デルマトン硫酸はヒアルロニダーゼで消化され得ても供与体とはなり得なかった。

糖の転移機序

ヒアルロン酸六糖をヒアルロニダーゼの加水分解反応の至適条件下でインキュベートすると、六糖の減少とともに四糖と二糖が反応液中に増加するが、インキュベーションの初期の段階に八糖の生じることが観察された。しかし、PA化六糖は加水分解されなかった(図1, c)。PA化八糖は低分子化されPA化六糖を生じるが、反応開始直後にPA化十糖を生じ、やがてこれが消失した(図1, d)。PA化ヒアルロン酸六糖を受容体、ヒアルロン酸オリゴ糖を供与体としてインキュベートする

と、PA化八糖、PA化十糖、PA化十二糖と順次伸長していくことが観察された。また、非還元末端にN-アセチルグルコサミンをもつヒアルロン酸五糖及び七糖を供与体としてインキュベートすると、七糖の非還元末端側の三糖が受容体に転移され、五糖からは転移されなかった(図2)。

以上の結果からヒアルロニダーゼによる糖転移反応は供与体の非還元末端から二糖(非還元末端がN-アセチルヘキサミンのときは三糖)単位で受容体の非還元末端に転移されることが知られた。

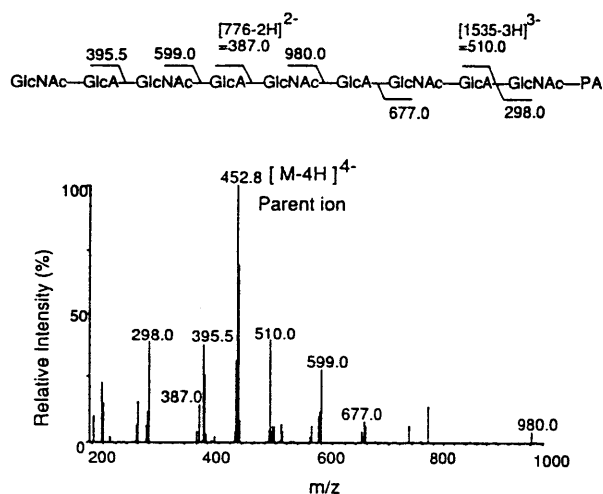


図2. ヒアルロニダーゼの糖転移反応によってPA化ヒアルロン酸六糖より形成されたPA化九糖の質量分析スペクトル。

糖鎖の伸長とハイブリット糖鎖の合成

PA化ヒアルロン酸六糖を受容体、高分子ヒアルロン酸を供与体として糖転移反応の至適条件下で37°C 1時間インキュベートすると、最高二十二糖までの伸長が観察された。また、種類の異なるグリコサミノグリカン糖鎖を受容体、または供与体とすると天然には存在していないハイブリット糖鎖が合成された。

非天然型ハイブリット糖鎖の生物活性

PA化オリゴ糖を受容体とした数種の非天然型ハイブリット糖鎖を合成した。これを細胞外マトリックスを構成する各種のタンパク質(コラーゲン、エラスチン、ラミニン等)をリガンドとしたアフィニティーカラムを作製し、これに対する結合性を調べた。しかし現在まで調べた限りでは、細胞外マトリックス構成成分に対して強いアフィニティーを示す非天然型ハイブリット糖鎖は見い出されなかった。しかしヒアルロン酸とコンドロイチン4-硫酸の非天然型ハイブリット糖鎖がフィブリノーゲンと結合することが見い出された。

[研究の考察]

本研究からエンド型酵素であるヒアルロニダーゼの糖転移反応について糖鎖転移の至適条件が定まり、その結果、糖鎖の二十数糖までの伸長も可能になった。現在は、デザインされた糖鎖を思いのまま構築する方法の確立に向かって研究が進められている。

[研究業績]

1. Takagaki, K., Nakamura, T., Kon, A., Tamura, S., and Endo, M.: Characterization of β -D-xyloside-induced glycosaminoglycans and oligosaccharides in cultured human skin fibroblasts. *J. Biochem.*, 109, 514-519 (1991).
2. Kon, A., Takagaki, K., Kawasaki, H., Nakamura, T., and Endo, M.: Application of 2-aminopyridine fluorescence labeling to glycosaminoglycans. *J. Biochem.*, 110, 132-135 (1991).
3. Okada, A., Harata, S., Takeda, Y., Nakamura, T., Takagaki, K., and Endo, M.: Age-related changes in proteoglycan from human yellow ligament. *Connect. Tissue*, 22, 157-158 (1991).
4. Nakamura, T., Takagaki, K., Kubo, K., Saito, T., Endo, M., Morisaki, N., Saito, N., Saito, Y., Mori, S., and Yoshida, S.: Hyaluronic acid synthesized by cultured skin fibroblasts derived from patients with Werner's syndrome. *Biochim. Biophys. Acta*, 1139, 84-90 (1992).
5. Endo, M., Takagaki, K., and Nakamura, T.: Endoglycosidases acting on the linkage region between the core protein and glycosaminoglycan chains of proteoglycans: Endo- β -glucuronidase, endo- β -xylosidase and endo- β -galactosidase. in *Handbook of Endoglycosidases and Amidases* (Eds. by Takahashi N. and Muramatsu T.), CRC Press (1992). pp 105-132.
6. 遠藤正彦、高垣啓一、中村敏也: プロテオグリカンの新しい糖鎖分解酵素蛋白質核酸酵素, 37, 2008-2012 (1992).
7. Takeda, Y., Harata, S., Takagaki, K., Narita, H., and Endo, M.: Characterization of glycosaminoglycans in ossified human yellow ligament. *Connect. Tissue*, 24, 109-114(1992).
8. Takagaki, T., Kojima, K., Majima, M., Nakamura, T., Kato, I., and Endo, M.: Ion-spray mass spectrometric analysis of glycosaminoglycan oligosaccharides. *Glycoconjugate J.*, 9, 174-179 (1992).

9. Takagaki, K., Nakamura, T., Takeda, Y., Daidouji, K., and Endo, M.: A new endo- β -galactosidase acting on the Gal β 1 \rightarrow 3Gal linkage of the proteoglycan linkage region. *J. Biol. Chem.*, 267, 18558-18563 (1992).
10. Yamasaki, T., Nakayama, F., Tamura, S., and Endo, M.: Characterization of mucin in the hepatic bile of patients with intrahepatic pigment stones. *J. Gastroentel. Hepat.*, 7, 36-41 (1992).
11. Yamasaki, T., Chijiiwa, K., and Endo, M.: Isolation of mucin from human hepatic bile and its induced effects on precipitation of cholesterol and calcium carbonate *in vitro*. *Dig. Dis. Sci.*, 38, 909-915 (1993).
12. Tanaka, A., Morikawa, A., Saito, Y., Tamura, S., Nakamura, T., Takagaki, K., Endo, M.: Simple measurement of glycosaminoglycan produced by cultured fibroblasts using 4-methylumbelliferyl β -D-xyloside. *J. Biochem. Biophys. Methods.* 26, 309-316 (1993).
13. Yoshihara, S., Sasaki, M., Kawasaki, H., Yokoyama, M., Endo, M., and Konn, M.: Enzymic determination of acidic glycoconjugates in human pancreatic juice. *Int. J. Pancreatol.*, 14, 219-225 (1993).
14. Kubo, K., Nakamura, T., Takagaki, K., Yoshida, Y., and Endo, M.: Depolymerization of hyaluronan by sonication. *Glycoconjugate J.*, 10, 435-439 (1993).
15. Okada, A., Harata, S., Takeda, Y., Nakamura, T., Takagaki, K., and Endo, M.: Age-related changes in proteoglycans of human ligamentum flavum. *Spin*, 18, 2261-2266 (1993).
16. Nakamura, T., Tanaka, K., Daidouji, K., Takagaki, K., Saito, Y., and Endo, M.: Serum hyaluronidase assay using fluorogenic hyaluronate as a substrate. *Connect. tissue*, in press.
17. Ikeya, H., Miyoshi, T., Nakamura, T., and Endo, M.: Hyaluronate degradation and synthesis by cultured fibroblasts derived from human knee articular synovial membranes of patients suffering from rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Connect. Tissue*, in press.

ニワトリCa⁺⁺依存性 α -マンノシダーゼの精製と基質特異性

長谷純宏

大阪大学理学部 化学教室

[研究の目的]

糖蛋白質の糖鎖の生理的な役割が注目されているが、その構造や分布は多様であり生体内でどのように生合成、プロセッシング、異化が調節されているか不明の部分が多い。アスパラギン結合糖鎖は粗面小胞体やゴルジ体で生合成され、糖鎖の異化はリソソームで行われていることが知られている。しかし、細胞内にはこれ以外にも、細胞質にマンノシダーゼが報告されている。これらのマンノシダーゼは基質特異性や酵素の性質の明らかにされていないものも多い。本研究では中性 α -1、2-マンノシダーゼをニワトリ輸卵管より調製し、その一般的な性質や基質特異性を調べた。

[研究の方法]

酵素活性の測定はMan₉GlcNAc₂-PAを基質に用いた(図1)。

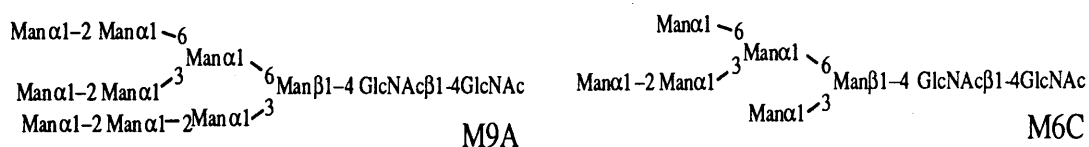


図1

反応後、生成物の一部をHPLCに注入し、マンノースが一残基加水分解されたMan₈GlcNAc₂-PAをHPLCで定量することにより酵素活性を測定した。

ピリジルアミノ化していない糖鎖を基質として用いた時は、反応混合物の一部をピリジルアミノ化し、ピリジルアミノ化糖鎖を同様にHPLCで定量した。ピリジルアミノ化糖鎖のサイズ分画HPLCは、TSKgel Amide-80を用いて、また逆相HPLCはCosmosil 5C18-Pを用いて行った。

[研究の結果]

中性 α -マンノシダーゼの精製：

ニワトリ輸卵管のマグナム部分をホモジナイズし5000 xgで遠心し、上清画分を粗酵素溶液とした。粗酵素溶液より飽和硫酸アンモニウム25%~55%の画分をとり、これをSephacryl S-200で分離した。酵素活性が検出された画分を、更にMono Q HR 5/5を用いて分離した。更にBio-Gel P-60、1-deoxymannojirimycin-AH Sepharose 4Bカラムによるアフィニティークロ

マトグラフィーにより精製した。酵素精製の各段階のまとめを表1に示した。

表1 中性 α -マンノシダーゼの精製のまとめ

| | Total activity (unit) | Total protein (mg) | Relative activity (unit/mg) | Purification fold | Yield (%) |
|-------------------------------|-----------------------|--------------------|-----------------------------|-------------------|-----------|
| 1. Crude solution | 4.9 | 1200 | 4.0 | 1.0 | 100 |
| 2. Ammonium sulfate (25%-55%) | 3.3 | 400 | 8.3 | 2.1 | 67 |
| 3. Sephacryl S-200 | 0.26 | 0.20 | 1300 | 330 | 5.4 |
| 4. Mono Q | 0.13 | 0.04 | 3300 | 830 | 2.7 |
| 5. Bio-Gel P-60 | 0.053 | 0.02 | 2700 | 680 | 1.1 |
| 6. Affinity chromatography | 0.040 | 0.01 | 4000 | 1000 | 0.8 |

精製した酵素はSDS-PAGEで調べた所、単一なバンドが得られた。酵素の分子量はSDS-PAGEより約42,000であった。これはBio-Gel P-60クロマトグラフィーによるゲルろ過よりの値と一致した。また酵素の至適pHは6.5であった。1 mMのEDTAにより失活したが、カルシウムイオンにより94%、マンガンイオンにより26%、コバルトイオンにより28%酵素活性が回復した。しかしマグネシウムイオンや亜鉛イオン、カドミウムイオンでは活性は回復しなかった。またプロセッシングに關与する酵素の阻害剤である1-デオキシマンノジリマイシンの5 μ Mで13%まで活性が阻害された。しかし、スワイソニン500 μ Mでも影響しなかった。

基質特異性の解析：

M9A-PAを用いて、反応生成物をHPLCで分析したところ、最終生成物としてM6C (図1) が得られた。次に種々のPA-糖鎖を用いてM9A-PAの初速度を1とした時の加水分解速度を調べた。その結果を図2に示す。その結果還元末端付近のN-アセチルグルコサミン残基が1モルのものと2モルのものでは、またピリジルアミノ化されていなくとも加水分解速度はほとんど変化しないことが分かった。

[研究の考察]

今回ニワトリ輸卵管より精製した酵素は、分子量42,000、至適pH 6.5でありM9A-PAより特異的にマンノース3残基を加水分解しM6C-PAを生成した。今回得られた酵素はその基質特異性や金属イオンの影響、至適pH、阻害剤の影響などよりSchweden, Bause (1989)がウシとブタより精製した

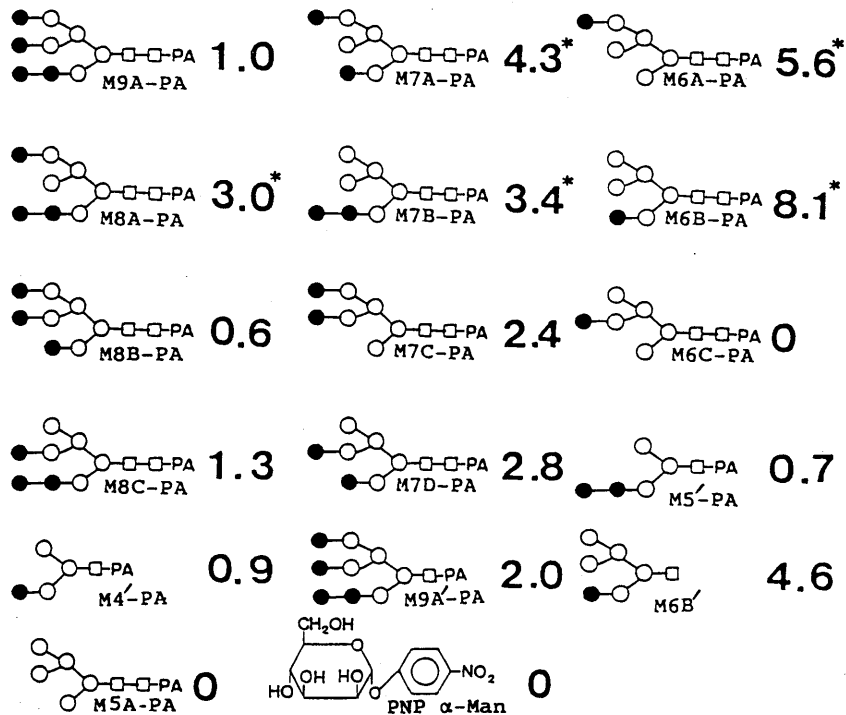


図2 精製した α -マンノシダーゼの相対加水分解初期速度。構造式の右に示した数字はM9A-PAに対する加水分解初期速度を1としたときの値。

Man₉-マンノシダーゼと類似のものである事が分かった。Man₉-マンノシダーゼはミクロゾーム画分の粗面小胞体に存在するプロセッシング酵素と推測されている。本酵素の加水分解中間体は、ニワトリのオボアルブミンに報告されている糖鎖に含まれており、本酵素によりプロセッシングされたとしても矛盾しない。しかし、本酵素が粗面小胞体に存在すると仮定すると、報告されているMan₈GlcNAc₂よりさらにプロセッシングが粗面小胞体で起こっていると考えられる。

[研究業績]

- 1) Toyota, J., Omichi, K., Fukase, K., Kusumoto, S., & Hase, S.: Identification of Trisaccharide Xyl α 1-3Xyl α 1-3Glc in Human Urine. *Biosci. Biotech. Biochem.*, in press.
- 2) Omichi K., & Hase, S.: Linkage Position Analysis of Pyridylamino-Disaccharides by HPLC of the Fluorogenic Smith Degradation Products. *J. Biochem.*, in press
- 3) Shimizu, H., Ochiai, K., Ikenaka, K., Mikoshiba, K., & Hase, S.:

Structure of N-linked Sugar Chains Expressed Mainly in Mouse Brain.
J. Biochem., 114, 334-338 (1993)

- 4) Tarutani, M., Norioka, N., Meqa, T., Hase, S., & Ikenaka, T.:
Structure of Sugar Chains of Hen Egg Yolk Riboflavin-Binding Protein.
J. Biochem., 113, 677-682 (1993)
- 5) Kuraya, N., Ochiai, K., Nishimura, H., Iwanaga, S., & Hase, S.:
Structural Analysis of O-linked Sugar Chains in Human Blood Clotting
Factor IX. *J. Biochem.*, 114, 763-765 (1993)
- 6) Hase, S., Hatanaka, K., Ochiai, K., and Shimizu, H.: Improved
Method for the Component Sugar Analysis of Glycoproteins by
Pyridylamino Sugars Purified with Immobilized Boronic Acid, *Biosci.*
Biotech. Biochem., 56, 1676-1677 (1992).
- 7) Kuraya, N., & Hase, S.: Release of O-Linked Sugar Chains from
Glycoproteins with Anhydrous Hydrazine and Pyridylation of the
Sugar Chains with Improved Reaction Conditions. *J. Biochem.*, 112,
122-126 (1992).
- 8) Hase, S.: Conversion of Pyridylamino Sugar Chains to 1-Amino-1-
Deoxy Derivatives, Intermediates for Tagging with Fluorescein and
Biotin. *J. Biochem.*, 112, 266-268 (1992).
- 9) Meqa, T., Oku, H., & Hase, S.: Characterization of Carbohydrate-
Binding Specificity of Concanavalin A by Competitive Binding of
Pyridylamino Sugar Chains. *J. Biochem.*, 111, 396-400 (1992).
- 10) Hase, S.: Pyridylation for Sensitive Analysis of Sugar Chains of
Glycoproteins. *Methods in Protein Sequence Analysis (Edited by K.*
Imahori and F. Sakiyama) pp 195 - 198 (1993) Plenum Press, New
York
- 11) Hase, S.: Analysis of Sugar Chains by Pyridylation.
Methods in Molecular Biology, 14, 69- 80 (1993)

鈴木 旺

愛知医科大学分子医科学研究所

[研究の目的]

ヒトをはじめ多くの動物細胞の細胞膜および細胞外マトリックスには、いろいろな種類のプロテオグリカン (PG) 分子が分布している。近年、遺伝子工学的手法によって各種PG分子のコア蛋白部分の構造が明らかになってきた。それらの成果は、それぞれのコア蛋白質に結合しているグリコサミノグリカン (GAG) 鎖の構造可変性、つまり各PG分子種はそれをつくる細胞がおかれている時間的、空間的環境に対応してGAG鎖の長さ、本数、糖鎖骨格、硫酸化パターンが変わるという特性を明らかにする結果となった。このような構造的特徴をもつGAG鎖の生理的意義の解明を目標として、1) 平滑筋細胞外マトリックスに存在するヘパラン硫酸 (HS) PGとbFGFの相互作用、および 2) コンドロイチン硫酸 (CS) PGの細胞接着抑制活性に果たすCS鎖の役割について解析を行った。

[研究の方法]

bFGF-SepharoseはCNBr-活性化Sepharose 4B (0.5ml) とbFGF (200 μ g) から、GAG-Sepharoseは3-アミノ-2-ヒドロキシプロピル-Sepharose 6B (3g) とGAG (90mg) からそれぞれ調製した。

bFGF-SepharoseカラムによるHSのアフィニティクロマトグラフィーは、非特異的イオン性会合を防ぐため、カラムをコンドロイチン硫酸含有PBS (0.7 μ g/ml) で平衡化した条件下でNaCl濃

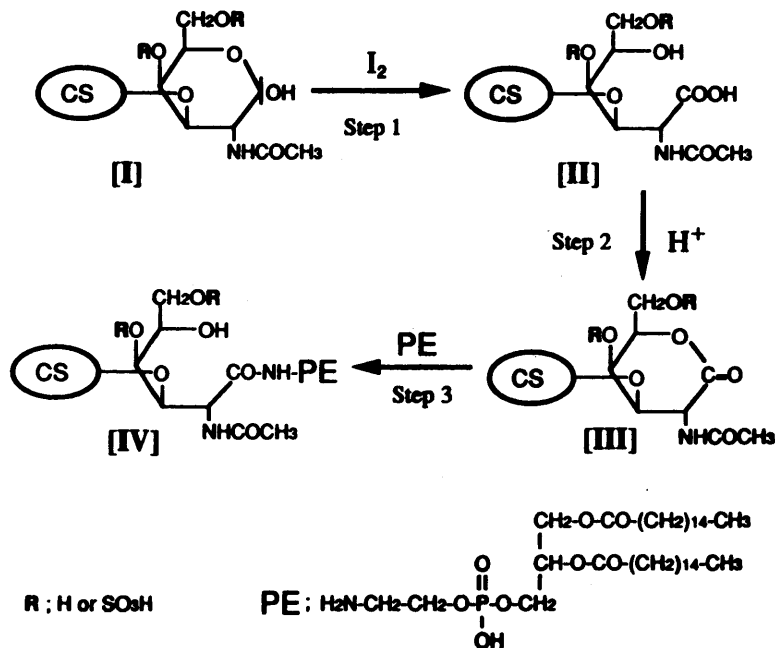


図1. 還元末端にホスファチジルエタノールアミン (PE) を結合したコンドロイチン硫酸 (CS) プローブの調製方法。他のGAG標品のPE化もこれと類似の方法で調製。

度勾配 (0 → 3M) による溶出を行った。還元末端にホスファチジルエタノールアミン (PE) を結合したGAGプローブは図1のスキームに示す方法で調製した。生成物GAG-PEは、それぞれNMRおよびコンドロイチナーゼABC/ホスホリパーゼD消化を組み合わせたTLCによって同定した。フィブロネクチンをコートした培養皿へのBHK細胞の接着およびその阻害は、PGを阻害剤として用いた前報 (*J. Biol. Chem.*, 264, 8012-8018, 1989)の方法に準じて検定した。培養皿に固定化されたGAG-PEの量は、あらかじめ蛍光標識した(*fl*)GAG-PEを用い蛍光強度測定によって作成した標準曲線にもとづいて推定した。

[研究の結果]

ウシ動脈平滑筋細胞を培養し、集密期で細胞層を除去して得られる培養皿上のマトリックスには強いbFGF結合能が観察された。この結合能はマトリックスをヘパリチナーゼ処理すると消失することより、マトリックス成分としてのHS-PGのHS鎖がbFGF結合部位であると判断した。このことは、各種GAGを結合させたSephacroseゲルに対するbFGF結合量の比較によっても、また

bFGF-Sephacroseに対する各種GAG標品の親和力測定によっても支持された。さらに、起源の異なるHS標品はそれぞれbFGF高親和性の鎖と低親和性の鎖を異なる割合で含んでいることが明らかになった。bFGFはトリプシンで容易に分解されて不活性化するが、高親和性HSの共存によって安定化し、その保護効果は低親和性HSの50倍も高かった。これらの結果は、同一起源のHS鎖でもbFGF結合ドメインが不均一に存在していること、その構造は一般的(共通)HS構造とは異なることを示している。この活性ドメイン構造を明らかにする目的で、HSのヘパリチナーゼ消化で得られるオリゴ糖断片をbFGFアフィニティークロマトグラフィーで選別した。表1には最も収量の多かった高親和性16糖(B16-H)の組成を2糖単位のもル比で示す。一般的(つまり低親和性)HS構造には少ないIdoA(2SO₄)-GlcNSO₃(±6SO₄)ユニットが50%を占める点は極めて特徴的であり、このような高硫酸化クラスターを含むドメインがbFGFの結合部位になっている

表1. bFGF高親和性ヘパラン硫酸

16糖の2糖組織

bFGFアフィニティークロマトグラフィーで得た高親和性HSオリゴ糖画分とSephadex G-50で分画し、最も収量の多い16糖画分の2糖組成をHNO₂加水分解法および酵素分解法(ヘパリチナーゼI, II, ヘパリナーゼによって解析した。)

| Disaccharide | Content (mol/mol of B16-H) |
|--|-------------------------------|
| IdoA(2SO ₄)GlcNSO ₃ | 3 |
| IdoA(2SO ₄)GlcNSO ₃ (6SO ₄) | 1 |
| GlcAGlcNAc | 2 |
| GlcAGlcNAc(6SO ₄) | 0.65 |
| GlcAGlcNSO ₃ | 1 |
| GlcAGlcNSO ₃ (6SO ₄) | 0.35 |
| Unidentified | ≤ 0.02 |

ことを示している。

HSあるいはHS鎖を結合したPGと違って、CS鎖を結合したPGはFGFをはじめ各種のHS結合性蛋白質との親和力に乏しいことが知られている。われわれは、フィブロネクチン依存性の細胞接着（インテグリン関与）に対して、CS-PGはむしろ抑制的に作用することを報告している（1989）。この抑制効果は培養皿に固定したCS-PGによって発現すること、コア蛋白質を人工的に血清アルブミンに置換しても再現できることから、適当なtopological条件さえ整えばCS鎖自身に細胞接着抑制活性を発現させることが可能との予想が生まれた。その可能性を実現する方法の一つとして各種GAGプロープを作成し（図1）、細胞接着反応に対する阻害効果を比較した。これらのGAGプロープは、いずれも糖鎖還元端に疎水性基（PE）が付けてあり培地に添加すれば濃度と時間に比例して培養皿に沈着固定化するので、異なる構造のGAGについてモル当たりの阻害活性を定量的に比較することができた。結果は明らかにCS-PEにかなり特異性の強い阻害活性のあることを示した（図2）。

これに比べてデルマトン硫酸-PE、ヘパラン硫酸-PE、ヒアルロン酸-PE、などの比活性は弱く（1~10%）、この活性がCS鎖の特異的な構造因子に由来することを示している。あらかじめホスホリパーゼ消化によりCS-PEのCSとPE部分をつなぐ結合の一つを切断するとCS鎖の固定化能は失われ、それに伴って細胞接着活性も失われる。明らかに、固相に固定されたCS鎖のトポロジーが活性発現に必要な条件の一つであることが確認された。

[研究の考察]

HS鎖 ($M_r 10^4$ order) はN-アセチルまたはN-硫酸化されたグ

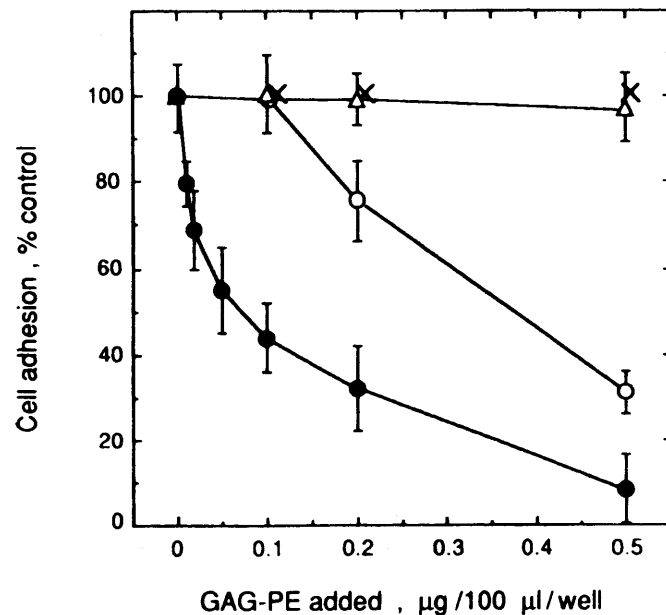


図2. フィブロネクチンをコートした培養皿へのBHK細胞接（2hr）に対するGAG-PE前処理の影響。フィブロネクチンをコートした培養皿にそれぞれCS-PE（●）、デルマトン硫酸-PE（○）、ヒアルロン酸-PE（△）、ヘパラン硫酸-PE（×）を、図に示した濃度に添加、静置2時間後にそれぞれの皿をHanks溶液で洗浄、BHK細胞 1×10^4 Cells/100 μ lをseedして接着速度を測定した。

リコサミンとD-GlcまたはL-Ido配置のヘキスロン酸が交互に繰り返す構造を基本骨格とするが、前者のC₃-またはC₆-OH、後者のC₂-OHには硫酸基結合ポテンシャルがあり、それによって幅広い硫酸基分布の可変構造を作り出す。本研究は、16糖配列に含まれる8個のウロン酸塩基のうち4個までもIdoA(2SO₄)である“高硫酸化クラスター”がbFGFの結合部位として必須であることを明らかにしている。このような部位をつくる直接の因子は、イズロン酸2-O-スルホトランスフェラーゼによる硫酸基導入である。このスルホトランスフェラーゼの単離、クローニング、遺伝子操作は、細胞表面に分布するHS-PGと外来性成長因子との相互作用、ひいては炎症や細胞増殖の調節メカニズムを解明する上で重要な情報を提供するに違いない。

Polyanionicポリマーとして、CSはHSと同類の糖鎖構造をもちながらその生理活性が全く異なる点は興味深い。その構造的要因の一つはウロン酸C₅部位におけるエピ化の有無、それに由来する糖鎖conformationのflexibilityの差にあるのではないか？ Flexibilityに乏しいCS鎖はbFGFのようなポリペプチドに対するアクセスが困難であり、逆にインテグリン〜フィブロネクチンのような特異性の高い蛋白質どうしの会合反応に対しては抑制的に介入する可能性が強くなるものと考えられる。活性発現条件として培養皿への固定化が要求される理由は不明であるが、CS鎖どうしの集合による“多価効果”がその一つであるように思われる。これらの阻害メカニズムの不明な点、そしてこの活性の生理的意義についてさらに研究を進める必要がある。

[研究の業績]

1. Habuchi, H., Suzuki, S., Saito, T., Tamura, T., Harada, T., Yoshida, K., & Kimata, K. : Structure of a heparan sulfate oligosaccharide that binds to basic fibroblast growth factor. Biochem. J., 285, 805–813 (1992)
2. Yada, T., Arai, M., Suzuki, S. & Kimata, K. : Occurrence of collagen and proteoglycan forms of Type IX collagen in chick embryo cartilage. J. Biol. Chem., 267, 9391–9397 (1992)
3. Fransson, L. A., Havsmark, B., Sakurai, K., & Suzuki, S. : Sequence analysis of *p*-hydroxyphenyl-*O*- β -D-Xylosaide initiated and radio-iodinated dermatan sulfate from skin fibroblasts. Glycoconjugate J., 9, 45–55 (1992)
4. Arai, M., Yada, T., Suzuki, S., & Kimata, K. : Isolation and characterization of type IX collagen-proteoglycan from the Swarm rat chondrosarcoma. Biochim. Biophys. Acta, 1117, 60–70 (1992)
5. Sugiura, N., Sakurai, K., Hori, Y., Karasawa, K., Suzuki, S., & Kimata, K. : Preparation of lipid-derivatized glycosaminoglycans to probe a regulatory function of the carbohydrate moieties of proteoglycans in cell-matrix interaction. J. Biol. Chem., 268, 15779–15787 (1993)

マクロファージレクチンの構造と機能に関する研究

川寄敏祐

京都大学薬学部 生物化学教室

[研究の目的]

筆者らは数年前、腹腔マクロファージはガラクトースおよびN-アセチルガラクトサミンを末端に持つ糖タンパク質、アシアロ糖タンパク質、を細胞内に取り込むことを見いだし、この取り込みに関与するエンドサイトーシスの受容体としてアシアロ糖タンパク質結合タンパク質 (M-ASGP-BP) を単離した。その後、このM-ASGP-BPのcDNAのクローニングに成功し、さらにこのcDNAをCOS-1細胞にトランスフェクションすることによりM-ASGP-BPを細胞表面に強制発現することにも成功している。ところで、一般にエンドサイトーシスの受容体には細胞内領域にインターナリゼーションシグナルと呼ばれる特定の機能モチーフが含まれており、この働きにより受容体に結合したリガンドを細胞内に取り込む。すなわち、トランスフェリン受容体などでは細胞内領域のTyr-Xaa-Yaa-Phe配列がtight turnと呼ばれる特定の高次構造をとりこれが細胞内のアダプタータンパク質と相互作用することにより細胞内へとインターナライズされることが知られている。ラットM-ASGP-BP分子の細胞内領域にもTyr5-Glu-6-Asn-7-Phe8という類似の配列がみられた。本研究ではこれらが果たしてインターナリゼーションシグナルとしての働きを持つものか否かを解析した。

[研究の方法]

ラットM-ASGP-BPcDNA, Wt、およびこれより部位特異的突然変異法により、Tyr5を欠損させたものM(d)、Tyr5をAlaに置換したものM(A)およびPheに置換したものM(F)を作製し、これらを発現ベクターに組み込みCOS-1細胞に発現させ、細胞表面に現れた受容体量および¹²⁵I-アシアロオロソムコイドを細胞内に取り込む活性を測定した。

[研究の結果]

1. アシアロオロソムコイド(ASOR)のエンドサイトーシスにおけるTyr5の役割。
図1(a)に示すように、野生型M-ASGP-BPcDNA, Wt、および変異体M(F), M(A), M(d)をCOS-1細胞にトランスフェクしたところ、いずれの細胞もほぼ等しい量のASORを結合した。従って、これらの変異体はいずれもほぼ同様に生合成され、細胞表面まで輸送されていることを示している。一方、これらの細胞を37℃でインキュベートして、ASORの細胞内への取り込みを調べたところ、図1(b)に示すように、Tyr5を欠損した変異体M(d)では取り込み量は野生型の約25%にまで減少した。Tyr5をAlaに置換したものM(A)では欠損型とほぼ同程度の活性しか示さないのに対し、Pheに置換したM(F)で野生型の約80%の活性を保持していた。

また、図2に示すように、まず、細胞を4℃で60分間ASORとインキュベートして、細胞表面の受容体を飽和させたのち、単離し、ついで、37℃で20分間インキュベートすると、野生型では約70%が細胞内へと移行するのに対し、M(d)やM(A)では70%以上が細胞表面に止まっていた。以上の結果は、M-ASGP-BPによるリガンド(ASOR)の急速なインターナリゼーションにはTyr5残基が不可欠であることを示している。

2. リガンドのインターナリゼーションには、1分子あたり何個のTyr5残基が必要であるか？

M-ASGP-BPは42kDaのサブユニットの6量体として細胞表面に存在する。従って、M-ASGP-BPには1分子あたり6個のTyr5が含まれている。これらのTyr残基はリガンドのインターナリゼーションに際して相加的に作用するのか、それともall or none型の作用を示すのであろうか。

WtとM(d)の2種類のcDNAをコトランスフェクションすることによりこの点を検証した。第一のモデルは、リガンドのインターナリゼーション速度は1分子あたりに含まれるTyr5の数に比例して増加するというものであり、この場合の予想値はM(d)の%と逆比例する関係となる。第二のモデルは、1分子あたりある特定の数のThr5残基、たとえば、1個(K=1)、3個(K=3)および5個(K=5)が含まれるとその分子は一定の速度でインターナライズされるか、これよりも少ないと事実上インターナライズされないという考えである。

図3に示すように、WtとM(d)を様々な割合で混合したのちにCOS-1細胞に発表させると、細胞表面でのリガンド結合はほぼ一定であるのに対して、細胞内への取り込み量は、M(d)の増加に従って減少した。第二モデルを検証するためには一定のcDNA比において、何モルの野生型サブユニットがふくまれるかを知る必要がある。そこでこれらをポアソン分布をもちいて計算した。その結果は図4に示す様にK=3すなわち3個のチロシン残基があれば十分であることを示していた。しかしながら、今回の実験条件においては、この第一のモデルと第二のモデルのいずれが正しいかを検証することは困難であった。従って、結論としては、本分子の速いインター

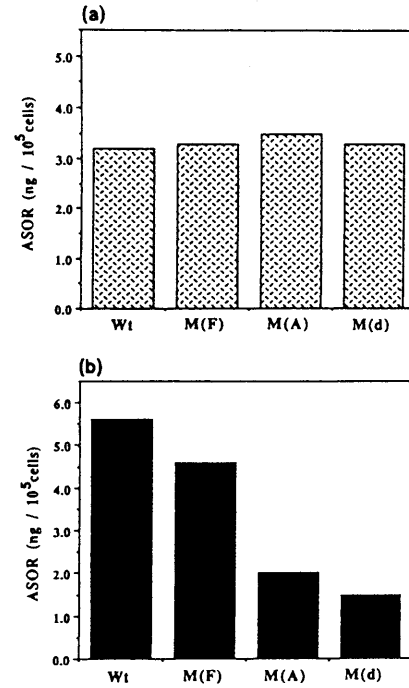


図1. ¹²⁵I-ASORの細胞表面への結合(a)と細胞内への取り込み(b)。

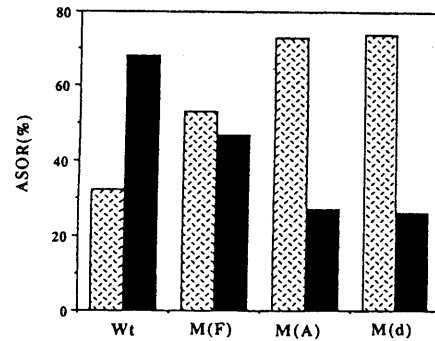


図2. 細胞表面に結合した¹²⁵I-ASORのインターナリゼーション

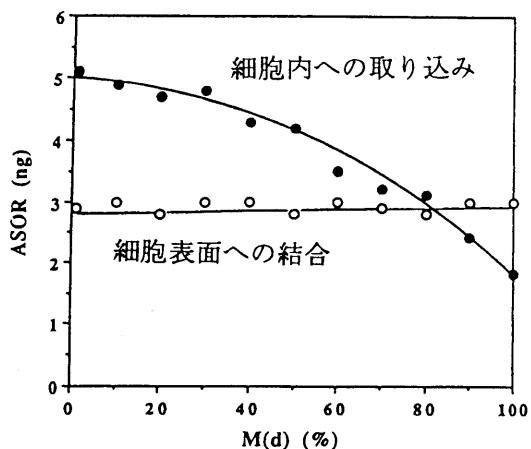


図3. 野生型およびTyr5欠失M-ASGP-BPのコトランスフェクション

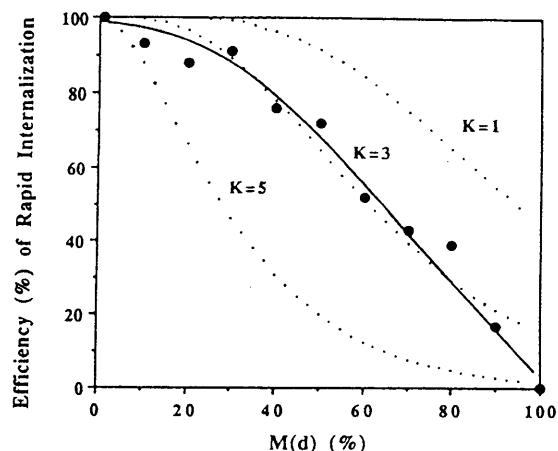


図4. インターナリゼーションに必要なTyr5の数

ナリゼーションには複数のTyr残基が必要であり、これらがアダプタータンパク質との相互作用に関与しているものと考えている。

[研究の考察]

本研究によりラットM-ASGP-BPの細胞内領域(38残基よりなる)に含まれるTyr5が本レクチンのインターナリゼーションシグナルとして重要な働きをしていることが明らかとなった。N末端近傍のTyr残基の存在は図5に示す様にこれまでに報告された他の組織あるいは動物由来のアシアロ糖タンパク質結合タンパク質にも共通に見られており、これらの残基は同様にシグナルとして働きを持つと考えられる。

なお、最近の筆者らはM-ASGP-BPのTyr5がリン酸化されることを明らかにしている。このリン酸化がインターナリゼーションの制御調節に関与している可能性も考えられその意義の解明が期待される。

[研究業績]

1. Kawasaki, N., Itoh, N., & Kawasaki, T.: cDNA sequence and gene organization of conglutinin, a C-type mammalian lectin containing a collagen-like domain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, in press
2. Kawano, T., Kozutsumi, Y., Kawasaki, T. & Suzuki, A.: Biosynthesis of N-glycolylneuraminic acid-containing glycoconjugates. Purification and characterization of the key enzyme of the CMP-N-acetylneuraminic acid hydroxylation system. *J. Biol. Chem.*, in press

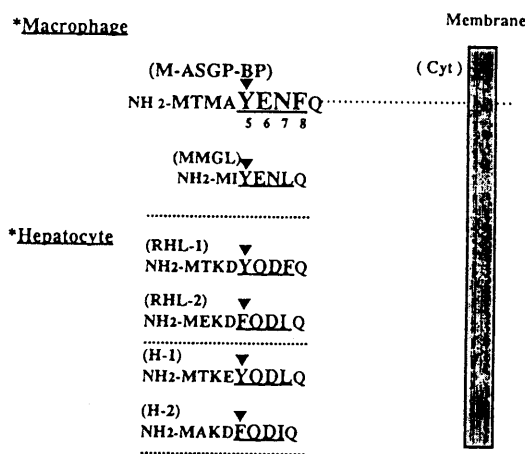


図5. ASGP-BPのアミノ末端配列
MMGL(マウスマクロファージGal/GalNAc特異的レクチン)
RHL-1,2 (ラット肝レクチン)
H-1,2 (ヒト肝レクチン)

3. Yakematsu, H., Kawano, T., Koyama, S., Kozutsumi, Y., Suzuki, A., & Kawasaki, T.: Reaction mechanism underlying CMP-N-acetylneuraminic acid hydroxylation in mouse liver. *J. Biochem.*, in press
4. Kawano, T., Kozutsumi, Y., Takematsu, H., Kawasaki, T. & Suzuki, A.: Regulation of biosynthesis of N-glycolylneuraminic acid-containing glycoconjugates: characterization of factors required for NADH-dependent cytidine 5'monophosphate-N-acetylneuraminic acid hydroxylation. *Glycoconjugate J.*, 10(1), 109-115 (1993)
5. Kawasaki, N., Yokota, Y. & Kawasaki, T.: Differentiation of conglutination activity and sugar-binding activity of conglutinin after removal of NH₂-terminal 54 amino acid residues by endogenous serine protease(s). *Arch. Biochem. Biochem.*, 305(2), 533-540 (1993)
6. Ozaki, K., Itoh, N. & Kawasaki, T.: Role of tyrosine-5 in the cytoplasmic tail of the macrophage asialoglycoprotein receptor in the rapid internalization of ligands. *J. Biochem.*, 113(3), 271-276 (1993)
7. Kurata, H., Cheng, H. M., Kozutsumi, Y., Yokota, Y. & Kawasaki, T.: Role of collagen-like domain in the complement activation and the secretion of the human serum mannan-binding protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 191(3), 1204-1210 (1993)
8. Lee, R.T., Ichikawa, Y., Kawasaki, T., Drickamer, K. & Lee, Y. C.: Multivalent ligand binding by serum mannose-binding protein. *Arch. Biochem. Biophys.*, 299(1), 129-136 (1992)
9. Oka, S., Terayama, K., Kawashima, C. & Kawasaki, T.: A novel glucuronyltransferase in nervous system presumably associated with the biosynthesis of HNK-1 carbohydrate epitope on glycoproteins. *J. Biol. Chem.*, 267(32), 22711-22714 (1992)
10. Takematsu, H., Kozutsumi, Y., Suzuki, A. & Kawasaki, T.: Molecular cloning of rabbit cytochrome B5 genes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 185(3), 845-851 (1992)
11. Tanaka, N., Nakada, H., Itoh, N., Mizuno, Y., Takanishi, M., Kawasaki, T., Tate, S., Nagaki, F. & Yamashina, I.: Novel structure of the N-Acetylgalactosamine containing N-Glycosidic carbohydrate chain of batroxobin, a thrombin-like snake venom enzyme. *J. Biochem.*, 112(1), 68-74 (1992)

12. Sugahara, K., Mizuno, N., Okumura, Y. & Kawasaki, T.: The phosphorylated and /or sulfated structure of the carbohydrate-protein-linkage region isolated from chondroitin sulfate in the hybrid proteoglycans of Engelbreth-Holm-Swarm mouse tumor. *Eur. J. Biochem.*, 204, 401-406 (1992)
13. Ozaki, K., Ii, M., Itoh, N. & Kawasaki, T.: Expression of a functional asialoglycoprotein receptor by transfection with a cloned cDNA that encodes a macrophage lectin. *J. Biol. Chem.*, 267(13), 9229-9235 (1992)
14. Wada, M., Itoh, N., Ohta M. & Kawasaki, T.: Characterization of rat liver mannan-binding protein gene. *J. Biochem.*, 111(1), 66-73 (1992)
15. Kitagawa, H., Nakada, H., Fukui, S., Funakoshi, I., Kawasaki, T. & Yamashina, I.: Novel oligosaccharides with the sialyl-Le^a structure in human milk. *Biochemistry*, 30(11), 2869-2876 (1991)
16. Kurosaka, A., Yano, A., Itoh, N., Kuroda, Y., Nakagawa, T. & Kawasaki, T. : The structure of a neural specific carbohydrate epitope of horseradish peroxidase recognized by anti-horse radish peroxidase antiserum. *J. Biol. Chem.*, 266(7), 4168-4172 (1991)
17. Fukui, S., Hori, T., Numata, Y., Kitagawa, H., Nakada, H., Kawasaki, T., Funakoshi, I. & Yamashina, I.: Characterization of mucin antigens recognized by monoclonal antibodies raised against human colon cancer cells. *Cancer Res.*, 51, 331-335 (1991)

植物レクチンの構造と機能

松本勲武

お茶の水女子大学理学部化学科生物化学

〔研究の目的〕

多くの植物レクチンが糖鎖検出試薬あるいは糖鎖結合リガンドとして広く用いられている。しかしながら、それぞれの植物中における本来の機能に関してはほとんど明らかになっていない。我々はエンジュ樹皮から2種類のレクチン、ガラクトース/N-アセチルガラクトサミン特異的レクチン *Sophora japonica* bark agglutinin I (B-SJA-II) とマンノース/グルコース特異的レクチン B-SJA-II を精製し、それらの構造と機能に関する研究を進めている。本研究では、糖特異的に自己凝集する大変珍しい性質をもつことが明らかになったB-SJA-II の構造を調べるとともに、機能を解明するために必須の情報である、樹皮組織中におけるB-SJA-II の局在部位を明らかにすることを目的とする。

〔研究方法、研究結果と考察〕

1. B-SJA-II の調製

B-SJA-II はマルタミル-Sepharose をもちいるアフィニティークロマトグラフィーにより調製できるが、回収率が低いという問題があった。これは、B-SJA-II が植物糖タンパク質のN結合糖鎖に結合するので、エンジュ樹皮粗抽出液中に含まれる糖タンパク質と結合してしまい、アフィニティークラムへの吸着が阻害されるためであることが明らかになった。そこで次のような改良法を考案し好結果をえることができた。エンジュ樹皮粗抽出液にB-SJA-II の特異糖であるメチル α -D-マンノピラノシドを加えた状態でラクタミル-Sepharose によるアフィニティークロマトグラフィーを行ってまづB-SJA-Iを除去したのち、素通り画分にマルタミル-Sepharoseゲルを加え、この懸濁液を透析チューブに入れて透析しメチル α -D-マンノピラノシドを徐々に除去した。この透析中にほとんどのB-SJA-IIはマルタミル-Sepharoseゲルに吸着され、共存する糖タンパク質による妨害を防ぐことができた。このゲルをカラムに詰め洗浄後、吸着しているB-SJA-IIをメチル α -D-マンノピラノシド溶液により特異的に溶出回収した。

2. B-SJA-IIの構造

サブユニットの構造：B-SJA-IIはSDS-PAGEにより4種のサブユニットにわかれた。標準タンパク質との相対泳動度の比較により各々の分子量は19.4kDa, 18.2kDa, 15.0kDa, 13.2kDaと推定された。これらのアミノ酸分析の結果前2者の間、後2者の間で相同性が高かったことを考慮して、それぞれa-1, a-2, b-1, b-2とした。糖分析およびHRP-レクチンによる染色試験の結果から、a-1, a-2, b-1はN結合型糖鎖の修飾を受け、糖鎖含量はa-1>a-2>b-1の順で高く、b-2は糖鎖をもたないことが明らかになった。トリフルオロメタン sulfon 酸 (TFMS)処理により脱グリコシル化したB-SJA-IIのSDS-PAGE を行ったところb-2に相当する単一バンドのみ検出された。

サブユニットのアミノ酸配列： aサブユニットのN末端配列がConAの123番めからの配列と高い相同性を示し、bサブユニットのN末端配列がConAの1番めからすなわちN末端配列と高い相同性をもつことはすでに報告している。今回単離に成功したa-2のプロテアーゼ消化により得られたペプチドの配列分析を行ったところ、ConAの123番めからの配列と約31%の相同性をもつ配列が示唆された。

リガンド結合活性： 4種のサブユニットがすべて糖結合能をもつことはHRP標識糖タンパク質による染色試験により実証済みである。今回ルテニウムレッドによる染色およびカルシウムイオンによるその阻害実験を行った所、すべてのサブユニットがカルシウムイオン結合活性をもつことが明らかになった。また脱グリコシル化したB-SJA-IIのアフィニティークロマトグラフィーを行ったところN結合糖鎖を多数もつ西洋ワサビペルオキシダーゼカラムにカルシウムイオン依存的に結合すること、すなわち、糖結合能を保持していることが確認された。

3. 自己会合性

メチル α -D-マンノピラノシド溶液によりアフィニティークラムから溶出させたB-SJA-IIを透析して、この特異糖を除去すると自己会合して沈殿を生じ、この沈殿は特異糖により可溶化されることはすでに報告している。今回種々の濃度の特異糖の存在下に native-PAGE およびゲル濾過を行った。いずれの場合も特異糖の濃度を上げると徐々に会合体の大きさが低下することが示された。また特異糖の存在下で化学的な架橋反応を行ったところ、ダイマー以上のオリゴマーは検出されなかった。脱グリコシル化したB-SJA-IIでは会合は認められなかった。

4. 凝集活性への B-SJA-II の糖鎖の寄与

B-SJA-II はカルシウムイオン依存的にヒト赤血球を凝集するが、脱グリコシル化したB-SJA-IIは糖結合能をもつにもかかわらずカルシウムイオンの存在下でも血球凝集活性は認められなかった。B-SJA-II の糖鎖によるB-SJA-IIの自己会合が血球凝集活性獲得に必須の条件であることが示された。

5. 組織化学的研究

B-SJA-IIの抗体調製： B-SJA-IIは哺乳類に対する抗原性が高い植物型N結合糖鎖をもつので、TFMS 処理により糖鎖を除去したB-SJA-IIを抗原としてウサギ抗体を調製し、B-SJA-I-Sepharose カラムにより B-SJA-II に交差反応する抗体を除去したものを使用した。組織分布： エンジュ樹皮の切片を抗B-SJA-II抗体を用いて染色し、光学顕微鏡でB-SJA-IIの存在部位を調べた。B-SJA-IIは形成層、篩管、コルク層、韌皮繊維などでは検出されず、柔組織の一部および一部の導管に局在していることが明らかになった。

柔組織では軸方向柔組織の液胞の全体に存在した。また未同定の顆粒の周辺により高濃度で存在する例もあった。でんぷん染色した結果と比較したが未同定の顆粒との異同に関しては結論がでなかった。B-SJA-Iも液胞に存在するが、液胞の周辺部に顆粒状に存在するのに対して、B-SJA-IIは液胞全体に分布しているのが対象的である。液胞周辺部での顆粒状の存在はB-SJA-Iが貯蔵タンパク質であることを示唆しており、実際B-SJA-Iが秋から冬にかけて多くなる結果もこの仮説を支持する。一方B-SJA-IIの染色のされ方はB-SJA-IIが液胞中に沈殿ではなく溶解した状態で存在することを示唆している。B-SJA-IIはマルトースおよびアミラーゼとも結合できることが確認されているので、でんぷん顆粒の形成あるいはでんぷんの可溶化に関与する因子であるとの推測も可能である。また植物糖タンパク質性の酵素や輸送体に結合して活性の調節を行っている可能性も考えられる。また自己凝集性という特異な性質に注目すると、高等動物における血液凝固系に類似した生体防御系に関与しているという仮説も大変魅力的である。ゴムの木の乳液中にはレクチンが存在し、これに対するリガンドとなる糖タンパク質が乳液中に存在する顆粒内に存在することが我々と共同研究したタイの研究者により発見されている。樹皮に傷ができると、乳液中のこの顆粒が壊れ放出された糖タンパク質とレクチンが沈降反応を起こして乳液の流出を防ぐと考えられている。すなわち、動物では血液凝固系の因子と血小板による複雑な系が存在するのに対して、ゴムの木ではレクチンと乳液顆粒というはるかに簡単な系で同様な働きが達成されている可能せいが指摘されている。本研究で明らかになった軸方向柔組織の液胞における分布様式から、B-SJA-IIにも同様な働きがあると考えられることもできる。樹

皮が傷つけられた時に、軸方向柔組織の細胞および液胞が破壊されれば、液胞中に可溶化しているB-SJA-IIはただちに内在性の糖タンパク質とであい沈殿を形成することができるであろう。

B-SJA-IIは木部においては導管に関連して存在する。導管は小導管の周囲が破壊され大きな導管に成長し、ある一定の太さで成長は停止する。B-SJA-IIは小導管の内壁部分に特に高濃度に存在した。またこのような小導管の間の介在部にも、より低濃度ではあるが存在した。また成長がほぼ止り、導管の中央部で導管を二分する一層の細胞群のなかにも線上にはっきりと存在することも確認された。これらの結果は導管の拡張にB-SJA-IIが関与していることを示している。今後B-SJA-IIがこのような部位でどのような生体物質と結合しているかを明らかにすることが、分子レベルでの具体的な機能解明のために必要であろう。また、一般には木部の細胞は生きていないと考えられているが、この部位に存在するB-SJA-IIがどこから由来したか（生き残っている木部の細胞からか根の組織からか）を知ることも今後の課題である。

〔結論〕

B-SJA-IIの4種のサブユニットはすべてカルシウムイオン依存的な糖結合活性をもち、この活性は自身のN結合糖鎖によるグリコシレーションとは無関係であるが、B-SJA-IIの血球凝集活性の発現には、自身のN結合糖鎖によるにはB-SJA-IIの糖特異的自己会合が必須である。

B-SJA-IIはエンジュ樹皮の軸方向柔組織の液胞中、および拡張していると思われる小導管の内壁、および小導管と小導管の間や大導管のなかに残っている薄い隔壁中など消失しつつあると思われる部分に存在することが明らかになった。前者では生体防御系などに、後者では導管の拡張に関連することが想像され、植物における糖鎖やレクチンの機能解明のための新しい研究方向が示されているとも考えられる。

〔国内発表〕

1. 糖特異的自己会合性を持つ新しいMan/GlcNAc特異的エンジュ樹皮レクチン

上野美代子、新井智子、小島京子、小川温子、松本勲武、瀬野信子
第13回糖質シンポジウム p 95 平成3年

2. 糖特異的自己会合性エンジュ樹皮レクチンの改良精製法と糖鎖構造

小川温子、新井智子、松本勲武、瀬野信子
生化学 63 p 942 (4199) 平成3年

3. 自己会合性エンジュ樹皮レクチンのサブユニットの分離と糖鎖の除去
福島寿子 小島京子 小川温子 松本勲武 瀬野信子
生化学 64、p 966 (3046) 平成4年
4. 自己会合性エンジュ樹皮レクチンの糖鎖と糖結合活性および Ca^{2+} 結合能の
関係
福島寿子 小川温子 松本勲武
生化学 65、p 892 (3095) 平成5年

〔国際学会発表〕

1. The N-Terminal Amino Acid Sequences and Sugar Chains of Mannose-Specific and Sugar Specifically Aggregatable Lectin from the Bark of *Sophora japonica*
M. Ueno, H. K. Ogawa, I. Matsumoto, and N. Seno
XIth Int. Symp. Glycoconjugates
2. Improved Affinity Chromatographic Purification of Sugar Specifically Aggregatable D-Mannose/N-Acetyl-D-Glucosamine-Specific Lectin from the Bark of *Sophora japonica*
M. Ueno, T. Arai, K. Kojima, H. K. Ogawa, I. Matsumoto, and N. Seno
9th Int. Symp. Affinity Chromatogr. Biol. Recogn.

〔原著論文〕

1. A Novel Mannose-Specific and Sugar Specifically Aggregatable Lectin from the Bark of Japanese Pagoda Tree (*Sophora japonica*)
M. Ueno, H. Ogawa, I. Matsumoto, and N. Seno
J. Biol. Chem., 266, 3146-3153 (1991)
2. Purification and Characterization of *Canavalia gladiata* Agglutinin
K. Kojima, H. Ogawa, N. Seno, and I. Matsumoto
Carbohydr. Res., 213, 275-282 (1991)
3. Improved Affinity Chromatographic Purification of D-Mannose/N-Acetyl-D-Glucosamine-Specific Lectin from the Bark of *Sophora japonica* eliminating the Loss by Sugar Specific Self-Aggregation
M. Ueno, H. Ogawa, I. Matsumoto, and N. Seno
J. Chromatogr., 597, 197-200 (1992)

アルコール依存症患者における糖鎖欠損トランスフェリンの出現

山下克子

(財) 佐々木研究所 生化学部

<目的>

アルコール依存症は長期飲酒によって肝及び脾などの臓器障害のみならず神経障害や家庭内暴力などを引き起こし、世界的な社会的問題となっている。アルコール性臓器障害としてはその主な代謝臓器である肝臓に最も強く現われ、糖・脂質・タンパク質などの代謝に異常が認められる。1979年Stiblerらはアルコール依存症患者において脳脊髄液や血清中のトランスフェリン(Tf)に等電点の高い異常成分が高い相関性を持って存在することを見出した。その後彼らは、この異常成分がシアル酸、ガラクトース、*N*-アセチルグルコサミンの3糖構造を欠いた糖鎖を持つトランスフェリンであることを報告し、これを"Carbohydrate-deficient transferrin (CDT)"と名付けて飲酒マーカーとして非常に有用であることを示した。

最近我々は、Tfなどの血清糖タンパク質に等電点の高い成分が出現する先天性糖タンパク質糖鎖不全症候群が*N*-結合型糖鎖転移不全を原因とする遺伝疾患であることをレクチンクロマトグラフィー、結合糖鎖数の定量、エレクトロスプレーイオン化法を用いたマススペクトロメトリー(ESI-MS)により証明した。この研究の過程で予備的にアルコール依存症患者の血清Tfのレクチンクロマトグラフィーを行なったところ、どのレクチンとも全く親和性を示さない成分を認め、Stiblerらの結論と矛盾が生じた。そこで、我々はアルコール依存症における*N*-結合型糖鎖の異常の本質を明らかにするため、Tfの解析を行なった。

<方法>

試料は入院3日以内まで飲酒を続けていたアルコール依存症患者14例から得た。いずれも飲酒経歴は毎日3合～1升を11～37年間続けている。血清トランスフェリンは抗トランスフェリン抗体カラムを用いてワンステップで精製する。クロマトフォーカシングはファルマシア社のMono P HR5/20カラムを用いて、25 μ M FeCl₃を含むポリバッファー74、pH 5.0で溶出する。TJA-1、Con A、RCA-Iカラム(各1ml)はトリス-塩酸緩衝液(pH 7.4)で洗い、結合した少糖及びトランスフェリンは0.1Mラクトース(TJA-I)、5mMメチル- α -マンノシド(Con A)、10mMラクトース(RCA-I)で溶出する。

エレクトロスプレーイオン化質量分析計はフィニガンマット製トリプルステージ四重極型質量分析計TSQ700を用いる。サンプルは0.1%TFAに溶かし、高電圧-4.2kV、乾燥ガスN₂: 280度、@20 unit、シースガスN₂: 35psi、シース液 2-メトキシエタノール: 2 μ l/mlにて分析した。

<結果>

入院3日前まで飲酒していたアルコール依存症患者の血清より抗Tf抗体カラムを用いてTfを精製し、Mono Pカラムによりイソフォームを分離した(図1)。健常人のTfに見られるS₄の他に入院直後にはシアル酸を全く持たないS₀とシアル酸を2モル結合しているS₂イソフォームが認められたが、断酒1週間後にはほぼ消失している。ただし、肝硬変を合併した患者に出現するTfイソフォームS₃とS₅は断酒による時間的変化は認められなかった。そこで、飲酒に相関して出現すると考えられるS₀、S₂イソフォームを分取しさらに詳細に解析した。

患者S₀、S₂、S₄イソフォーム各100 μgを定法通りヒドラジン分解し、N-アセチル化後、NaB³H₄で還元して³H-標識少糖を得た(図2)。これを高圧濾紙電気泳動、系統的レクチンカラムクロマトグラフィー、逐次的酵素消化、Bio-Gel P-4カラムクロマトグラフィーにより解析した結果、S₀から少糖はほとんど遊離されなかったが、S₂、S₄に結合した糖鎖構造は図2に示す通り健常人のそれと全く同じジシアリル複合型2本鎖であった。遊離少糖量を放射能活性から計算したところ、表1に示すようにS₄は1モルTfに2モルの糖鎖が結合しているが、S₂には1モル、S₀には糖鎖が結合しないことが推定された。

次にCon A、TJA-1、RCA-Iのレクチンカラムクロマトグラフィーにおける各イソ

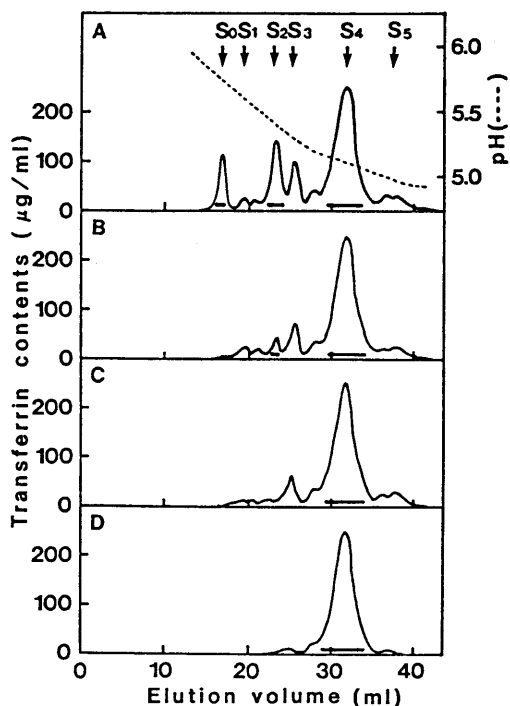
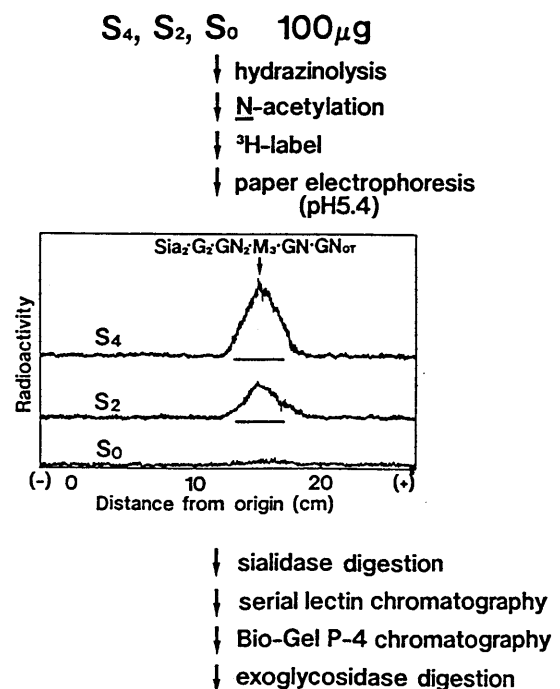


図1 血清トランスフェリンのクロマトフォーカシングによる溶出パターン
A: 患者断酒直後、B: 断酒後1週間、
C: 断酒後6週間、D: 健常人



S₄ and S₂

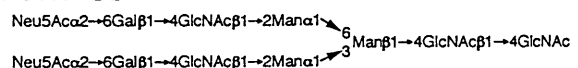


図2 血清トランスフェリンイソフォームの糖鎖構造解析とその構造

フォームの挙動を調べたところ、S₂は糖鎖構造解析結果より予想される通り、S₄と同じ挙動を示したが、S₀はどのレクチンカラムとも結合せず、糖鎖を持たないイソフォームであることが支持された(表1)。さらに直接的に糖鎖の欠損を証明するために各イソフォームの質量数をESI/MS法で分析した。その結果、表1に示すように、S₄は79,574±4Da、S₂は77,367±3Da、S₀は75,159±4Daとなり、S₂はS₄からジシアリル2本鎖糖鎖(分子量2,206Da)が1本少ないもの、S₀はS₄から2モルの糖鎖の少ないペプチドそのものであることが明らかになった。以上の結果を模式的に表したのが図3である。

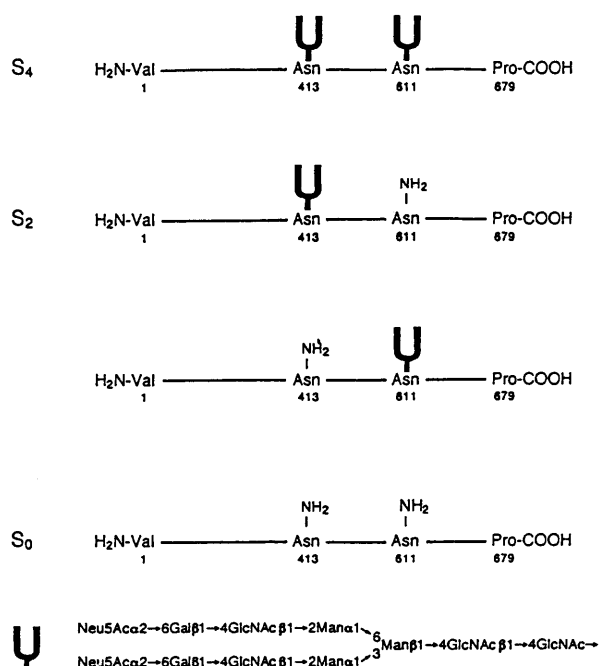


図3 トランスフェリンイソフォームS₄、S₂、S₀の構造模式図

表1 トランスフェリンイソフォームS₄、S₂、S₀の分子量と結合糖鎖数、レクチン親和性

| Transferrin isoforms | Molecular masses | Sugar chain per isoform | Binding to | | |
|----------------------|-----------------------|-------------------------|------------|-------|-------|
| | | | ConA | TJA-I | RCA-I |
| | Da | mol/mol | | | |
| Healthy control | S ₄ 79,570 | 2.22 | + | + | - |
| Patient 1 | S ₄ 79,574 | 2.09 | + | + | - |
| | S ₂ 77,367 | 1.32 | + | + | - |
| | S ₀ 75,159 | 0.05 | - | - | - |

<考察>

Stiblerらはアルコール依存症患者に特異的に見られる血清糖タンパク質の等電点異常、とりわけTfの異常を報告した。彼らは糖組成分析からこの異常がシアル酸、ガラクトース、N-アセチルグルコサミンの3糖側鎖構造の欠損であることを示唆したが、詳細な構造解析は行なわれていなかった。本研究ではこの長期飲酒による糖鎖異常が小胞体(ER)におけるオリゴ糖-ドリコール中間体からペプチド中のAsn-X-Ser(Thr)へのN-結合糖鎖転移不全であることを以下の方法により証明した。1)ヒドラジン分解-Na³H₄還元標識による遊離少糖の定量法によりS₄には2モル、S₂には1モルの糖鎖が結合し、S₀は糖鎖を持たないことが判明した。またS₂の糖鎖は

Stiblerらが示唆したような異常な構造ではなく、 S_4 と同じジシアリル2本鎖であった。2) S_0 はCon A, TJA-1, RCA-Iアガロースカラムのいずれにも結合せず、糖鎖を持たないことが明らかである。3)ESI/MS法により S_4 と S_2 、 S_2 と S_0 の分子量の差はそれぞれジシアリル2本鎖1モルおよび2モルの分子量と一致する。

ERにおけるN結合型糖鎖転移不全は最近我々が先天性糖タンパク質糖鎖不全症候群の原因としても報告しているが、どちらの場合もその欠損部位はまだ明らかになっていない。エタノールによる障害は非常に多面的である。肝臓におけるアルコールの代謝は細胞質のアルコールデヒドロゲナーゼ、ERのミクロソームエタノール酸化系、ペルオキシソームのカタラーゼによりアセトアルデヒドに代謝される。しかし長期の飲酒により低血糖や脂肪蓄積、アセトアルデヒドによる微小管形成の障害から起こるゴルジ体機能不全や肝細胞の風船化、さらには繊維化など多くの異常が現われてくる。特にN結合糖鎖転移不全がERで起こることから、長期エタノール摂取により誘導されたミクロソームエタノール酸化系の活性化がドリコール中間体合成や糖鎖転移反応に間接的に阻害的影響を与えている可能性がある。Stiblerらはイオン交換カラム法により $S_2 \sim S_0$ 成分を分離定量することにより長期飲酒の良いマーカーになることを報告しているが、この方法は長期飲酒によって引き起こされる肝障害で出現するフコシル化トランスフェリンとの分離が不十分である。したがって、レクチンカラム法によってこれらと完全に分離定量可能な S_0 はより飲酒マーカーとして適していると考えられる。

<業績>

1. Kobata, A. and Yamashita, K. Fractionation of oligosaccharides by serial affinity chromatography with use of immobilized lectin columns. In: M. Fukuda and A. Kobata, ed. Practical Approach-Glycoprotein Analysis. Oxford University Press, 1993: 103-125.
2. Yamashita, K., Ideo, H., Ohkura, T., Fukushima, K., Yuasa, I., Ohno, K. and Takeshita, K. Sugar chains of serum transferrin of patients with carbohydrate deficient glycoprotein syndrome: Evidence of asparagine-N-linked oligosaccharide transfer deficiency. *J. Biol. Chem.*, **268**: 5783-5789, 1993.
3. Yamashita, K., Taketa, K., Nishi, S., Fukushima, K. and Ohkura, T. Sugar chains of human cord serum α -fetoprotein: Characteristics of N-linked sugar chains of glycoproteins produced in human liver and hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.*, **53**: 2970-2975, 1993.
4. Umetsu, K., Yamashita, K., Suzuki, J., Yamashita, T. and Suzuki, T. Purification and characterization of an N-acetyllactosamine-specific lectin from Larvae of a Moth, *Phalera flavescens*. *Arch. Biochem. Biophys.*, **301**: 200-205, 1993.

5. Fukushima, K., Watanabe, H., Takeo, K., Nomura, M., Asahi, T. and Yamashita, K. *N*-Linked sugar chain structures of recombinant human lymphotoxin produced by CHO cells: The functional role of carbohydrates on the lectin-like character and clearance velocity. *Arch. Biochem. Biophys.*, **304**: 144-153, 1993.
6. Yamashita, K., Ohkura, T., Ideo, H., Ohno, K. and Kanai, M. Electrospray ionization-mass spectrometric analysis of serum transferrin isoforms in patients with carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome. *J. Biochem. (Tokyo)*, **114**: 766-769, 1993.
7. Ohkura, T., Hada, T., Higashino, K., Ohue, T., Kochibe, N., Koide, N. and Yamashita, K. Increase of fucosylated serum cholinesterase in relation to high risk groups for hepatocellular carcinomas. *Cancer Res.*, **54**: 55-61, 1994.
8. Yamashita, K. and Kobata, A. Hepatocellular carcinoma. In: J. Montreuil, H. Schachter and J. F. G. Vliegthart, ed. *Glycoproteins*. Amsterdam: Elsevier Pub.: vol 2, in press, in press.
9. Yamashita, K. and Ohno, K. Carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome: *N*-linked oligosaccharide transfer deficiency. In: J. Montreuil, H. Schachter and J. F. G. Vliegthart, ed. *Glycoproteins*. Amsterdam: Elsevier Pub.: vol 2, in press.
10. Yamashita, K. and Kobata, A. Carcinoembryonic antigen and related normal antigens. In: J. Montreuil, H. Schachter and J. F. G. Vliegthart, ed. *Glycoproteins*. Amsterdam: Elsevier Pub.: vol 2, in press.

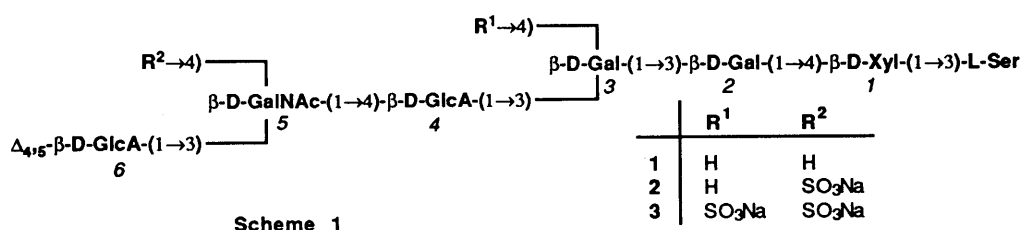
コンドロイチン硫酸の糖鎖とコアタンパク質結合部位に関する合成研究

小川智也

理化学研究所／東京大学農学部

[研究の目的]

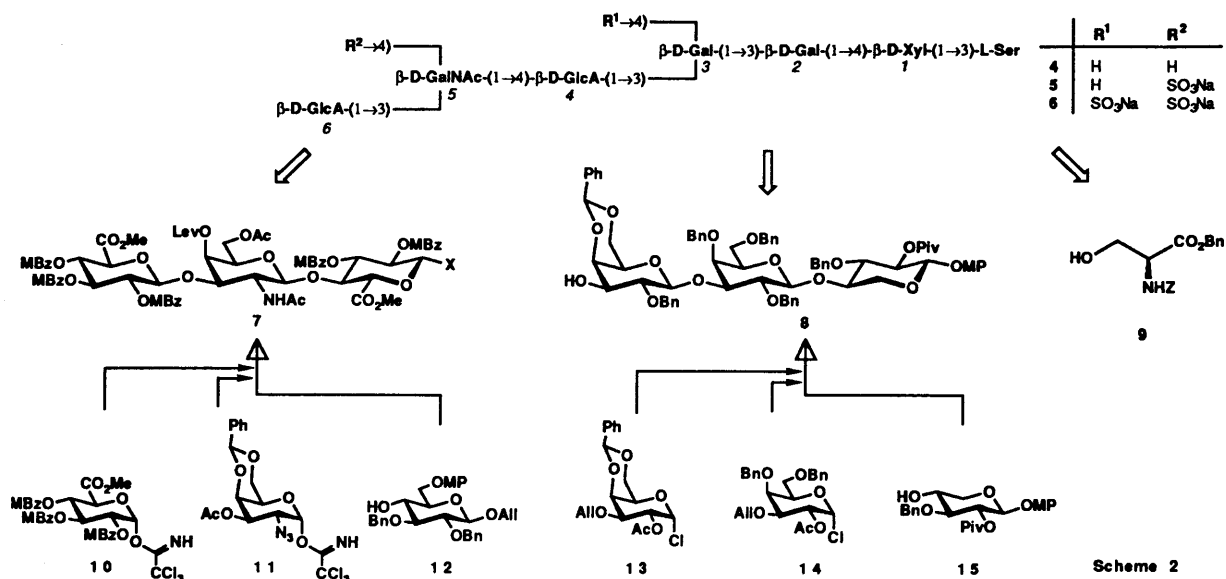
コンドロイチン硫酸、デルマトン硫酸、ヘパリン、ヘパラン硫酸などの硫酸化グリコサミノグリカン共通の糖-タンパク質結合部位 [GlcA β -(1 \rightarrow 3)-Gal β -(1 \rightarrow 3)-Gal β -(1 \rightarrow 4)-Xyl β -(1 \rightarrow 3)-Ser] を介してコアタンパク質に共有結合しているとされてきた。1988年、菅原らはラットコンドロザルコーマ組織より調製したコンドロイチン4-硫酸プロテオグリカンの糖タンパク質結合部位から3種類のグリコシルセリン(1,2,3)を単離した。それらのうち3はGalNAc(5)の4位の他にGal(3)の4位も硫酸化されている従来報告のない構造であり、この硫酸化が硫酸化グリコサミノグリカンの生合成における仕分け機構に関与している可能性を指摘した。



そこで本研究では、その特異的構造と生化学的機能の解明のため、非還元末端が飽和グルクロン酸である4,5,6の合成を行った。

[研究方法]

標的化合物4,5,6は三糖性糖供与体7と三糖性糖受容体8及びセリン誘導體9の三成分に分割した。7はグルクロン酸供与体10、ガラクトサミン供与体11、及びグルコース受容体12から、また8はガラクトース供与体13,14及びキシロース受容体15から合成することとした。なお、硫酸基導入のためにGalNAc(5)及びGal(3)の4位はレブリノイル基で保護し分子設計した。

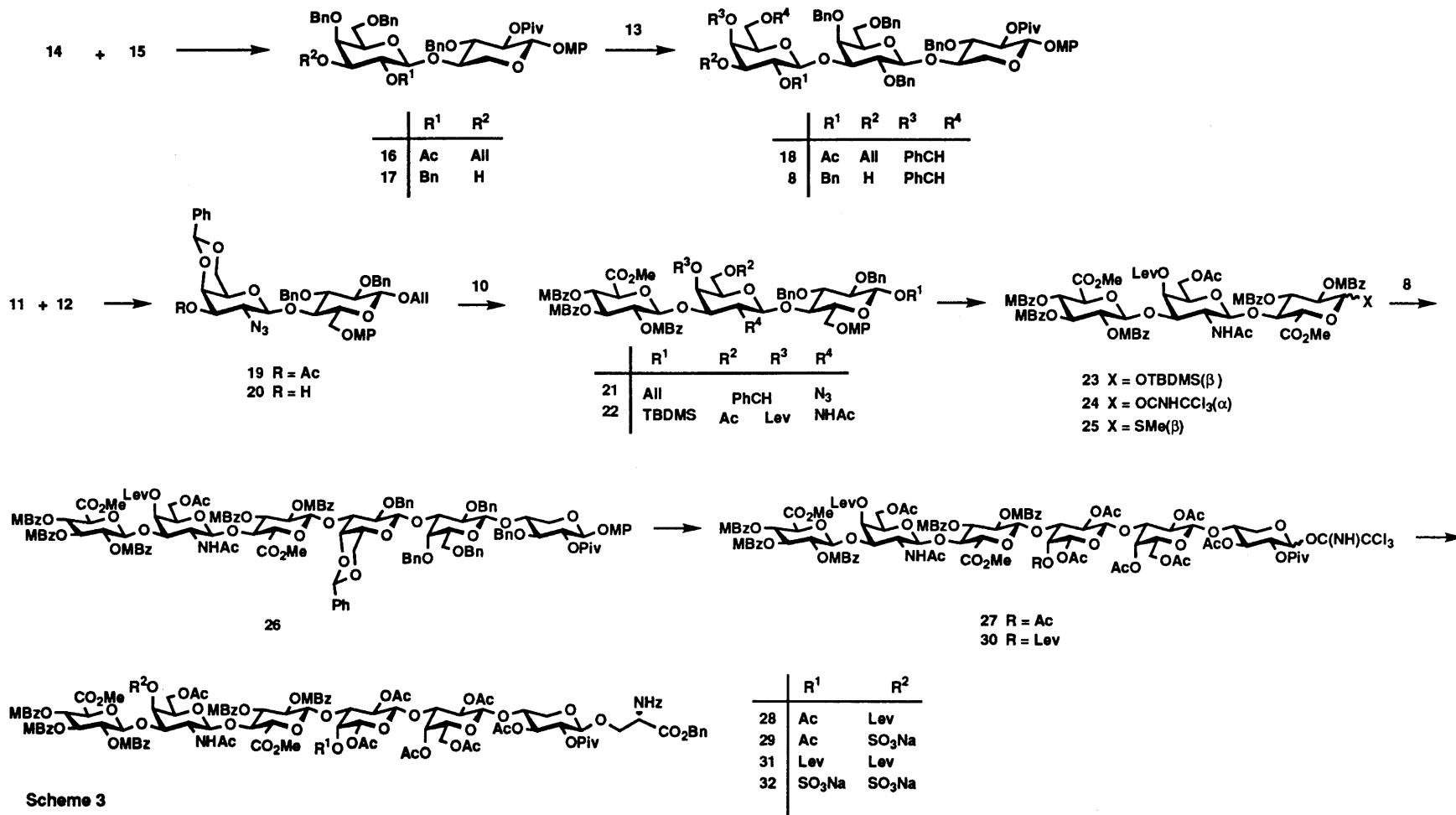


[研究の結果]

15と**14**はトルエン-塩化メチレン中AgOTf-MS4A存在下縮合させ望むβ-グリコシド結合をもつ二糖**16**を70%で得た。この時α-立体異性体は15%生成した。**16**は3段階89%で**17**に変換後、**13**と塩化メチレン中AgOTf-MS4A存在下、グリコシル化して三糖**18**を94%で得た。更に**18**は三段階で三糖性糖受容体**8**(87%)に導いた。次に三糖性糖供与体**7**は、**11**と**12**をトルエン中、TMSOTf-MS4A存在下縮合させ望むβ-グリコシド結合をもつ二糖**19**を68%で得た。この時、α-立体異性体は28%生成した。**19**は脱アセチル化後**20**とし**10**とトルエン中、BF₃OEt₂-MSAW300の存在下、グリコシル化して三糖**21**を60%で得た。更に**21**は**22**を経由して**23**とした後(13段階48%)、2段階(93%)でイミデート**24**に導いた。**24**はBF₃OEt₂存在下、Bu₃SnSMeで処理して、チオグリコシド**25**(79%)に変換した。**24**と三糖性糖受容体との縮合は低収率であったが、**25**は**8**と塩化メチレン中CuBr₂-Bu₄NBr-AgOTf-MS4A存在下縮合を行うと、75%の高収率で望む六糖**26**を与えた。**26**は4段階(73%)で六糖性糖供与体**27**に変換後、**9**と塩化メチレン中BF₃OEt₂-MSAW300存在下縮合させ**28**を60%で得た。**28**は3段階(69%)で脱保護して**4**に導いた。次に**28**は**29**を経由してモノ硫酸化された**5**に変換した。更に**26**は7段階48%で**30**に変換後、**9**と塩化メチレン中BF₃OEt₂-MSAW300の存在下縮合させ**31**を64%で得た。**31**は2段階(43%)で**32**とした後、脱保護してジ硫酸化された**6**を合成した。

[研究の考察]

以上、グリコシルセリン**4,5,6**は三糖性糖受容体**8**と三糖性糖供与体**25**との縮合



Scheme 3

により達成され、硫酸基は他のエステル基存在下、アシル基の転位なしにレプリノイル基を選択的に除去した後、位置選択的に導入することができた。

[研究業績]

- 1 Yuji Matsuzaki, Yukishige Ito, Yoshiaki Nakahara, and Tomoya Ogawa
Synthesis of branched poly-N-acetyl-lactosamine type pentaantennary pentacosasaccharide: Glycan part of a glycosyl ceramide from rabbit erythrocyte membrane
Tetrahedron Lett., **34** (1993) 1061-1064
- 2 Namgi Hong, Yoshiaki Nakahara, and Tomoya Ogawa
Stereocontrolled introduction of deuterium atoms into a phytoalexin elicitor-active β -D-glucohexaoside
Proc. Japan Acad., **69**, Ser.B (1993) 55-60
- 3 Yuji Matsuzaki, Shigeki Nunomura, Yukishige Ito, Mamoru Sugimoto, Yoshiaki Nakahara, and Tomoya Ogawa
Stereocontrolled synthesis of GD₂
Carbohydr. Res., **242** (1993) C1-C6
- 4 Fumitaka Goto and Tomoya Ogawa
Recent aspects of glycoconjugate synthesis: A synthetic approach to the linkage region of proteoglycans
Pure & Appl. Chem., **65** (1993) 793-801
- 5 Takahisa Nakano, Yukishige Ito, and Tomoya Ogawa
Synthesis of sulfated glucuronyl glycosphingolipids; carbohydrate epitopes of neural cell-adhesion molecules
Carbohydr. Res., **243** (1993) 43-69
- 6 Hiroki Kuyama, Yuko Nakahara, Tomoo Nukada, Yukishige Ito, Yoshiaki Nakahara, and Tomoya Ogawa
Stereocontrolled synthesis of chitosan dodecamer
Carbohydr. Res., **243** (1993) C1-C7
- 7 Hiroki Kuyama, Tomoo Nukada, Yoshiaki Nakahara, and Tomoya Ogawa
Cyclo-Glycosylation of (1→4)-linked glycohexaoses: Synthesis of

cyclo-lactohexaose

Tetrahedron Lett., **34** (1993) 2171-2174

- 8 Katsuya Koike, Masato Mori, Yukishige Ito, Yoshiaki Nakahara, and Tomoya Ogawa
Stereoselective total synthesis of tri- and tetrahexoside wheat flour ceramide
Biosci. Biotech. Biochem., **57** (1993) 698-702

- 9 Ursula Dabrowski, Janusz Dabrowski, Horst Grosskurth, Claus-Wilhelm von der Lieth and Tomoya Ogawa
Solution conformation of the tetrasaccharide glycoside
Xyl β 1-(Man α 1-3) $_2$ Man β 1-4Glc β 1R from the mollu-series glycosphingolipids
Biochem. Biophys. Res. Commun., **192** (1993) 1057-1065

NMR法による糖脂質の構造解析

稲垣 冬彦

(財) 東京都臨床医学総合研究所 生理活性物質研究部門

[研究の目的]

NMR法による非経験的な糖脂質糖鎖の構造解析を行うことを目的としてTQF-COSY、DIPSI-2を混合パルスとして用いたTOCSYおよびROESYの検討を行ない、有効性を確かめる。この方法を新規糖脂質の構造決定に適用するとともにセラミドの化学種をNMRスペクトルより同定できることを示す。ギランバレー症候群を惹起するPEN19型 *Campylobacter jejuni* のLPSの糖鎖構造を明らかにする。

[はじめに]

我々は二次元NMR法を用いた非経験的な糖脂質糖鎖の構造解析法を確立してきた。この方法の特徴は、(1) TOCSYによる構成単糖のサブスペクトル抽出と(2) NOESYによる構成単糖相互の結合位置の同定である⁽¹⁾。新規な骨格構造を持つ糖脂質糖鎖の構造解析についてVliegenthart等による経験的な方法を適用することは困難であるのに対し、本方法の特徴はむしろこのような解析に威力を発揮する。本研究では新たに三量子遷移フィルターを利用したCOSY、z軸方向の磁化の混合を行うTOCSY、および回転座標系でのNOEを測定するROESYの検討を行ない、糖脂質糖鎖構造解析への有効性を確かめた。これらの方法を新規糖脂質の構造決定に適用し、有効性を確かめるとともに、セラミド部分の化学種の同定に有効なシグナルを明らかにした。またギランバレー症候群を惹起するPEN19型 *Campylobacter jejuni* のLPSにはGM1と良く似た構造があることを始めて明らかにした。

[研究の結果]

(1) 三量子遷移フィルターを利用したCOSY法の検討

TOCSY (HOHAHA) を用いた測定ではアノメリックプロトンからの磁化はGal, GalNAcの場合には4位のプロトン迄しか伝わらないため、5位、6位のプロトンを検出する方法が必要となっていた。5位、6位(6a, 6b)のプロトンは相互にスピン結合で結ばれているため三量子遷移が観測される。そこで三量子フィルターを用いたCOSY法(TQF-COSY)を適用すると5位、6位のプロトンのみを選択的に観測することができる。図1は条虫より精製された糖脂質SEGLxの¹H600MHz TQF-COSYスペクトルを示している。このスペクトルにはGalの5位、6位(6a, 6b)のスピン系の他にsphingosine 1位(1a, 1b)、2位のスピン系が観測されている。糖脂質のプロトンのスピン系の中で三量子遷移が観測されるのはこれらのプロトン間のみであるから、TQF-COSYスペクトルより一義的にこれらのプロトンの帰属を行うことができた。

(2) z 軸方向の磁化の混合を行う TOCSY 法の検討

高磁場になるにつれて、TOCSY 測定時のラジオ波磁場による誘電加熱の影響は顕著となるため、広い励起周波数領域をもちかつ誘電加熱の少ない混合パルスの検討が必要となっていた。そこで DIPSI-2 を混合パルスとして用い、z 軸方向での磁化の混合を行った。観測パルスと混合パルスの磁場強度を変えて測定を行なえるようになった結果、従来用いてきた MLEV-17 に比較して 600 MHz の測定で遥かに良好な TOCSY スペクトルを得ることができた。図 2 は一例として DIPSI-2 を混合パルスに用いた SEGLx の TOCSY スペクトルのうち、アノメリックプロトンおよび sphingosine 1 位、2 位のプロトンからの展開領域を示している。磁化の混合は効率的に行なわれており、Glc については 6 位まで、Gal については 4 位のプロトンまでの展開が観測されている。

(3) 回転座標系における NOE (ROESY) 法の検討

NOESY の交差ピーク強度は分子の回転相関時間に依存する。糖脂質の場合には、NOE 強度は比較的弱いため NOE の測定が困難な場合もある。そこでピーク強度が回転相関時間に依存しない ROESY の検討を行なった。NOESY に比較して強い交差ピーク強度を与え、オリゴ糖の場合と同様に ROESY は良好な結果を与えることが判った。ROESY スペクトルに観測された残基内、残基間の交差ピークを同定することにより SEGLx の構造を決定した。

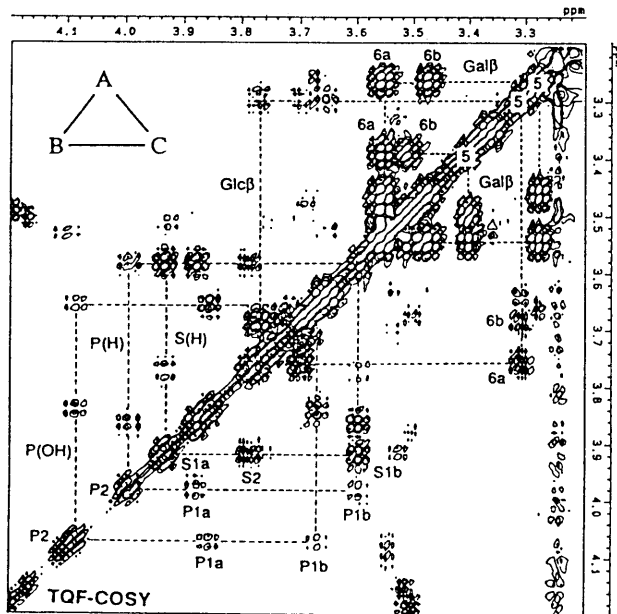


図 1. SEGLx の三量子遷移フィルターを用いた COSY スペクトル。糖の 5 位、6 位および sphingosine 1 位、2 位のスピンの系が選択的に観測されている〔鎖線で示す〕。

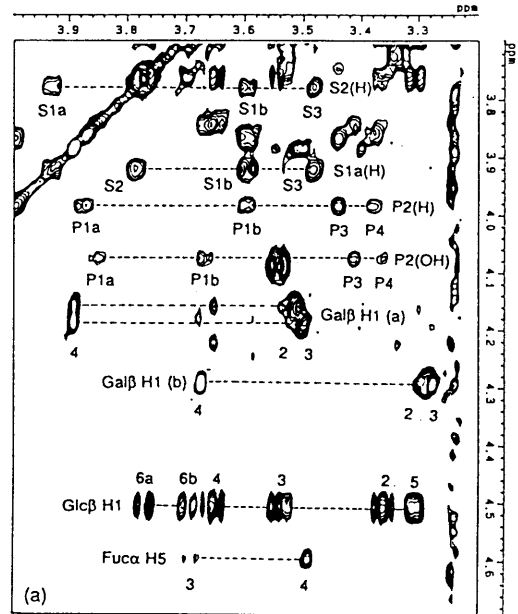


図 2. DIPSI-2 を混合パルスとして用いた SEGLx の TOCSY スペクトル (混合時間は 100 msec)。スピンの系の展開を鎖線で示す。

(4) NMR法によるセラミドの化学種の同定

sphingosineにはsphingenine, sphinganine, phytosphingosineの三種の化学種が、脂肪酸部分は2位が水酸化受けたものと、受けないものの二種が考えられる。これらの化学種の差異を反映し糖脂質は異なるNMRスペクトルを与えると期待される。図3はバフンウニの卵より精製された糖脂質 (GL-5) の糖鎖領域のNMRスペクトルである。実際G1cβのアノメリックプロトンおよびsphingosineの2位のプロトンは強度比7:3の二本に分裂している。化学分析よりGL-5はphytosphingosineのみを有すること、脂肪酸2位が水酸化受けないものと受けたものの比は7:3であることが報告されている⁽²⁾。したがってNMRスペクトルと対応させると図3に示す帰属が確定する⁽³⁾。NMRスペクトルは脂肪酸2位の水酸化の程度を知る良い指標となる。SEGLxでも化学種の差異に基づくアノメリックプロトンシグナルの分裂が観測された(図4)。SEGLxのTOCSYスペクトルの解析よりphytosphingosine(P), sphinganine(S) および脂肪酸2位の水酸化の有無に伴ないシグナルがシフトすることが判った。それぞれの2位と3位の交差ピークの積分強度より、P(OH):P(H):S(H)=2:4:4の比で存在する(括弧内は脂肪酸2位の水酸化の有無を示す)。この様な存在比を反映してGα1β, G1cβのアノメリックプロトンも三本のシグナルに分離して観測される。以上、NMR法によりセラミドの化学種を同定できることが判った。

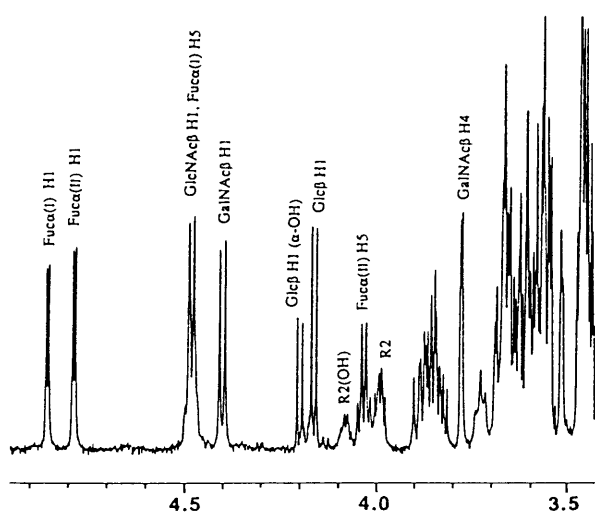


図3. GL-5のアノメリックプロトン領域の600MHz¹H NMRスペクトル。R2(OH)は脂肪酸2位が水酸化されたsphingosine 2位のプロトンを示す。

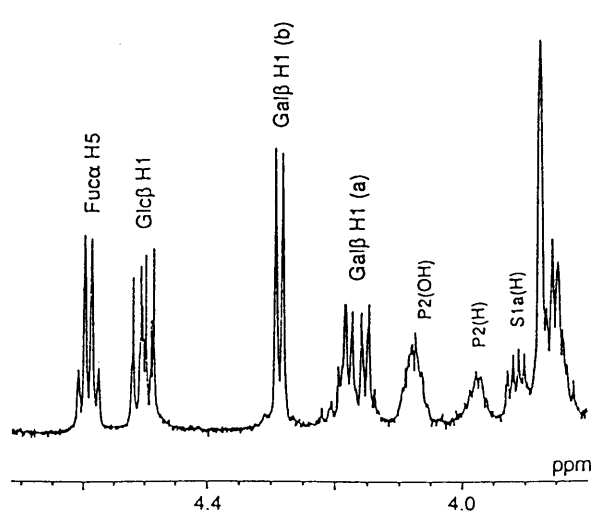


図4. SEGLxのアノメリックプロトン領域の600MHz¹H NMRスペクトル。P、Sはそれぞれphytosphingosine, sphingosineを示す。

(5) 糖鎖認識の分子機構

ギランバレー症候群 (GBS) はPEN 19型の血清型を持つ *Canpylobacter jejuni* の感染により惹起される。上気道感染や胃腸炎などの前駆症状を呈した後、1週間～3週間後に運動麻痺が出現する。結漿交換で症状が改善されることから自己抗体の関与が考えられており、特にGM1に対する抗体価の上昇や、GM1を投与された患者にGBSを発症した例が報告されている。血清型の分類は耐熱性抗原に基づいており、リポ多糖 (LPS) の構造の違いによると報告されている。そこで *C. jejuni* (PEN 19型) よりLPSを精製し、LPSの糖鎖構造をNMR法により解析した結果、Galb1-3GalNAcb1-4(NeuAca2-3)Galb1-2Hepan の構造を持つこと、この糖鎖はLPSコアより露出していることが明らかとなった。このオリゴ糖鎖の非還元末端4糖の構造はGM1の非還元末端4糖の構造と完全に一致する。以上より、GBS発症の機序は *C. jejuni* (PEN 19型) の感染によりLPSに対する抗体が産生され、そのエピトープ構造が神経系の構成成分であるGM1の糖鎖構造と一致するために抗体が神経系に作用して発症すると考えられる (4)。

謝辞 本研究を行なうにあたり種々御討議いただきました(財)東京都臨床医学総合研究所鈴木明身部長に感謝致します。SEGLxを提供してくださいました北里大学医学部玉井洋一教授、GL-5を提供してくださいました東京工業大学理工学部星元紀教授に感謝致します。またGBSの研究は東京医科歯科大学、宮武教授、飯田教授、結城博士との共同研究です。

文献

- (1) F. Ingaki, *Magnetic Resonance in Chemistry*, 30, S125-133 (1992).
- (2) H. Kubo et al., *J. Biochemistry*, 112, 281-285 (1992).
- (3) F. Inagaki et al., *J. Biochemistry*, 112, 286-289 (1992).
- (4) N. Yuki et al., *J. Exp. Med*, 178, 1771-1775 (1993).
- (5) H. Kitagawa et al., *J. Biochem.*, 114, 504-508 (1993).

糖鎖を認識する細胞接着分子

入村達郎

東京大学薬学部 生体異物免疫化学教室

[研究の背景]

C型レクチンは、糖またはペプチドに結合する認識分子として大きなファミリーを形成している。相同性を持つ糖結合部位(CRD)を有し、ここに配位したカルシウムイオンが糖結合構造の保持に必須である。動物のC型レクチンの一次構造はこれまで、Drickamerらを中心に解析が進められ、プロテオグリカン(アグレカン)型、肝レクチン型、コレクチン(コラーゲンとの融合蛋白)型、セレクチン型、肺胞マクロファージのマンス受容体型、等が見出された。肝レクチン型のC型レクチンには、私共が研究しているマクロファージのガラクトース/N-アセチルガラクトサミン結合型レクチン、II型Fcεレセプター、ナチュラルキラー細胞マーカーNKG2、等があり、何れも2型の膜貫通蛋白である。私共の研究室ではマウスの腫瘍細胞傷害性マクロファージからガラクトース/N-アセチルガラクトサミン結合型C型レクチン(MMGL)のcDNAクローニングに成功し、動物細胞における強制発現を行なった。これまで、このタイプのC型レクチンが細胞接着分子として機能しているという考えはあまり一般的ではなかった。そこで私共はマクロファージのガラクトース/N-アセチルガラクトサミン結合型C型レクチン分子の構造とその認識する糖鎖分子の構造、さらには分子免疫学的、細胞生物学的な機能を検証していこうと考えている。

[研究の目的]

(1) MMGLが特異的な細胞接着分子であることを証明する。(2) MMGLの糖鎖結合特異性を腫瘍細胞の認識という細胞生物学的な機能に着目しつつ解析する。(3) MMGLに対するモノクロナル抗体を作製し、この分子の機能や組織化学的な解析に用いる。(4) MMGLの組織内分布とその病理的な変化の解析。(5) ヒトマクロファージのガラクトース/N-アセチルガラクトサミン結合型C型レクチン(HML)のcDNAクローニングを行なう。(6) HMLのゲノムDNAクローニングとその構造解析を行なう。

[研究の方法と結果]

マウスマクロファージの種々の機能がMMGLの可溶性リコンビナント体を過剰量共存させることによって阻害されるかどうか検証した。炎症性マクロファージはガラクトースを末端に持つ糖蛋白の細胞内への取り込みを行ない、これは可溶性リコンビナント体で阻害された。しかし、同じマクロファージ集団のマストサイトーマ細胞との接着は可溶性リコンビナント体で阻害されなかった。一方、がん細胞傷害性マクロファージとマストサイトーマ細胞との接着、及び細胞傷害は可溶性リコンビナント体で阻害された。これらの結果は、炎症性マクロファージとがん細胞傷害性マクロファージという二つの異なるマクロファージ集団においてMMGLが全く異なる機能を有していることを強く示唆している。これらの点を更に明確にする目的で、MMGLの cDNAを発現ベクターに組み込み、CTLL-2細胞をレシピエントにして安定な発現細胞の作製に成功した。

MMGLの可溶性リコンビナント体をビーズ上に不溶化し種々の糖蛋白や糖ペプチドとの相互作用を比較検討することによってどの様な糖構造と親和性が高いか検討した。MMGLはN-結合型糖鎖としては、4本アンテナ型のシアル酸のないものに高い親和性を有した。表面プラスモンレゾナンス法によってMMGLとガラクトースを末端に持つN-結合型糖鎖との結合定数と解離定数を求めた。植物レクチンに比べると、結合が遅いが解離が起こりにくいことが判明した。O-結合型の糖鎖単独では調べたかぎりには親和性がなかったが、O-結合型の糖鎖を含む糖ペプチドに強い親和性のあるものを見いだした。ヒトグリコフォリンのN-末端のオクタペプチドで3本のO-結合型四糖糖鎖を含むものを用いて糖鎖の改変後のアフィニティーの変化を検討したところ、Thomsen-Freidenreich抗原及びTn抗原という良く知られた腫瘍抗原に親和性が高いことが判明した。

Tn抗原を発現しているがん細胞に対してMMGLの可溶性リコンビナント体が結合性が高く、またMMGL発現マクロファージの接着性が高いことを、細胞表面のO-結合型の糖鎖を改変することによって証明した。具体的には、アリル-N-アセチルガラクトサミニドの存在下でマストサイトーマ細胞を培養し、Tn抗原糖鎖の発現を確認した後に結合実験及び接着実験を行なった。

マウスマクロファージレクチンに対するブロッキング抗体をスクリーニングすることを目的として、ELISA法によるMMGLのアッセイ法を確立した。この方法では、固層化したMMGLへの蛍光標識ガラクトースポリ-L-リジンの結合を測定した。このアッセイ系を用い、ラットで作製したハイブリ

ドーマのスクリーニングを行ない、ブロッキング抗体及びノンブロッキング抗体を得た。

MMGLのマウス臓器における発現状態を界面活性剤による抽出物を用いて、アフィニティークロマトグラフィーとイムノプロット法の組み合わせで比較した。MMGLはリンパ節、皮膚、肺、骨格筋、心臓における発現が認められた。モノクロナル抗体を用いた免疫組織化学染色により、マクロファージの特定の集団のみがMMGLを発現していることを明かにした。またそれらの分布パターンが腫瘍の存在によって影響をうけることが確かめられた。

ヒト末梢血由来の単球から分化させたマクロファージのcDNAライブラリーから、ヒト肝臓レクチンとの相同性に基づいてcDNAを得た。三種のcDNAが得られたが、全ての全長の配列を決定したところ配列は同一で、挿入部分または欠失部分を含み、一つの遺伝子由来のスプライシングバリエーションである可能性が強いことが解かった。これらのひとつを発現ベクターに組み込んでCOS-1細胞にトランスフェクトしたところ、cDNA配列に基づく合成ペプチドに対するポリクロナル抗体で検出される分子量約4万の蛋白の発現を見いだした。この蛋白はガラクトースアガロースに対する特異的な結合性を有していたことから、ヒトマクロファージのガラクトース/N-アセチルガラクトサミン結合型レクチン(HML)に相当するものである可能性が強い。

コスミドを用いて作製したヒトゲノムDNAライブラリーから、上記したHMLのcDNAを用いてHMLゲノムDNAのクローニングに成功した。その構造から、三種のHML cDNAが一つの遺伝子由来のスプライシングバリエーションと結論された。

[研究の考察]

私共も研究を行なっているP-セレクトリン及びE-セレクトリンに加えて、蛋白のカルボキシル末端を細胞表面側に持つC型レクチンにも細胞接着とそれに伴う細胞間のシグナル伝達が見られることが、マクロファージレクチンの研究から確かめられつつある。特に、MMGLの特異性がいわゆる癌抗原を認識する化のように見える点は注目され、cDNAクローニングによって大量調製が可能になったHMLの結合特異性がいかなるものであるのかが注目される。一方、MMGLに対するブロッキング抗体の作製に成功したことで、この分子の*in vivo*における機能の解析が可能になった。これらの進歩は、糖鎖結合性接着分子の腫瘍生物学的な役割を解明するうえで極め

て重要なものであると考える。

[研究業績]

1. Dohi, D. F., Sutton, R. C., Frazier, M. L., Nakamori, S., McIsaac, A. M., Irimura, T. Regulation of sialomucin production in colon carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* 268: 10133-10138, 1993.
2. Nagata, K., Todoroki, N., Katagiri, Y., Tanoue, K., Yamazaki, H., Hanai, N., Tsuji, T., Irimura, T. Activated platelets induce superoxide anion release by monocytes and neutrophils through P-selectin (CD62). *J. Immunol.*, 151: 3267-3273, 1993.
3. Nakamori, S., Kameyama, M., Imaoka, S., Furukawa, H., Ishikawa, O., Sasaki, Y., Kabuto, T., Iwanaga, T., Matsushita, Y., Irimura, T. Increased expression of sialyl Lewis-X antigen correlates with poor survival in patients with colorectal carcinoma: clinicopathological and immunohistochemical study. *Cancer Res.*, 53: 3632-3627, 1993.
4. Ioannides, C. G., Fisk, B., Jerome, K. R., Irimura, T., Wharton, J. T. Finn O. J. Cytotoxic T Cells from ovarian malignant tumors can recognize polymorphic epithelial mucin core peptides. *J. Immunol.*, 151: 3693-3703, 1993.
5. Kawashima, H., Yamamoto, K., Osawa, T., and Irimura, T. Purification and characterization of UDP-GlcNAc:Gal β 1-4Glc(NAc) β 1,3-N-acetylglycosaminyltransferase (Poly-N-acetyllactosamine extension enzyme) from calf serum. *J. Biol. Chem.*, 268: 27118-17126, 1993.
6. Nakamori, S., Ota, D. M., Cleary, K. R., Irimura, T. MUC1 mucin expression as a marker of progression and metastasis of human colorectal carcinoma. *Gastroenterology*, 106: 353-361, 1994.
7. Takeuchi, K., Tsuji, T., Hakomori, S., Irimura, T. Intercellular adhesion induced by anti- α 3 integrin (VLA-3) antibodies. *Exp. Cell Res.*, 211, in press, 1994.
8. Imai, Y., Irimura, T. Quantitative measurement of carbohydrate binding activity of mouse macrophage lectin. *J. Immunol. Meth.*, in press, 1994.

9. Konami, Y., Ishida, C., Yamamoto, K., Osawa, T., Irimura, T. A unique amino acid sequence involved in the putative carbohydrate-binding domain of a legume lectin specific for sialylated carbohydrate chains. *J. Biochem.* in press, 1994.
10. Shirotani, K., Taylor-Papadimitriou, J., Gendler, S. J., Irimura, T. Transcriptional regulation of MUC1 gene in colon carcinoma cells by a soluble factor: identification of a regulatory element. *J. Biol. Chem.*, in press, 1994.
11. Irimura, T., Kawashima, H. Detection and characterization of glycoprotein carbohydrate chains after electrophoretic separation. Dumber, B., ed. *Protein Blotting; A Practical Approach*; 1993.
12. Yamamoto, K., Konami, Y., Kusui-Kawashima, K., Osawa, T., Irimura, T. cDNA Cloning and expression of plant lectins from the legume family. *Laboratory Manuals*; 1993.
13. Irimura, T., Nakamori, S., Matsushita, Y., Taniuchi, Y., Todoroki, N., Tsuji, T., Izumi, Y., Kawamura, Y., Hoff, S. D., Cleary, K. R., Ota, D. M. Colorectal cancer metastasis determined by carbohydrate-mediated cell adhesion: Role of sialyl-Le^x antigens. *Sem. Cancer Biol.* 4: 319-324, 1993.
14. Irimura, T. Cancer metastasis determined by carbohydrate-mediated cell adhesion. Ceriani, R. L., ed. *Breast Cancer Research and Immunology*. Plenum. in press, 1994.
15. Irimura, T., Izumi, Y., Kawamura, Y., Nakamori, S., Fidler, I. J., Cleary, K. R., Ota, D. M. Carbohydrate-mediated cell adhesion as a determinant of colorectal cancer metastasis. *Cancer Bulletin*, in press, 1994.