

論文審査結果の要旨

本研究は神経細胞の発生・分化あるいはシナプス形成などのメカニズムを解明することを目的としている。Bt₂cAMPにより分化誘導させたNG108-15細胞を神経細胞のモデルとして使用することにより、神経細胞機能に重要な役割を担っているカルシウム (Ca²⁺) ならびにナトリウムイオン (Na⁺) チャネルおよび受容体の機能・性質の変化について検討している。

第1章では、高濃度 KCl 適用による細胞内遊離 Ca²⁺濃度([Ca²⁺]_i)変化を指標として、神経細胞への分化過程に神経伝達物質の遊離に重要な電位依存性 Ca²⁺チャネル(VSSCs)の機能・性質が変化するかどうかを検討している。そして、分化細胞における高濃度 KCl 適用による[Ca²⁺]_iの上昇反応の増大は、主にL型 Ca²⁺チャネルの up-regulation による可能性を示した。

第2章では、VSSCsのアゴニストである veratridine(Vtd)適用による細胞内遊離 Na⁺濃度([Na⁺]_i)変化を指標として、神経細胞への分化過程に活動電位発生など電気的興奮に重要な電位依存性 Na⁺チャネル(VSSCs)の機能・性質が変化するかどうかを検討している。そして、分化細胞における Vtd 適用による[Na⁺]_iの上昇反応の増大は、主に TTX・感受性 Na⁺チャネルの up-regulation による可能性を示した。

第3章では、神経細胞への分化過程に神経伝導・伝達は重要であることが想像できる。本章では種々の神経伝達物質による[Ca²⁺]_i変化を指標として、神経細胞への分化過程に神経伝達物質の反応性が変化するかどうかを検討している。そして、serotonin(5-HT)および bradykinin(BK)適用による[Ca²⁺]_iの上昇反応は未分化細胞よりも分化細胞において有意に増大したが、他の神経伝達物質による反応は未分化および分化細胞のいずれにおいても認められなかったことを明らかにしている。そして、分化細胞における5-HTおよびBK適用による上昇反応の増大は、5-HT₃型およびBK B₂型受容体の up-regulation による可能性を示した。

本研究により得られた新たな知見は神経細胞の発生・分化あるいはシナプス形成に関するメカニズムの解明およびカルシウム、ナトリウムイオンチャネル、5-HT、BKの果たす生理学的役割について非常に重要であり、当該研究分野においても高い評価が得られるものと考えられる。

氏名	なか じま かず き 中 嶋 和 紀
学位の種類	博 士 (薬学)
学位記番号	薬 第 5 9 号
学位授与の日付	平成 18 年 3 月 22 日
学位授与の要件	学位規程第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	糖鎖-タンパク質間相互作用に関する研究
論文審査委員 (主 査)	教 授 掛 樋 一 晃
(副主査)	教 授 池 川 繁 男
(副主査)	教 授 市 田 成 志

論文内容の要旨

ヒトゲノム解析が完了し、ポストゲノム研究としてプロテオーム解析、細胞、組織で生産される全タンパク質の機能解析が、世界規模で進められている。プロテオーム解析では、タンパク質の発現解析やタンパク質間相互作用の解析、タンパク質の立体構造解析などの広範囲な研究が行われている。しかし、タンパク質は翻訳後に、リン酸化、アセチル化あるいは糖鎖修飾などの様々な二次修飾を受けて機能を発現する場合が多く、タンパク質の翻訳後修飾の解析もプロテオーム解析において重要な課題となっている。特に糖鎖による修飾は全タンパク質の半数以上が受けている普遍的な修飾反応であるにもかかわらず、修飾される糖鎖の解析は困難を極めるため、糖鎖修飾の役割は未だ解明されていない部分が多い。

糖鎖は様々な糖転移酵素と関連酵素の組み合わせにより生合成される。現在までに糖転移酵素をコードする160種以上の糖鎖遺伝子が日本人によりクローニングされている。遺伝子操作技術の進歩に伴って目的遺伝子を操れるようになり、目的の糖鎖遺伝子を欠損あるいは発現させたノックアウトマウスやトランスジェニックマウスの表現形質から糖鎖機能を解析できるようになった。現在、わが国では、個々の糖鎖遺伝子について網羅的な糖鎖機能解析が多くのプロジェクトのもとで遂行され、大きな成果を生みつつある。しかし、糖鎖部分の生合成には糖転移酵素や糖鎖切断酵素など様々な酵素群が関与するため、糖鎖遺伝子の一義的な解析のみでは糖鎖機能を十分に理解できない場合がある。

細胞間認識には、細胞表面糖鎖と他の細胞表面に存在する糖鎖結合タンパク質との相互作用が深く関与する。病気の感染は、微生物、ウイルスあるいは原虫と宿主細胞間との細胞間認識により誘発される。例えば、インフルエンザの感染は、ウイルス上に存在するヘマグルチニンと、宿主細胞表面に露出するガングリオシドのシアロ糖鎖との相互作用が関与する。ウイルスのタイプによってヘマグルチニンの糖結合特異性は大きく異なる。ヒトで世界的な流行を起こしたインフルエンザ A 型ウイルスは、シアリルラクト系 II 型糖鎖(NeuAc α 2-3/6Gal β 1-4GlcNAc β 1-)に対して強く結合する。しかし、シアリ酸が 2 個以上連結したジシアロ糖鎖(NeuAc α 2-8NeuAc α 2-3Gal β 1-) やシアリ酸が糖鎖内部のガラクトースに結合した[Gal β 1-3GalNAc β 1-4(NeuAc α 2-3)Gal β 1-4Glc β 1-]には結合しない。

上記のインフルエンザウイルスのヘマグルチニンを例に述べたように、糖結合性タンパク質は微妙な糖鎖構造の違いを認識し結合する。このような糖鎖-タンパク質間相互作用の解析法として、タンパク質を固定したカラムを用いるフロンタルアフィニティークロマトグラフィー(FAC)がよく用いられる。FACは相互作用における結合定数の算出などの定量的な相互作用解析が可能な手法であり、「ヘクト・バイ・ヘクト」のコンセプトのもとでFACによる糖鎖-レクチン間相互作用の基礎データが蓄積され、糖鎖プロファイリングのための基盤情報が国内で構築されつつある。一方、固相に多種類の微量糖鎖を集積したマイクロアレイ技術もまた、タンパク質に対する相互作用を再現性よく一斉解析できるように注目されている。

以上のような背景から、本論文では、キャピラリー電気泳動と時間分解蛍光法を用いて糖鎖-タンパク質間相互作用解析を検討した。

第1部では、高感度かつ高分解分離能をもつ技術であるレーザー励起蛍光検出キャピラリー電気泳動を利用して、糖鎖を混合物のまま、相互作用を一斉に高感度解析する手法を検討した。

第1章では、相互作用解析のために基礎的な分析条件を確立した。ポリビニルアルコールで内面を被覆した市販のN-CHOキャピラリーを用い、タンパク質を含有する泳動緩衝液中で8-アミノピレン-1,3,6-トリスルホン酸(APTS)、2-アミノ安息香酸(2AA)または3-アミノ安息香酸(3AA)により蛍光標識した糖鎖混合物をアフィニティー電気泳動する条件を使用した。モデルとして、小麦胚芽レクチン(WGA)とAPTS標識したN-アセチルグルコサミンオリゴマーとの相互作用を解析した結果、3糖、4糖および5糖に対する結合定数はそれぞれ $0.56 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ 、 $1.05 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ 、 $2.54 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ でありDamらの報告とよく一致した。本解析法は、Kaを算出する上で糖鎖濃度を知る必要がないため、正確な糖鎖濃度を定量することが難しい生体由来の糖鎖混合物-タンパク質間相互作用の解析に特に有用であった。

第2章および第3章では、レクチンに対する親和性の差を利用する糖鎖プロファイリング法を検討した。プロファイリングには、糖結合特異性が既に明らかにされている14種類のレクチン(ConA, WGA, PVL, TGA, DSA, PHA-E₄, RCA₁₂₀, PA-I, RSL, AAL, UEA-I, SSAおよびMAM)を使用し、適切な濃度に調製したレクチンを使用することにより、糖タンパク質由来N結合型糖鎖の糖鎖構造の微妙な違いを効率よくプロファイルすることに成功した。例えば、ConAとWGAはハイマンノース型糖鎖、混成型糖鎖および複合型糖鎖のサブタイプを識別できた。また、ConA, TGAおよびDSAは複合型糖鎖の分枝を、そしてWGA, PVL, RCA₁₂₀, SBA, PA-I, SSAおよびMAMは非還元末端に露出した糖残基を、AAL, RSL, PHA-E₄は周辺部分構造をプロファイルできるレクチンであった。さらに第3章では著者は、糖鎖プロファイリングにおいて、あらかじめ糖鎖とレクチン間の相互作用データをライブラリーとして蓄積することが重要であると考え、24種類のミルクオリゴ糖とレクチン間との相互作用を網羅的に解析し、相互作用のライブラリーを構築した。ライブラリーには、レクチン非添加時の糖鎖の泳動時間とレクチン添加時における泳動時間の変化を整理した。ライブラリーを用いて、ウシ初乳由来の中性ミルクオリゴ糖の分析を行った結果、7種類の糖鎖をライブラリーのデータをもとに同定することに成功した。同定されなかった2種類の未知糖鎖はCAEの結果に基づいて構造推定することに成功した。したがって、本法はミルクオリゴ糖を含めた生体由来の微量糖鎖の構造同定法や部分構造推定法として有用な手法である。

論文審査結果の要旨

第4章では、構造既知の糖鎖ライブラリーを用いて生体中のレクチンを探索する方法を検討した。モデルとして、ニホンワトコ樹皮およびチューリップ球根に含まれるレクチン活性の検出を検討した。ワトコ樹皮より調製したタンパク質粗抽出物存在下でアフィニティー電気泳動を実施した結果、シアル酸結合タンパク質(SSA)の活性を検出できた。同様に、チューリップ球根に含まれるレクチン活性を探索し、詳細な糖結合特異性を検討した結果、TGAはN結合型複合型3本鎖糖鎖を強く認識するレクチンであり、非還元末端のガラクトース残基と還元末端のコア $\alpha(1-6)$ フコース残基の存在が重要であることを明らかにした。以上の結果から、本法は、レクチンのスクリーニングを行うと同時に、レクチンの糖結合特異性を明らかにできる有用な手段であることがわかった。

第2部では、時間分解蛍光法による糖鎖-タンパク質間相互作用の高感度解析法を検討した。すなわち、 Tb^{3+} とアミノベンゼン誘導体が錯体を形成し強く発蛍光する性質を利用して、アミノベンゼン誘導体で標識した糖鎖を高感度に定量できると考えた。様々なアミノベンゼン誘導体の Tb^{3+} との錯形成能を比較検討した結果、塩酸セチルピリジニウムを含む中性のミセル溶液中で、p-アミノサリチル酸(PAS)により標識された糖鎖が強く発蛍光することを見いだした。さらに、マンノオリゴ糖と ConA 間の相互作用解析に応用した結果、スキッチャード解析から $9.23 \mu M$ という解離定数を求めることができた。第1部で既に述べたように、アミノベンゼン誘導体は、CE や HPLC において高分離能が期待できる標識化試薬である。したがって、PAS 標識化糖鎖の分離条件を確立できれば、分離された糖鎖を回収できるようになり、回収される超微量の糖鎖を用いた糖鎖-タンパク質間相互作用解析が可能になると考えられる。

以上、著者は、(1)キャピラリー電気泳動(CAE法)、(2)時間分解蛍光法(TRF法)による糖鎖-タンパク質間相互作用解析法を検討した。CAE法は、微量の糖鎖混合物を単離精製することなく、混合物のままハイスループットに解析できる技術であった。一方、TRFは単離された超微量の糖鎖を、高感度に相互作用解析する技術としての発展が期待された。今後、二つの異なる性質をもつ相互作用解析法(CAE法とTRF法)を組み合わせることで、種々の疾患に伴う細胞表面上の糖鎖変化の検出や新たな細胞間認識機構の解明など糖鎖修飾の機能解析において有用なツールになると期待される。

本論文は、糖鎖が関与する細胞間認識機構の解明を目指し、生体由来の微量の糖鎖に対応できる糖鎖-タンパク質間相互作用解析法の開発が目的である。

糖鎖-タンパク質間相互作用解析は、キャピラリー電気泳動法と時間分解蛍光法という二つの手法を用いて検討し、次のような成果をあげている。①レーザー励起蛍光検出キャピラリー電気泳動の高感度かつ高分解分離能を利用して、糖鎖混合物を分離精製することなく、混合物のまま、相互作用をハイスループット解析する手法を開発した。すなわち、(1)糖鎖-タンパク質間相互作用の一斉解析法、(2)糖鎖-レクチン間相互作用に基づいた糖鎖プロファイリング法、(3)レクチンのスクリーニング法を開発した。(1)相互作用の反応速度論的解析では糖鎖濃度を必要としないため、本法は生体由来の糖鎖混合物とタンパク質との相互作用解析に極めて有用な手法であることを証明した。(2)また、適切なレクチンセットを用いて分析することにより、本法が糖タンパク質N結合型糖鎖の構造解析ならびに機能発現に関わる重要な部分構造の検出に利用できることを明らかにした。また確立した糖鎖プロファイリング法は、ミルクオリゴ糖など生物由来の未知糖鎖の構造解析に対応できることを明らかにした。(3)適切な標準糖鎖を使用することにより、効率よくレクチン活性を追跡できることも証明した。

②遷移金属の蛍光特性を利用した時間分解蛍光法の高感度検出能に着目し、本法と糖鎖還元末端への化学修飾法を組み合わせた高感度な糖鎖-タンパク質間相互作用解析法を開発した。そして本法が、ラジオアイソトープを用いた手法に匹敵する高感度解析法として有用であることを証明した。

これらの研究で得られた知見は、Journal of Proteome Research や Glycobiology などの一流の国際雑誌に4掲載され、国際的に高い評価を受けている。したがって、本論文は、糖鎖-タンパク質間相互作用を介した糖鎖機能解析に際して有益な指標を与えるものであり、本論文は博士(薬学)の学位論文に値するものと認める。