

## 論文の内容の要旨

論文題目 ペルオキシゾーム病における糖脂質代謝異常の解明

指導教官 五十嵐 隆 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成9年4月 進学

医学博士課程

生殖発達加齢医学専攻

氏名 辰巳 憲

ペルオキシゾーム病とは細胞内小器官であるペルオキシゾームの形成や代謝機構に異常をきたす遺伝性疾患の総称であり、臨床症状により Zellweger 症候群 (ZS)、乳児型 Refsum 病 (IRD)、新生児型 Adrenoleukodystrophy (NALD)の三種類に分類される。ペルオキシゾームの機能は、多岐にわたり、その結果としてペルオキシゾーム病においては中枢神経系において発生期における神経細胞の移動障害 (migration arrest) および分化の異常や、ミエリンの低形成、PAS 陽性の封入体の存在などの病理学的所見を呈する。

このような中枢神経系の障害とペルオキシゾーム欠損によって生じる生化学的異常との関連は未だ解明されていないため、チャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO) より確立されたペルオキシゾーム

欠損変異株(Z65)を用いて対照の CHO-K1 細胞の極長鎖脂肪酸・及びその他の脂質組成変化を検討したところ、グルコシルセラミド、ガングリオシドなどのスフィンゴ糖脂質が Z65 細胞では著明に増加し、スフィンゴミエリン等の各脂質の代謝速度も変化していた。

このスフィンゴ糖脂質は近年、細胞の認識、増殖、分化などに際し、重要な生理学的機能を持ち、大部分のスフィンゴ糖脂質はセラミドグルコシルトランスフェラーゼによって、セラミドと UDP-グルコースから合成される ceramide monohexoside (CMH)を出発点として作られる。

そこで、Z65 細胞と CHO-K1 細胞におけるセラミドグルコシルトランスフェラーゼ遺伝子の発現を比較する目的で、まず同酵素のクローニングを行い、CHO-K1 細胞へ過剰発現させ、クローニングした酵素の活性を測定した。さらにこの遺伝子の一部をプローブとして、ペルオキシゾーム欠損 Z65 細胞の遺伝子発現の変化を検討した。その結果同酵素の遺伝子は 394 アミノ残基からコードされており、予想される質量は 45kDa と考えられた。ヒトとの相同性は塩基配列の点で 92.3%、アミノ酸配列の点で 98.7%であった。

クローニングされたセラミドグルコシルトランスフェラーゼ cDNA の一部をプローブとしてノーザン・ブロットを行ったところ、Z65 細胞では CHO-K1 細胞と比べセラミドグルコシルトランスフェラーゼの発現が増加していた。

クローニングされたセラミドグルコシルトランスフェラーゼを野

生株へトランスフェクトし活性について検討した結果、細胞内にふくまれる生成産物である CMH はおよそ 1.5 倍に増加していた。

以上より CMH の増加が認められたチャイニーズハムスターのペルオキシゾーム欠損変異株細胞である Z65 において、糖脂質の合成の亢進を認め、セラミドグルコシルトランスフェラーゼ遺伝子をクローニングし、この遺伝子の Z65 細胞での発現の増加を明らかにした。

また Z65 細胞における以上のような糖脂質の変化がペルオキシゾーム欠損により普遍的に生じるかどうかを明らかにするため、Zellweger 症候群および乳児 Refsum 病の患者由来の線維芽細胞の糖脂質組成を正常細胞と比較し、スフィンゴ糖脂質の代謝変化についても Z65 細胞と同様に検討した。また同時に抗ガングリオシド GM3 抗体を用いた免疫組織染色を行い細胞内 GM3 の検出と局在の確認を行った。

その結果、患者由来細胞で ceramide dihexoside(CDH)の軽度の増加とガングリオシド GM2、GM1、GD1a の増加を認めた。陰イオン FAB-MS や特異的抗体を用いて正常細胞に含まれないGM1 やGD1a が検出されることを確認した。免疫組織染色によって患者細胞では正常細胞には認められない細胞質内に顆粒状に蓄積する GM3 を見出した。GM2、GM1、GD1a は GM3 から合成されるため、患者細胞では前駆体のプールが形成されていると考えられる。

また、セリン、パルミトイル-Co-A より始まるスフィンゴ脂質生

成の各分画へ取り込まれた<sup>14</sup>Cラベルセリンの定量をすることで患者由来線維芽細胞でのスフィンゴ脂質の代謝変化を検討した。

その結果 phosphatidylserine (PS), phosphatidylethanolamine (PE), sphingomyelin (SM)それぞれの分画すべてにおいて患者細胞では取り込みが増加しており、スフィンゴ脂質代謝速度の亢進が明らかになった。

糖脂質は細胞の分化、増殖、アポトーシスに重要な生理的役割を担っていることから、患者由来細胞での糖脂質生成増加はペルオキシゾーム病の中樞神経系の病態解明に役立つ知見と考えられる。

今後、更に患者由来の中樞神経細胞における糖脂質代謝の検討をすすめる必要がある。