

論文内容の要旨

論文題目

Gal α / β 1-4Gal 構造の発現に関する 鳥類種間での比較研究

氏名 名和 大輔

序論

糖タンパク質、糖脂質、プロテオグリカンなどの形で生体内に発現する糖鎖は、生物種間で保存されている糖鎖と種選択的に発現する糖鎖に分けることが出来る。種間で保存されている糖鎖に関しては、生体内で機能的に働くことが予想され、実際に内在性の受容体によって認識されることで機能的に働く例が数多く報告されている。一方、種選択的に発現する糖鎖については、生物界でどのようなものが存在するのか、生体内で機能的に働くのか、特定の糖鎖構造を認識する微生物やウイルスから逃れるために進化的に変化し形成されたのか、などが解決すべき課題となっている。また、これまでに糖鎖構造については、ヒトやマウスを中心とした哺乳類においては様々な知見が得られている一方、哺乳類と同じく新世代に繁栄してきた鳥類においてはあまり研究が進んでいない。しかしながら種選択的な糖鎖の発現分布や生物学的意義を解明するためには哺乳類に留まらない研究が必要であり、私はハト由来のアスパラギン結合型 (*N* 型) 糖鎖上に存在する Gal α 1-4Gal および Gal β 1-4Gal という糖鎖構造に着目した。Gal α 1-4Gal は、様々な鳥類において卵白の糖タンパク質上に発現することが明らかとされている。一方 Gal β 1-4Gal は、ハト IgG の他、アナツバメやメダカ、ゼブラフィッシュの糖タンパク質上に検出されているが、この構造に対する抗体がこれまでに作製されておらず、生物界での分布は不明である。

Gal α 1-4Gal および Gal β 1-4Gal の糖鎖構造は、それぞれ α 1,4-Gal 転移酵素 (α 4GalT(Gal))と β 1,4-Gal 転移酵素 (β 4GalT(Gal))の作用により生成される (図 1)。しかし、これまでにこれらの酵素に関する研究は報告されていない。種選択的に発現する糖鎖が生成される仕組みとその発現分布を明らかとするためには、糖転移酵素と糖鎖構造という二つの視点で分析する必要がある。そこで私は鳥類

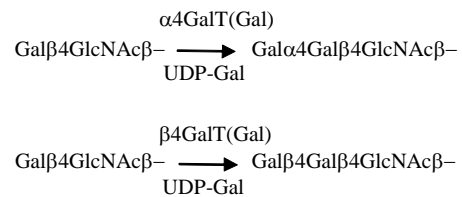


図 1 α / β 4GalT(Gal)の酵素反応スキーム

において Gal α / β 1-4Gal を含む糖鎖の発現分布を系統樹と照らし合わせて解析するという目的の下に、(1) 酵素活性測定法、(2) 特異的抗体を用いた検出法、という 2 つの手法を確立し、(3) α / β 4GalT(Gal)の酵素活性、(4) Gal α / β 1-4Gal の発現分布、について鳥類の種間での比較分析を行った。

結果および考察

(1) α 4GalT(Gal)および β 4GalT(Gal)の活性測定法の確立

ハトでは Gal α 1-4Gal および Gal β 1-4Gal の構造を含む N 型糖鎖が同定されているが、これらの構造を作る糖転移酵素である GalT(Gal)については調べられていない。そこでまず、ハトの肝臓抽出物を用いて GalT(Gal)の酵素活性を測定した。基質の糖鎖としては、非還元末端の糖鎖構造が Gal β 1-4GlcNAc となっている複合型 2 本鎖糖鎖を用いた。2-アミノピリジン (PA) により蛍光標識した基質糖鎖 (図 2) に対してハト肝臓抽出物を 1% TritonX-100, 100 mM HEPES, pH 7.5, 20 mM MnCl₂, 20 mM UDP-Gal の条件下で作用させた後、生成物を Amide カラム (順相) および ODS カラム (逆相) を用いて分離した (図 2)。構造決定は、生成物の糖鎖を糖分解酵素により逐次分解しながら、その溶出位置を既知の糖鎖と比較することで行った。この結果、13 種類の生成物についてその構造を同定し、 α / β 4GalT(Gal) の作用により非還元末端に、Gal α 1-4Gal β 1-4GlcNAc、Gal β 1-4Gal β 1-4GlcNAc、および Gal α 1-4Gal β 1-4Gal β 1-4GlcNAc 配列が生成されることが明らかとなった。また、順相と逆相の HPLC を組み合わせて α 4GalT(Gal)および β 4GalT(Gal)の生成物を分離し同定することで、これらの酵素活性を同時に測定することが可能となった。

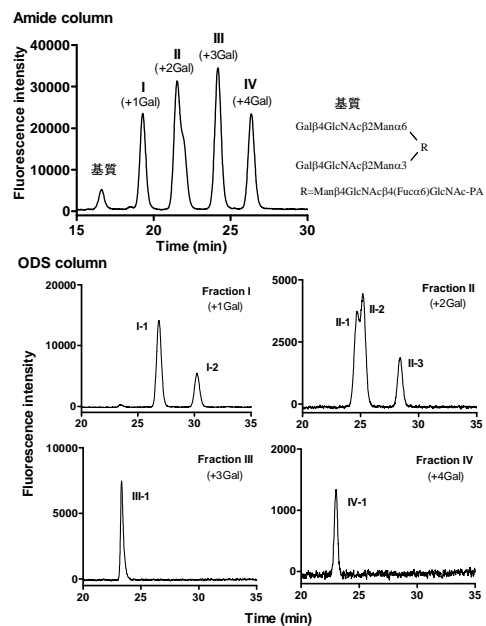


図 2 α / β 4GalT(Gal)生成物の HPLC 分離

(2) 抗Gal β 1-4Gal抗体の作製とその特異性解析

糖鎖構造の発現分布を調査する際、その構造を認識する特異的抗体を用いて検出する手法は簡便である。しかし、Gal β 1-4Gal に対する抗体を作製したという報告は無いため、私は Gal β 1-4Gal の糖鎖構造を持つことが知られているメダカの卵を免疫原としてモノクローナル抗体の作製を行った。メダカの卵のフェノール抽出物をマウスの腹腔に免疫した後、脾臓細胞とミエローマ細胞を融合させた。Gal β 1-4Gal β 1-4Glc を還元アミノ化法により BSA に固定化し、これを用いて ELISA によりスクリーニングを行った結果、抗 Gal β 1-4Gal 抗体を産生するハイブリドーマを 4 種類得た (IgG1 : 27 と 68、IgM : 44 と 67)。それぞれの培養上清から抗体を精製した後、Gal β 1-4Gal を N 型糖鎖に持つ糖タンパク質 (ハト IgG) に対して結合することを確認した。

次に、これらの抗体の詳細な特異性を frontal affinity chromatography (FAC) という手法によって解析した。その結果、それぞれの抗体が Gal α 1-4Gal、Gal α 1-4Gal β 1-4GlcNAc、Gal α 1-4Gal β 1-4Gal β 1-4GlcNAc、Gal β 1-4GlcNAc、GalNAc β 1-4Gal β 1-4Glc、Gal β 1-3Gal β 1-4Glc、

Galβ1-6Man などの糖鎖とは結合せず、Galβ1-4Gal を非還元末端部位に持つ糖鎖に対してのみ特異的に結合することが明らかとなった。

(3) ニワトリ、ダチョウ、ハトの組織におけるα/β4GalT(Gal)の活性測定およびGalα/β1-4Galの発現分布の解析

現生鳥類はダチョウ小綱、キジカモ小綱、および新顎下綱（キジカモ小綱を含まない）という三つの分岐群に分類されている。私は、各分岐群の代表としてダチョウ、ニワトリ、およびハトを選択し、それぞれの組織におけるα/β4GalT(Gal)の酵素活性を測定した。まず、各組織からマイクロソーム画分を調製し、1% TritonX-100 を用いてタンパク質を抽出した後、PA 化された基質に対して最終濃度が 1 mg/ml のマイクロソーム画分を 1% TritonX-100, 100 mM HEPES, pH 7.5, 20 mM MnCl₂, 20 mM UDP-Gal の条件で作用させた。生成物の構造を上述の HPLC 法を用いて同定し、α/βGalT(Gal)の酵素活性を生成物の蛍光強度から算出した。解析の結果、ハトにはα4GalT(Gal)およびβ4GalT(Gal)の活性が、ダチョウではβ4GalT(Gal)のみの活性が検出されたのに対し（図 3）、ニワトリでは両酵素の活性とも検出されなかった。一方、Galβ1-4GlcNAc を生成するβ4GalT(GlcNAc)は 3 種全てで活性が検出された。このことから鳥類においては、GalT(Gal)の発現パターンが少なくとも 3 種類存在することが明らかとなった（図 4）。また、それぞれの酵素が全身に広く分布しているという特徴はハトとダチョウにおいて変わらなかった。

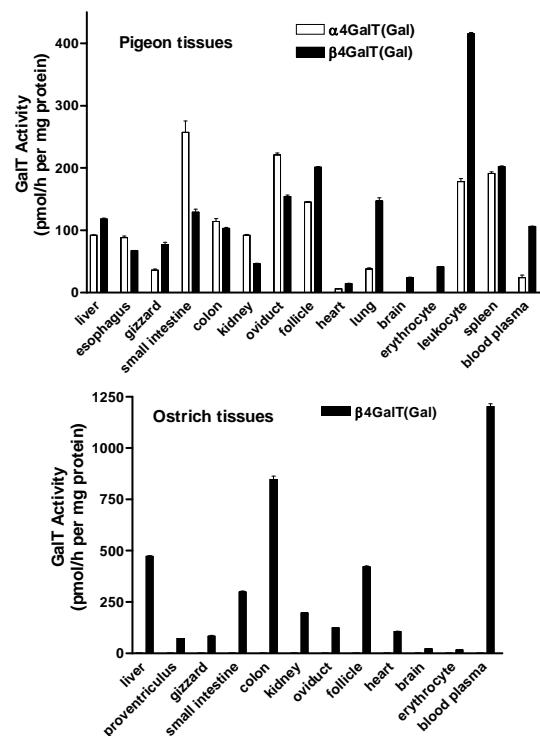


図 3 ハト (pigeon) とダチョウ (ostrich) における GalT(Gal)の酵素活性

次に、組織の糖鎖構造を抗体/レクチン染色により調査した。各組織から抽出した糖タンパク質を Galα1-4Gal に対する抗体 (anti-P₁)、Galβ1-4Gal に対する抗体 (68) および、GalT(Gal)の基質である Galβ1-4GlcNAc に結合する植物レクチン (*Erythrina cristagalli* lectin, ECA) を用いてウエスタンブロッティング法により染色した（図 4）。ハトでは一部の組織でしか Galβ1-4Gal が検出されなかったが、これはα4GalT(Gal)の作用によりGalα1-4Galβ1-4Galの構造が生成され、68抗体が認識出来なくなっていることが考えられる。これらの結果から、ハトにおいてはGalα1-4Gal、ダチョウにおいてはGalβ1-4Galが糖鎖の非還元末端部位に存在していること、それらの発現はα/β4GalT(Gal)の活性の有無と関連していることが示された。また、Galα/β1-4Galは特定の組織やタンパク質に限定されず、全身に発現することが明らかとなった。

	Galα1-4Gal		Galβ1-4Gal		Galβ1-4GlcNAc	
	酵素活性	抗体染色	酵素活性	抗体染色	酵素活性	レクチン染色
ダチョウ	×	×	○	○	○	○
ニワトリ	×	×	×	×	○	○
ハト	○	○	○	△	○	○

○:各組織で検出 △:一部の組織で検出 ×:非検出

図 4 酵素活性測定および抗体染色の結果

(4) 鳥類におけるGalβ1-4Galの発現分布の解析

Galα1-4Gal に関しては、ダチョウ小綱とキジカモ小綱には存在しないが、新顎下綱に分類される鳥類の大部分は Galα1-4Gal を持つことが明らかとなっている。一方で Galβ1-4Gal に関してはその発現分布は未知であった。前項(3)の研究により、ダチョウ小綱に属するダチョウ、および新顎下綱に属するハトにおいては Galβ1-4Gal、およびこの構造を作るβ4GalT(Gal)

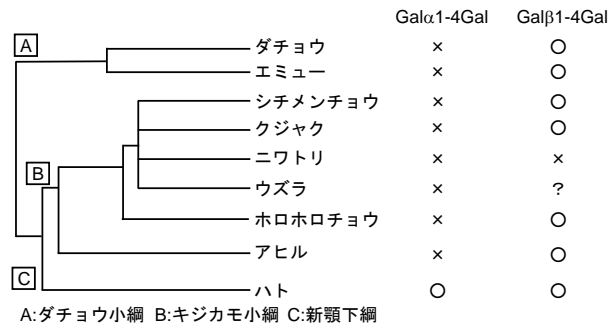


図5 解析した種の系統樹および Galα/β1-4Gal の発現分布

の発現が検出された一方、キジカモ小綱に属するニワトリにおいてはどちらも検出されなかった。そこで私は、ニワトリと系統的に近縁な種が Galβ1-4Gal を発現するかを特に明らかとするために、図5に示すようにキジカモ小綱を中心とした数種類の鳥類の卵を収集した。卵黄に含まれる IgG を精製した後、ウエスタンブロッティングによって Galα/β1-4Gal の存在の有無を調べた。Galα1-4Gal はハトの IgG でのみ検出され、これまでの知見と一致した。Galβ1-4Gal は、ダチョウ、エミュー、クジャク、ホロホロチョウ、アヒル、シチメンチョウの IgG で検出された。また、ハト IgG に関しては、抗 Galα1-4Gal 抗体で染色されたのでα-galactosidase 処理を行ったところ、Galβ1-4Gal が検出された。一方、ニワトリとウズラは抗 Galβ1-4Gal 抗体および抗 Galα1-4Gal 抗体によって染色されなかった。この結果は、ニワトリでは、α4GalT(Gal)およびβ4GalT(Gal)の活性が検出されなかったという前項(3)の実験結果と一致する。ウズラに関しては、組織におけるβ4GalT(Gal)の活性および Galβ1-4Gal の発現を調査中である。

今回調査した Galα/β1-4Gal の発現分布をまとめると、図5のようになる。また、ハト以外にも新顎下綱に属するアナツバメについて、糖タンパク質上に Galβ1-4Gal が存在することが報告されている。ダチョウ小綱、キジカモ小綱、新顎下綱においてそれぞれ Galβ1-4Gal を持つ種が存在することから、現生鳥類の共通祖先が Galβ1-4Gal を発現していた可能性が高い。もしそうであれば、ニワトリは進化の過程で Galβ1-4Gal を発現しなくなった、すなわちβ4GalT(Gal)の遺伝子が何らかの理由で不活性化されたと考えられる。非還元末端部位の糖鎖は内在性の受容体もしくは微生物やウイルスの持つ受容体によって認識されやすく、これらは個体の生存に大きく影響を与えると考えられる。調査したほとんどの鳥類が Galβ1-4Gal 構造を持つことは、それぞれの種が進化の過程でβ4GalT(Gal)遺伝子を保存し続けたことを意味し、Galβ1-4Gal を喪失することが多くの鳥類にとって個体の生存に不利に働いてきた可能性がある。

結論

本研究により、鳥類の多くの種において Galβ1-4Gal が発現することが明らかとなった。これらの結果から、モデル生物として使用されてきたニワトリが Galβ1-4Gal の発現という観点からは鳥類の中で実は少数派であることが示唆された。Galα1-4Gal の鳥類での発現分布を合わせて考えると、現生鳥類の大部分は非還元末端部位に Galα1-4Gal もしくは Galβ1-4Gal を持ち、哺乳類とは異なる糖鎖構造を形成している、という新しい認識が得られる。