

氏 名 池 田 武 史

学位（専攻分野） 博士(理学)

学 位 記 番 号 総研大甲第698号

学位授与の日付 平成15年3月24日

学位授与の要件 生命科学研究科 生理科学専攻

学位規則第4条第1項該当

学 位 論 文 題 目 Characterization of Major N-linked Sugar Chain
Structures Expressed in Mouse Cerebral Cortex
during Development

論 文 審 査 委 員 主 査 教授 永山 國昭
教授 池中 一裕
教授 井本 敬二
教授 古川 鋼一（名古屋大学）

論文内容の要旨

特定の糖蛋白質に付加される N 結合型糖鎖は組織によって大きく異なる。特に脳内では他の臓器と比較して非常に多様かつ特徴的な構造を持つ糖鎖が発現しており、それらの発現パターンは時期・領域ごとに固体差なく厳密に制御されている。近年 N 結合型糖鎖生合成系に関与する様々な酵素の遺伝子欠損マウスが作製され、N 結合型糖鎖は脳の正常な発生に必須であることが明らかとされた。しかし未だ脳に特徴的な糖鎖構造がどのような生理的意義を持つのかほとんど明らかとされていない。その理由の 1 つとして糖鎖の構造レベルでの理解が不十分であることが挙げられる。脳形成過程に発現する糖鎖構造を詳細に解析することは、それらが持つ生理機能を解明するために必須であると考えられる。

そこで今回彼はマウス大脳皮質発達過程において、組織全体に発現する主要な糖鎖の構造を決定した。マウス胎生 12 日、16 日、生後 0 日、7 日、12 週齢より大脳皮質を摘出し、ヒドラジン分解で糖鎖を切り出し、ピリジルアミノ基で非還元末端を蛍光標識した。得られたピリジルアミノ化糖鎖は、ノイラミニダーゼで処理して非還元末端のシアル酸をすべて除去した後、順相 HPLC で糖鎖をサイズにより分離して、さらに逆相 HPLC で糖鎖をほぼ単一まで分離した。各 HPLC の外部標準の溶出位置から各糖鎖のマンノースユニット及びグルコースユニットを求め、2 次元マップ上にプロットした。市販の標準糖鎖と 2 次元マップ上で一致するものは、それらと co-injection することによりその構造を決定した。いずれの標準糖鎖とも一致しないものは、酵素消化や質量分析 (MALDI/TOF-MAS) によりその構造を決定した。酵素消化により構造を決定した 6 個の糖鎖のうち 1 つ (A2G1Fo(6)G'1(3)F) は脳内で発現が報告されていない新規な構造であった。陰イオン交換 HPLC により各糖鎖のシアル酸付加に関しても併せて解析を行った。

マウス脳には高マンノース型糖鎖が多く、混成型及び複合型糖鎖には以下のような特徴が認められた。

- (1) ガラクトシル化のレベルが低く、N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) が非還元末端に存在する不完全なプロセシング産物が多い。
- (2) 側鎖に LewisX 構造、コアフコース、バイセクティング GlcNAc を持つ。
- (3) マンノース α 1-3 分岐側鎖の GlcNAc 残基が欠けている。
- (4) 非還元末端のガラクトース残基が β 1-4 だけでなく、 β 1-3 結合を介して GlcNAc に付加される。

マウス大脳皮質発達過程において、高マンノース型糖鎖の中で M5A が顕著な増加を示した。混成型及び複合型糖鎖では、胎生 12 日の時点ではあまり脳に特徴的な糖鎖構造は認められなかった。胎生 12~16 日では、脳室帯で神経芽細胞が盛んに産生され、放射状グリアと呼ばれる構造に沿って髄膜側へと移動を行っている。この時期に β 1-4 ガラクトース転移酵素 1 の発現が急激に低下し、それに伴って非還元末端に β 1-4 結合したガラクトースを持つ糖鎖が減少し、GlcNAc でプロセシングが停止した糖鎖が増加した。神経細胞の産生が減少しアストロサイトの産生が始まる胎生 16 日では、バイセクティング GlcNAc、コアフコース、LewisX 構造などの脳に特徴的な構造を持つ糖鎖の発現が徐々に増加を開始した。オリゴデンドロサイトの産生が始まる生後 0 日には、非還元末端に β 1-3 結合したガラクトースを持つ糖鎖の発現が認められた。アストロサイトの産生が減少し、

シナプス形成とそれに続くミエリン形成が盛んに起こる生後7日では、マンノース α 1-3分岐側鎖のGlcNAc残基が欠けた糖鎖の発現が認められ、バイセクティングGlcNAc、コアフコース、LewisX構造を持つ糖鎖の発現がピークを迎えた。これらの結果から脳に特徴的な糖鎖構造は、脳発達過程においてそれぞれ異なった生理的役割を担っていると考えられた。

論文の審査結果の要旨

本論文はマウス脳発生過程における大脳皮質細胞の化学的変化を追求したものである。化学物質の内、特に細胞表面の N 型結合糖鎖（アスパラギン側鎖結合）が胎児と成長初期において大脳にどのような種類と量で発生してくるのかをクロフトグラフィーの手法を主に用いて解析したものである。

糖蛋白質に付加される N 型糖鎖は組織によりその種類が異なり、脳内において特に多様かつ特異的なことが知られている。この多様性から糖鎖は一種の細胞標識として脳の各種の発生や移動に関与していると考えられている。しかし発現する N 型糖鎖の全種類の同定や多種の糖鎖の脳発生段階における定性、定量分析はこれまで行われてこなかった。1 つには糖構造を調べ、かつ特定糖鎖の発現量を定量的に追跡する良い手段がなかったからである。申請者はこの困難な問題を糖鎖同定法の手法開発とその手法によるマウス胎生 12 日、16 日、生後 0 日、7 日、12 週の発達過程解析に適用した。

糖鎖同定はヒドラジン分解糖鎖末端をピリジルアミノ基で蛍光標識し、ノイラミダーゼによるシアル酸除去の後、2 次元 HPLC により行った。2 次元 HPLC の一次元目は順相 HPLC による分子量分画を、2 次元目は逆相 HPLC で疎水性構造による分離を行った。この 2 次元 HPLC で最終的に分画スポットは N 型糖一種であることを確かめた。この 2 次元 HPLC 上で市販の標準糖鎖との比較によりまず既知のもの分類を行った。次に未知のものについては酵素消化や質量分析により同定を行った。これらの未知のうち A2G1Fo(6)G'1(3)F は新規な構造であった。

同定された糖鎖についてその発生段階における発現量が極めて厳密に制御されていることが 2 次元 HPLC の定量からわかった。すなわち個体差は実験範囲で認められなかった。マウス脳発生過程の糖鎖は高マンノース型糖鎖が多く、混成型、複合型糖鎖には以下の特徴が認められた。

- (1) ガラクトシル化のレベルが低く、N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) が非還元末端に存在する不完全なプロセッシング産物が多い。
- (2) 側鎖に LewisX 構造、コアフコース、パイセクティング GlcNAc を持つ。
- (3) マンノース α 1-3 分岐側鎖の GlcNAc 残基が欠けている。

またいくつかの糖鎖の発現開始、増加、低減過程がたとえばアストロサイトやシナプス形成等の脳内構造の発達と同期していることが認められた。

これらの知見はひとり糖鎖化学のみならず大脳の発生過程研究においても一級の新規発見であると考えられる。審査委員会は全員一致で学位論文として充分ふさわしいものであると判定した。本博士論文は現在投稿中である。

審査員 4 名全員出席のもとに博士論文の口頭発表を聞き、口頭試問を行った。本研究は脳発生過程の生化学研究である。マウスを用いて大脳皮質細胞表面の N 型結合糖鎖の種類と構造につき経時的変化の解析を行った。胎生 12 日、16 日、生後 0 日、7 日、12 週齢のマウスの脳から N 型糖鎖を抽出し、その構造を同定し発現量の変化を追跡した。その結果マウス脳は高マンノース型糖鎖が多く特に M5A 型マンノース糖鎖の大脳皮質における顕著な増加が認められた。その他混成型、複合型糖鎖が発生の各時期に特徴的な増減のパターンを示した。

このような知見を全く新しいもので、脳発生と糖鎖による細胞標識が何らかの因果関係を持つことを伺わせる。

論文発表は日本語で行われたが、論文自体は英語で書かれており十分な語学力を認定できた。