

ガングリオ系ガングリオシドの組織  
並びに細胞分布に関する  
免疫化学的解析

—ラット中枢神経系組織とヒト纖維芽細胞について—

小谷政晴

ガングリオ系ガングリオシドの組織  
並びに細胞分布に関する  
免疫化学的解析

—ラット中枢神経系組織とヒト繊維芽細胞について—

1995

(財) 東京都臨床医学総合研究所 腫瘍免疫研究部門

小谷政晴

## 目次

略語	3
要旨	4
緒論	7
第1章 a 経路ガングリオシドに対する単クローン抗体の作製並びにその特異性	
第1節 序論	14
第2節 材料及び方法	16
第3節 結果	21
第4節 考察	29
第2章 成熟ラット中枢神経系組織における主要ガングリオシドの分布	
第1節 序論	31
第2節 材料及び方法	33
第3節 結果	36
第4節 考察	62
第3章 Tay-Sachs 病並びに正常ヒト皮膚由来繊維芽細胞における GM2 ガングリオシドの細胞内分布	
第1節 序論	65
第2節 材料及び方法	67
第3節 結果	70

第4節 考察	77
第4章 総括	79
謝辞	83
引用文献	84

## 略 語

- BSA ; bovine serum albumin  
EDTA ; ethylenediaminetetraacetic acid  
EGF ; epidermal growth factor  
EGTA ; ethylene glycol-*O,O'*-bis(2-aminoethyl)-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid  
ELISA ; enzyme-linked immunosorbent assay  
FCS ; fetal calf serum  
FITC ; fluorescein isothiocyanate  
FACS ; fluorescence-activated cell sorter  
GFAP ; glial fibrillary acidic protein  
GPI ; glycosylphosphatidylinositol  
H-E staining ; hematoxylin-eosin staining  
HEPES ; *N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid  
IF ; intermediate filament  
IgG ; immunoglobulin G  
IgM ; immunoglobulin M  
K-B staining ; Kluver-Barrera's staining  
MAb ; monoclonal antibody  
2-ME ; 2-mercaptoethanol  
PBS ; phosphate-buffered saline  
PMSF ; phenylmethylsulfonylfluoride  
SDS ; sodium dodecyl sulphate  
SDS-PAGE ; sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis  
TBS ; tris-buffered saline  
TLC ; thin-layer chromatography  
TPA ; 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate

## 要 旨

ガングリオシド、特にガングリオ系ガングリオシドは、脊椎動物の各組織に広く分布することが、生化学的解析によって明らかにされている。特に脳において、その含量は極めて高く、白質と灰白質に特異的なガングリオシドの分布についても、生化学的手法により解析されている。しかし、ガングリオシド特異的単クローン抗体 (MAb) の作製が困難なことから、ガングリオシドの詳細な脳組織内分布の形態学的観察については、ほとんど報告されていない。一方ガングリオシドは、その生合成経路並びに化学的構造から考えて細胞膜上のみ存在しているものと考えられてきた。しかしながら、ある種の糖脂質は、免疫細胞化学及び免疫電子顕微鏡による解析から細胞質内にも分布していることが明らかになってきた。しかし、細胞質内のガングリオシドはどのような状態で存在しているのか、更にどのような生物学的機能を担っているのか、現在のところ全く不明である。そこで著者は、これらの諸問題を免疫学的手法を用いて解析した。

第1章では、免疫学的プローブとしての MAb の作製を行った。a 経路ガングリオシド (GM3, GM2, GM1, GD1a 並びに GT1a) に対して各々特異的な MAb を作製し、その結果、五つの MAb (抗 GM3、抗 GM2、抗 GM1、抗 GD1a 並びに抗 GT1a) を得た。抗 GM2、抗 GM1 及び抗 GT1a MAb は、それぞれのガングリオシドのみと反応し、他のガングリオシド並びに中性糖脂質とは全く反応せず、特異性が極めて高いことが確認された。GT1a に対する特異的な MAb の報告は、本研究が初めてである。抗 GD1a MAb は、GD1a 以外に GM1b や GT1b とも反応した。抗 GM3 MAb は、GM3 以外に GM4、GM1b、GD1a、GT1b 並びに IV<sup>3</sup>NeuAc<sub>n</sub>-nLc<sub>4</sub>Cer とも反応した。これらの抗体を用いて、マウス、ラット並びにヒト由来の各種白血病細胞株における a 経路ガングリオシド、特に GM1、GD1a 及び GT1a の発現について解析した。GM1 と GD1a は、幾つかの白血病細胞に発現していることがフローサイトメトリーによる解析から判明した。しかし GT1a は、解析した全ての株化細胞において発現は認められなかった。

第2章では、成熟ラット中枢神経系組織 (小脳、大脳皮質、海馬及び脊髄) における主要ガングリオシド (GM1、GD1a、GD1b、GT1b 及び GQ1b) の分布を、特異的 MAb を用いた間接蛍光抗体法により明らかにした。GM1 と GD1a に特異的な MAb は、第1章で作製したものをを用いた。GD1b、GT1b 及び GQ1b に対する特異的 MAb については、Ozawa ら

(1992)の作製したものをを用いた。観察した各組織における主要ガングリオシドは、細胞及び層に特異的に分布することが判明した。小脳において、GM1は分子層、顆粒層及び白質に存在しているバーグマングリア及びアストログリアに分布していた。GD1aは、分子層に分布していた。GD1bとGQ1bは、ともに顆粒層に分布していたが、それらの局在は互いに異なっていた。GD1bは顆粒細胞に、GQ1bは小脳糸球に局在していた。GT1bは、プルキンエ細胞層以外の各層に分布していた。大脳皮質では、GM1は全層のグリア系細胞に分布を認めたが、その発現量は極めて少なかった。GD1aは、I層、II/III層、Va層の上部及びVI層の上部領域に分布していた。GQ1bは、IV層、Vb層下部の及びVI層の下部領域に存在した。GD1bは、III層以下の各層に分布していた。GT1bは、全ての層に分布していた。海馬並びに脊髄においても、主要ガングリオシドはそれぞれ細胞及び層構築に特徴ある分布が観察された。

第3章では、GM2蓄積性疾患であるTay-Sachs病の患者皮膚由来繊維芽細胞を用いて、GM2の細胞内分布を免疫細胞化学により解析した。その結果、Tay-Sachs病患者皮膚由来繊維芽細胞では、抗GM2MAbによってGM2が蓄積したリソソーム様の顆粒構造が明瞭に染色された。ところがこのMAbは、このリソソーム様顆粒に加えて、両細胞の細胞質内のフィラメント様構造を染色した。このMAb陽性のフィラメント様構造は、ヒト正常皮膚由来繊維芽細胞にも認められた。そこで、抗GM2MAb陽性のフィラメント様構造を同定するために、抗GM2MAbと各種細胞骨格タンパク質に対するMAbとの二重染色を行ったところ、その構造はビメンチン中間系フィラメント(ビメンチンIF)であることが判明した。更に、GM2がビメンチンIFに直接結合しているか否かを解明するために、ヒト正常皮膚由来繊維芽細胞とマウス肥満細胞からビメンチンIFを単離し、以下の解析を行った。単離ビメンチンをプレート固相した酵素抗体法では、抗GM2MAbは固相された単離ビメンチン濃度依存的に反応したが、抗GM1及び抗GM3MAbは全く反応しなかった。その反応性から、ビメンチン1分子に対してGM220分子が結合していることが推測された。次に、単離ビメンチンから脂質抽出を行い、薄層クロマトグラフィー(TLC)で分離した後、抗GM2MAbによる免疫染色を行ったところ、GM2が検出された。更に、単離ビメンチンを抗GM2並びに抗ビメンチンMAbを用いたWestern blotで解析したところ、57kDaの分子量をもつビメンチンとのが確認された。これらの結果は、GM2がビメンチンIFに非共有的な結合によって直接結合していることを示している。

これら一連の研究から、各ガングリオシドの組織並びに細胞質内における分布領域及び存

在様式が明らかになり、それらの発現部位における存在意義及び機能を解析していくための基礎的知見が得られ、具体的な機能的役割について考察することが可能となった。



## 緒 論

糖脂質は、主要な生体構成成分の一つとして広く生物界に分布している。それは脂質の構造上の違いによって、スフィンゴ糖脂質とグリセロ糖脂質に分類されている。後者は、リン脂質に見られるように、グリセロール骨格に脂肪酸がエステル結合した1,2-ジアシルグリセロールを脂質部分としている。このグリセロ糖脂質は、精子や精巣のセミノリビド<sup>①</sup>やミエリン鞘のガラクトシルジアシルグリセロール<sup>②</sup>などのように特異的の分布が報告されているが、その糖鎖の多様性は小さいと考えられている。一方スフィンゴ糖脂質は、スフィンゴシンと呼ばれる長鎖塩基に脂肪酸が酸アミド結合したセラミドに糖鎖が結合したもので、脊椎動物ではこのスフィンゴ糖脂質のほうが含量、分布領域及び糖鎖の多様性ともに極めて豊富であり、生物学的機能との関連から重要であると認識されている。この糖鎖にシアル酸を含むものをガングリオシドと総称し、脊椎動物の細胞に広く分布しており、特に神経系に含有量が高い<sup>③</sup>。シアル酸残基は、ウロン酸や硫酸エステル基と並んで、分子に負の電荷を与える点で重要な物質と考えられている。ガングリオシドの研究は、1942年 E. Klenk<sup>④</sup> によって、ヒト遺伝性代謝疾患の一つである Tay Sachs 病患者の脳からシアル酸含有糖脂質（その後、GM2 と同定された）が発見されたことに始まる。その後、分離・精製、分析並びに構造解析技術の飛躍的な向上にともない、中枢神経組織以外の各種臓器及び細胞から多種のガングリオシドが検出・同定された。そして、ガングリオシドは、その糖鎖構造並びに *in vitro* における糖鎖生合成系路を基にガングリオ系ガングリオシド、グロボ系ガングリオシド、イソグロボ系ガングリオシド、ラクト系ガングリオシド、ネオラクト系ガングリオシド、ラクトガングリオ系ガングリオシド及びガラ系ガングリオシドに分類されている。その中で、最も分布が広く、かつ脳神経系に多量に存在するガングリオ系ガングリオシド（以下、ガングリオシドと略す）は、その糖鎖生合成系路として三つの経路（a 経路、b 経路並びに c 経路）が知られている（図 1）。a 経路ガングリオシドは GM3 を、b 経路ガングリオシドは GD3 を、c 経路ガングリオシドは GT3 を、それぞれ基本オリゴ糖鎖とし、それらに中性糖、アミノ糖及びシアル酸を転移することによって、各々の系列のガングリオシドが合成される<sup>⑤</sup>。このように、ガングリオシドの糖鎖骨格は比較的単純でありながら、シアル酸の数とその結合位置の組み合わせにより、多種の分子が厳密な遺伝的制御の下で生合成されている。一方、無脊椎動物にも糖脂質は存在し、特に、二枚貝や腹足類などの軟体動物や双翅目昆虫などの研究から、

脊椎動物の糖脂質とは全く異なった糖鎖構造の存在が明らかにされ、Mollu 系列<sup>(6)</sup>、Gala 6 系列<sup>(7)</sup>、Arthro 系列<sup>(8)</sup>などに分類されている。しかし、これらの無脊椎動物ではガングリオシドは見い出されていないが、それに代わる酸性糖脂質として、グルクロン酸やホスホン酸を含む糖脂質が報告されている。ガングリオシドの存在が認められている棘皮動物のウニ類では、数種のガングリオシドの構造決定が行われているが、脊椎動物とは極めて異なる構造を有する。糖鎖がシアル酸とグルコースのみから成ること、硫酸化されたシアル酸の存在、更には糖鎖中央のシアル酸残基の存在などの特徴を有することが報告されている<sup>(8,11)</sup>。

以上のように、糖脂質の分野は、その構造解析が中心となって発展してきたが、その生物学的機能に関する研究についても、近年盛んに行われている。最初に、細胞膜表面上に発現している糖脂質は、ガン化や分化に伴って細胞表面上の糖脂質の表現パターンが大きく変化していた<sup>(12)</sup>。特に、ガン化に伴って糖鎖の伸展が抑制されたり<sup>(12)</sup>、正常細胞には存在しない糖脂質糖鎖が合成される<sup>(13)</sup>ことなどが明らかにされた。これらの結果は、細胞表面上における糖脂質発現の変化と細胞増殖との間に、何らかの相関のあることを示唆している。Hakomoriら(1984)は、培養細胞に糖脂質を添加し一定時間培養することによって、人為的に細胞膜表面上の糖脂質組成を変化させ、細胞の増殖並びに形態におよぼす影響について解析した。その結果、Swiss 3T3 細胞は、GM1 (a-経路ガングリオシド) 添加により<sup>(14)</sup>、またヒト上皮性ガン細胞である A 431 並びに KB 細胞は GM3 (a-経路ガングリオシド) 添加により<sup>(15,16)</sup>、増殖が抑制されることが見い出された。特に A 431 細胞の増殖抑制機序については、GM3 と上皮増殖因子 (EGF) 受容体の相互作用による可能性が示唆されている。EGF 受容体は、EGF と結合することによって、その受容体のチロシンキナーゼが活性化されると同時に、その受容体自体も自己リン酸化されることが知られている。ところが GM3 添加は、EGF と EGF 受容体との結合によって引き起こされる受容体分子の自己リン酸化を抑制することが判明した<sup>(17)</sup>。その際 GM3 は、EGF と EGF 受容体との結合を全く阻害しない。両親媒性である糖脂質は、培養細胞に添加すると、比較的速やかにそのセラミド部位を介して細胞膜に組み込まれことが報告されている<sup>(18)</sup>。従って、GM3 添加による EGF 受容体分子の自己リン酸化抑制機構の詳細については不明であるが、少なくとも GM3 が EGF 受容体分子の極めて近傍に組み込まれていることが必須であると推測されている。一方、同様の添加実験によって、糖脂質は分化誘導因子としての生理活性作用を有することが報告された。ヒト前骨髄球性白血病細胞株 HL-60 は、その培地中にレチノイン酸やジメチルスルホキシドを添加すると顆粒球系

細胞に、また 12 のテトラデカノイルホルボール 13 アセテート (TPA) を添加すると単球・マクロファージ系細胞に、それぞれ分化していくことはよく知られている<sup>(19)</sup>。このように分化誘導された各細胞の糖脂質組成を解析したところ、前者ではネオラクト系ガングリオシドが、後者ではガングリオシド、特に GM3 の顕著な増加が認められた。そこで、未分化の HL-60 の培養液中にネオラクト系ガングリオシドと GM3 をそれぞれ添加すると、顆粒球系細胞と単球・マクロファージ系細胞にそれぞれ分化することが見いだされた<sup>(17,20)</sup>。これらの結果は、細胞表面上に発現している糖脂質が細胞の増殖及び分化誘導に深く関わっていることを示すと同時に、細胞の分化誘導は、その細胞膜上に発現する分子によって規定されることを示唆している。神経系細胞におけるガングリオシドの機能的役割に関する報告も多く見られる。Nagai ら (1983) は、無血清培地で培養したヒト由来神経芽腫瘍細胞株の一つである GOTO 細胞にガングリオシドを添加すると、神経突起が伸展してくるを見出した<sup>(21)</sup>。その効果は、特に GQ1b (b 経路ガングリオシドの一種) で顕著であった。また、GQ1b のオリゴ糖鎖も神経突起伸展活性を有していたが、GQ1b そのものと比べて著しく伸展活性が弱いことが判明している<sup>(22)</sup>。このことから、GQ1b が生理活性因子としての機能を発現するためには、セラミド部分もその活性発現に重要であると同時に、その部分を介して膜に組み込まれることが必要であると考えられている。このようにガングリオシドの突起伸展作用は、他の作用因子 (例えば、神経成長因子) のように、細胞膜上の特異的受容体を介して作用するという経路とは異なっていることを示唆している。GOTO 細胞以外の他の神経系の培養細胞においても、同様の現象が見いだされている。例えば、初代培養系ではニワトリ胚の脊髄後根神経節<sup>(23, 24)</sup>、大脳<sup>(25)</sup>及び交感神経節<sup>(26)</sup>、株化細胞ではラット神経芽腫瘍細胞 (中枢神経系細胞由来) の B104<sup>(27, 28)</sup>、マウス神経芽腫瘍細胞株の Neuro 2a<sup>(29-31)</sup>、ラットクロム親和性細胞腫の PC12<sup>(32)</sup> で、ガングリオシド添加による突起伸展が観察されている。その後、ガングリオシド添加による突起伸展の作用機序には、タンパク質リン酸化酵素が関与していることが報告された<sup>(33)</sup>。それは、GOTO 細胞の細胞膜画分に、ガングリオシドによって活性化されるタンパク質リン酸化機構の存在が見いだされたことによる。このリン酸化酵素はエクソ型キナーゼであると考えられており、その酵素の最もよい基質の一つがヒストン H1 であることが示された。更に、その酵素の活性化に必要なガングリオシドの至適濃度は、突起伸展に必要な濃度に一致することも確認された。一方、ガングリオシドの生理活性作用は、神経組織を用いた実験系においても報告されている<sup>(34,35)</sup>。それは、動物 (ネコ、ラット及びマウス) の神経組織の一部を切断・破壊した後、その修復速度に及ぼすガングリオシ

ドの効果について解析したものである。あらかじめガングリオシドを投与された群では、非投与群に比べて明らかに組織修復の早いことが認められた。この現象は、中枢・末梢及び運動・感覚神経系を問わずに観察されている。こうした一連の報告から、ガングリオシドが神経系細胞に対する生理活性因子として作用する一つの経路として、細胞膜上に存在しているタンパク質リン酸化酵素（エクト型キナーゼ）を介した情報伝達系の関与が強く示唆される。しかしその酵素の実体は、未だに明らかにされておらず、今後の解析が待たれる。最近、ガングリオシドは、脳組織内において免疫抑制的に作用していることを示唆する報告がなされた<sup>56)</sup>。グリア系細胞は、インターフェロン $\lambda$ によって活性化され、その細胞表面上に組織適合性抗原クラスI (MHC class I) 及びクラスII (MHC class II) 分子を発現する。ところが、ある種のガングリオシドをインターフェロン $\lambda$ と同時に培養グリア細胞に添加すると、それらの分子の発現を顕著に抑制した。このことから、脳内ガングリオシドは細胞性免疫機構の中心的分子の発現を恒常的に抑制することによって、脳機能の安定化に寄与しているものと推察される。

ところで、ガングリオシドは、脳組織に多量に含まれており、またその糖鎖構造は多様である<sup>5)</sup>。脳組織における幾つかのガングリオシドの分布については、生化学的手法により明らかにされている。すなわち、GM1及びGM4は白質に<sup>57, 58)</sup>、GT1bはグリア系の細胞に<sup>59)</sup>、GQ1bはシナプス領域に<sup>59)</sup>それぞれ分布していることが報告されている。また、ラット及びマウス胎生中期から後期及び出生直後までの脳内ガングリオシドの変化を生化学的に解析した研究により、脳の形態形成過程に伴ってガングリオシドが顕著な質的量的変化を示すことが報告された<sup>40, 43)</sup>。脳の形態形成過程には、細胞の増殖・分化並びに細胞移動が起り、最終的に一つの機能集合体としての組織が構築される。従って、脳の形態形成過程においてガングリオシドが質的量的変化を示すことは、機能的分子として発現が調節されている可能性を予測させる。ガングリオシドの機能を解析するためには、それらの分子が組織学的にどのような細胞、部位及び領域に分布しているかを把握しておくことは極めて重要である。これまで、こうした形態学的観点からガングリオシドを解析した報告は希である<sup>42, 45)</sup>。それは、ガングリオシド糖鎖に対する特異的抗体、特にMAbの作製法の確立が十分でなく、極めて限られた種類のMAbしか利用できなかったことに起因している。

一方、ガングリオシドは、その分子の化学的性状から細胞膜上に発現していると考えられてきた<sup>56)</sup>。事実、多くのガングリオシドは、細胞膜画分より抽出・精製されている。しかし、近年、ある種のスフィンゴ脂質は細胞膜表面だけでなく細胞質内にも存在していることが

報告された<sup>(47)</sup>。更に、細胞質内における情報伝達分子の一つであるカルモジュリンにガングリオシドが結合することが見いだされた<sup>(48)</sup>。それに加えてガングリオシドは、 $\text{Ca}^{2+}$ ・カルモジュリン依存性タンパク質リン酸化酵素の活性調節に関与することが示唆された<sup>(49)</sup>。また、細胞骨格タンパク質にガングリオシドやある種の中性糖脂質が会合していることが、免疫細胞化学的に観察されている<sup>(50)</sup>。細胞骨格タンパク質は、細胞分裂・増殖及び形態維持などに極めて重要であると同時に、そのタンパク質はリン酸化・脱リン酸化を受けることによって、重合・脱重合が繰り返されることが知られている<sup>(51)</sup>。細胞骨格タンパク質に会合している糖脂質の機能的役割については、今のところ全く不明である。一つの可能性として、細胞骨格タンパク質が重合・脱重合を行う際に、調節的な分子として機能していることが推測され、エクト型キナーゼによる情報伝達系との関連性も含めて、極めて興味ある問題を提示している。更に最近になって GM3 は、各種白血球細胞並びに血小板の細胞膜上に発現している CD59 分子に会合して存在することが報告された<sup>(52)</sup>。CD59 の分子量は約 18-20 kDa であり、グリコシルホスファチジルイノシトール (GPI) に結合した膜表面上タンパク質として発現している。他の GPI 結合性受容体タンパク質を同様に解析したところ、これらの分子にも GM3 が会合していることが明らかとなった<sup>(53)</sup>。前述した EGF 受容体と GM3 との会合の報告を考え合わせると、機能タンパク質と複合体を形成することによってそのタンパク質の機能発現の制御に関与しているものと考えられる。

著者は、主に免疫学的手法を用いてガングリオシドの生物学的機能について明らかにすることを目的としている。そのためには、各ガングリオシドを特異的に認識する MAb の作製が必須である。そして、特異的な免疫学的プローブを用いて、それら分子の組織内分布を明らかにして行くことにより、ガングリオシドの機能的役割の解明に寄与できるものと期待される。こうした観点から、以下の研究を行った。第1章では、a 経路ガングリオシドに対する MAb の作製を試み、得られた MAb の抗原特異性を詳細に検討した結果について論じる。第2章では、ガングリオシドが最も多量に含まれている中枢神経組織に焦点をあて、特異性の明らかな MAb を用いた免疫組織化学の一つである間接蛍光抗体法により、ガングリオシドの分布について解析した。その結果、ガングリオシドは脳内の細胞及び層に特徴的な分布を示すことを見いだした。その分布領域における機能的意義について考察する。第3章では、ガングリオシドの細胞内分布について解析した。その実験モデルとして Tay Sachs 病 (GM2 ガングリオシドーシス) 患者皮膚由来繊維芽細胞を用いた。細胞質内における GM2 の分布について明確にするとともに、生化学的手法を用いて細胞骨格タンパク質とガングリオシド

との会合について明らかにした。

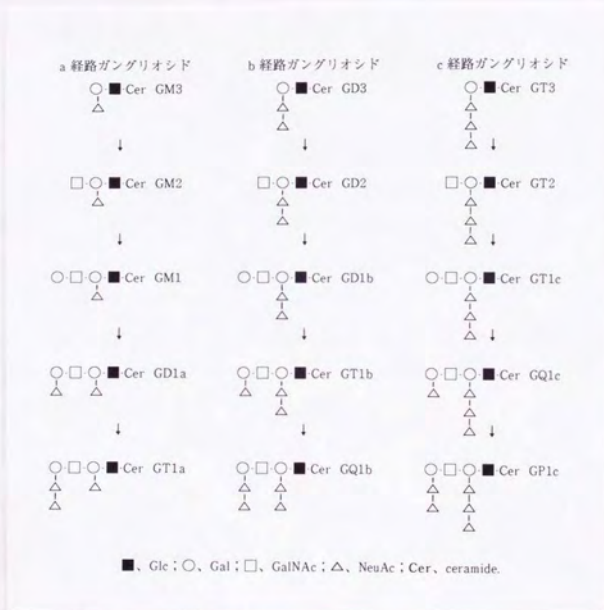


図1 gangliosid系gangliosidの生合成経路。

## 第1章 a 経路ガングリオシドに対する特異的単クローン抗体の作製並びにその特異性

### 第1節 序 論

ガングリオシドは、神経外胚葉由来の腫瘍細胞（特に、神経芽細胞、メラノーマ細胞）及びT細胞白血病の細胞膜表面上に多く発現していることが生化学的並びに免疫学的に明らかにされている<sup>(63,65)</sup>。そして、特に発現レベルの高いガングリオシドは、GM3、GM2、GD3及びGD2であることが、構造解析並びに抗体を用いた解析によって明らかにされ、これらのガングリオシドは癌関連抗原としてもよく知られるようになった。免疫学的プローブである特異的MAbの有用性については、免疫学の分野に限らずあらゆる生物学の分野において立証されている。ところでガングリオシドは、その糖鎖構造の多様性から極めて多くの種類の分子が確認されているが、ガングリオシド糖鎖を特異的に認識するMAbの作製については、極めて限られた種類のガングリオシドに関して報告があるだけである。その理由の一つとして、ガングリオシド糖鎖の免疫原性は、タンパク質に比べて非常に低いことから、高力価で特異性の高い安定した抗体が得にくく、このことから各種のガングリオシド糖鎖に対する特異的MAbの作製は困難であると考えられてきた。事実、これまでに作製されたMAbは、ガングリオシドを多量に細胞膜表面に発現している細胞を免疫原として得られたものに限られている<sup>(66,68)</sup>。この方法は、細胞膜表面に多量に発現しているガングリオシドに対しては有効であるが、微量にしか発現していないものに対しては有効ではない。一方、現在、多くのガングリオシドが精製され、更に糖鎖の化学合成も可能となっている。これら単離されたガングリオシドを免疫原として、各種ガングリオシド糖鎖特異的MAbの作製方法の確立が望まれている。

最近、Kawashimaら(1993)は、各種の近交系マウスを免疫動物として用いて、精製ガングリオシドの免疫原性について比較検討した<sup>(69)</sup>。その結果、C3H/HeNマウスは、他の近交系マウス、特にBalb/Cマウスに比べて、ガングリオシドに対して強い免疫応答を惹起することが示された。従って、ガングリオシドに対するマウスMAb作製には、C3H/HeNマウスを免疫動物として使用することが有効であることが示唆された。

そこで、C3H/HeNマウスを免疫動物とし、免疫原性が極めて低いと考えられているa経



路gangliosid (GM3, GM2, GM1, GD1a 及び GT1a) を免疫原として、各々 a 経路gangliosid を特異的に認識する MAb の作製を試み、得られた MAb の抗原特異性について検討した。

## 第2節 材料及び方法

動物：C3H/HeNマウス（雌、7週齢）は、日本チャールズリバーより購入した。

糖脂質：本実験に使用した糖脂質及びそれらの構造は、表1に示した。GM1、GD1a、GD1b並びにGT1bは、牛脳より精製した。シアリルバラグロポシド ( $IV^S$  NeuAc  $\alpha$  nLc<sub>4</sub> Cer) はヒト赤血球より、 $IV^S$  NeuGc  $\alpha$  nLc<sub>4</sub> Cer は牛赤血球より、それぞれ調整した。GM2 (NeuGc) はマウス (Balb/C) 肝臓より、GT3 と GT2 はサル脳より単離した。GM2 と GD2 は、GM1 と GD1b を  $\beta$ -ガラクトシダーゼ処理することによって得た<sup>(6,9)</sup>。ラクトシルセラミド (LacCer)、アジアロGM2 ( $Gg_3$  Cer) 及びアジアロGM1 ( $Gg_4$  Cer) は、GM3、GM2及びGM1をシアリダーゼ処理して得た。GM4は、有賀博士（バージニア大）より供与された。GM1 (NeuGc；ICRマウス肝臓) 並びにGD3 (NeuGc；クマ赤血球) は、橋本博士と鈴木博士（東京都臨床医学総合研究所、生体膜研究部門）より供与された。GM1bは、佐内博士（東京都臨床医学総合研究所、生命情報工学研究部門）より供与された。ガラクトシルセラミド (GalCer；牛脳) とグルコシルセラミド (GlcCer；ゴースェ病脾臓) はSigma社より、GQ1b (牛脳)、フォルスマン抗原 (牛ミルク)、GM3 (NeuGc；馬赤血球)、トリヘキシシルセラミド ( $Gb_3$  Cer、CTH；ブタ赤血球) 及びグロポシド ( $Gb_4$  Cer；ブタ赤血球) はヤトロン社より購入した。

細胞並びに培養：PAI ミエローマ細胞並びにハイブリドーマ細胞の培養には、10% 牛胎児血清 (FCS)、2mM L-グルタミン、1mM ビルビン酸ナトリウム、10mM HEPES、0.01mM 2-メルカプトエタノール (2-ME)、100 $\mu$ g/ml ストレプトマイシン 及び 100 $\mu$ g/ml ペニシリンを含む RPMI-1640 培地を用いた。

単クローン抗体 (MAb) の作製方法：各精製ガングリオシド (10 $\mu$ g/マウス) を、酸処理したサルモネラ菌 (*S. minnesota*, 250 $\mu$ g/マウス) に吸着させたものを免疫抗原とした<sup>(5)</sup>。調製した抗原を C3H/HeN マウスの尾静脈に5回免疫した。最終免疫から3日後、免疫マウスの脾臓を摘出し、その脾臓細胞 ( $2.5 \times 10^8$  細胞) と PAI ミエローマ細胞 ( $2.5 \times 10^7$  細胞) を 50% ポリエチレングリコール 4000 (Merck 社) によって細胞融合させた。融合細胞 (ハイブリドーマ細胞) の選択は、HAT 培地により行った。図2に MAb 作製のための実験プロトコルを示した。以下に述べる検定法によって、目的とするハイブリドーマ細胞を得た。

更に数回のクローニングを繰り返すことによって、モノクローン細胞株を樹立した。その細胞株より産生された抗体を MAb として、本実験に用いた。

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) : ガングリオシド抗原固相 ELISA 法は、Tai ら (1986) の方法に従って行った<sup>(62)</sup>。96 穴 ELISA 用マイクロプレートは、イムロン 1 (Dynatech 社) を使用した。各糖脂質 (エタノールに 0.5 nM に溶解したものを原液) の希釈系列を調整し、それぞれ 50  $\mu$ l を各 well に添加後、溶媒を留去することによって抗原 (糖脂質) を固相させた。その後、1% ヒト血清アルブミンを含むリン酸生理食塩水 (PBS) を加えて 1 時間静置し、ブロッキングした。PBS で洗浄後、ハイブリドーマ培養上清 200  $\mu$ l を加えて室温 1 時間反応させた。PBS で洗浄した後、1% ヒト血清アルブミンを含む PBS で 300 倍希釈したパーオキシダーゼ標識抗マウス Ig (Cappel 社) 200  $\mu$ l を加えて 1 時間反応させた。PBS で洗浄した後、基質溶液 200  $\mu$ l を加えて 15 分間反応させ、405nm の波長に設定したエライザリーダー (Bio-Rad 社) により測定した。基質溶液は、50mM クエン酸リン酸緩衝液 (pH5.0) 10ml に *O*-フェニレンジアミン (Sigma 社) 4mg を溶解し、使用直前に過酸化水素水 4  $\mu$ l を加えたものを使用した。

薄層クロマトグラフィー (TLC) : 薄層クロマトグラフィー (TLC) には、シリカゲルプラスチックプレート (Merck 社) を用い、クロロホルム : メタノール : 0.22% CaCl<sub>2</sub> (55:45:10, v/v) で展開を行った。展開後、TLC プレート上でのガングリオシド並びに中性糖脂質の検出は、レゾルシノール試薬並びにオルシノール試薬を用いた。

TLC 免疫染色法 : Tai ら (1987) の方法に従って行った<sup>(63)</sup>。各ガングリオシド及び中性糖脂質を上記展開溶媒にて TLC プレート上で展開した後、TLC プレートを 1% ポリイソブチルメタクリレートを含むシクロヘキサン溶液に浸してプラスチックコートした。1% 牛血清アルブミン (BSA) を含む PBS で 1 時間室温にてブロッキングし、ハイブリドーマ細胞培養上清 (一次抗体) を加えて 2 時間反応させた。PBS で洗浄後、1% BSA を含む PBS で 300 倍希釈したパーオキシダーゼ標識抗マウス Ig (Cappel 社) を 3 ml 加えて 1 時間反応させた後、PBS で洗浄し、基質溶液を 3 ml 加えて 15 分間反応させた。基質溶液は、ELISA で使用したものをを用いた。

フローサイトメトリー (FACS) による解析: 付着性細胞を0.2%トリプシンと1mM EDTA を含む PBS で 37℃ で3分間処理して基質から剥離させ、PBS で十分に洗浄した。その細胞 ( $1 \times 10^6$  細胞) にハイブリドーマ細胞培養上清 ( $100 \mu\text{l}$ ) を加えて1時間反応させた。PBS で洗浄し、更に 1% BSA を含む PBS で 300 倍希釈した fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識抗マウスIg (Sigma 社) を  $100 \mu\text{l}$  加えて30分間反応させた。PBS で洗浄後、その蛍光強度を FACS (Becton-Dickinson 社) で測定した。

表1 本実験に用いたガングリオ系糖脂質

Glycolipid	Structure
Neutral	
LacCer	Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4Glc-Cer
G <sub>1</sub> Cer	GalNAc $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4Glc-Cer
G <sub>2</sub> Cer	Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3GalNAc $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4Glc-Cer
a-Pathway	
GM3	NeuAco2 $\rightarrow$ 3Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4Glc-Cer
GM2	GalNAc $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4(NeuAco2 $\rightarrow$ 3)Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4Glc-Cer
GM1	Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3GalNAc $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4(NeuAco2 $\rightarrow$ 3)Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4Glc-Cer
GD1a	NeuAco2 $\rightarrow$ 3Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3GalNAc $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4(NeuAco2 $\rightarrow$ 3)Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4Glc-Cer
GT1a	NeuAco2 $\rightarrow$ 8NeuAco2 $\rightarrow$ 3Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3GalNAc $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4(NeuAco2 $\rightarrow$ 3)Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4Glc-Cer
b-Pathway	
GD3	NeuAco2 $\rightarrow$ 8NeuAco2 $\rightarrow$ 3Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4Glc-Cer
GD2	GalNAc $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4(NeuAco2 $\rightarrow$ 8NeuAco2 $\rightarrow$ 3)Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4Glc-Cer
GD1b	Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3GalNAc $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4(NeuAco2 $\rightarrow$ 8NeuAco2 $\rightarrow$ 3)Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4Glc-Cer
GT1b	NeuAco2 $\rightarrow$ 3Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3GalNAc $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4(NeuAco2 $\rightarrow$ 8NeuAco2 $\rightarrow$ 3)Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4Glc-Cer
GQ1b	NeuAco2 $\rightarrow$ 8NeuAco2 $\rightarrow$ 3Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3GalNAc $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4(NeuAco2 $\rightarrow$ 8NeuAco2 $\rightarrow$ 3)Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4Glc-Cer
c-Pathway	
GT3	NeuAco2 $\rightarrow$ 8NeuAco2 $\rightarrow$ 8NeuAco2 $\rightarrow$ 3Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4Glc-Cer
GT2	GalNAc $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4(NeuAco2 $\rightarrow$ 8NeuAco2 $\rightarrow$ 8NeuAco2 $\rightarrow$ 3)Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4Glc-Cer
Miscellaneous	
GM1b	NeuAco2 $\rightarrow$ 3Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3GalNAc $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4Glc-Cer

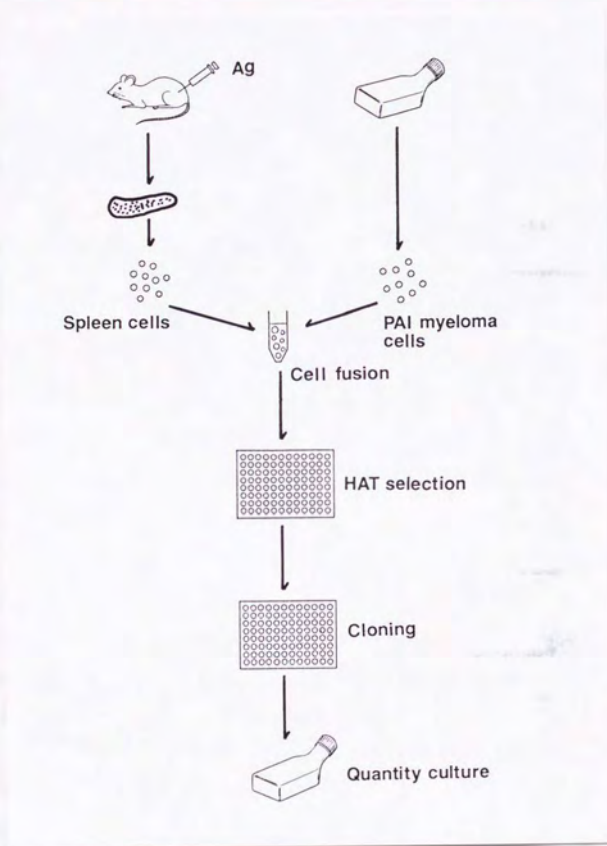


図2 MAb 作製の実験プロトコール

### 第3節 結果

#### (1) a 経路ガングリオシドに対する MAb の作製

各 a 経路ガングリオシドを免疫原として C3H/HeN マウスに免疫することにより、免疫原性の低い上記ガングリオシドに対する特異的 MAb の作製に成功した。本実験において得られた a 経路ガングリオシドに対する MAb を表 2 にまとめた。以下、これらの抗体の抗原特異性と細胞における発現について解析した。

#### (2) ELISA による MAb の特異性の検討

各 MAb の特異性について、一次スクリーニングとして抗原固相 ELISA により解析した。GM3 と GM2 に対する MAb の作製は既に報告があり、その抗原特異性についても詳細に検討されている<sup>[56, 57, 64, 65]</sup>。従ってここでは、GM1、GD1a 並びに GT1a に対して作製した三つの MAb の特異性について詳細に検討した結果について述べる。図 3 に示したように、抗 GM1 MAb と抗 GT1a MAb は、抗体量及び抗原量依存的に各々の抗原 (GM1 と GT1a) に対して特異的に反応した。GD1a ガングリオシド及び中性糖脂質には全く反応しなかった。一方抗 GD1a MAb は、GD1a に強い反応を示したが、GM1b と GT1b に対しても弱い反応が認められた。これ以外のガングリオシド及び中性糖脂質には全く反応しなかった。これらの結果から、抗 GM1 MAb と抗 GT1a MAb は、抗原特異性が極めて高いことが示唆され、一方抗 GD1a MAb は、GM1b や GT1b との交叉反応性から、末端 NeuAc  $\alpha$  2-3Gal  $\beta$  1-4GalNAc の三糖を認識しているものと考えられた。

表 3 に示すように、抗 GM3 MAb、抗 GD1a MAb 及び抗 GT1a MAb は、N-アセチルノイロミン酸 (NeuAc) と N-グリコシルノイロミン酸 (NeuGc) を識別し、NeuAc を含むガングリオシド特異的に反応することが確認された。

#### (3) TLC 免疫染色法による MAb の特異性の解析

牛脳と M14 ヒトメラノーマ細胞から得たガングリオシドを TLC で展開後、各 MAb で酵素免疫染色を行った。図 4 に示したように抗 GM1 MAb と抗 GT1a MAb は、それぞれ GM1 と GT1a に特異的に反応した。抗 GD1a MAb は、GD1a 以外に GM1b と GD1a にも反応した。抗 GM2 MAb は、GM2 のみに反応した (not shown)。抗 GM3 MAb は、GM3 以外に GM1b、GD1a、GT1b 及び IV<sup>3</sup>NeuAc  $\alpha$ -nLc<sub>6</sub>Cer にも反応した (not shown)。これらの結果は、ELISA の結果と良く一致していた。

(4) 各種細胞株化細胞における a 経路ガングリオシドの発現について

上記 MAb を用いて幾つかの株化細胞における a 経路ガングリオシドの細胞膜表面上での発現について、FACS を用いて解析した。表 4 に、その結果のまとめを示した。GM1 は 18-4 に強く、RBL-2H3、Jarkat、K562 及び MT-1 には弱く発現していることが観察された。GD1a は、18-4、Jarkat 及び K562 に弱く発現していた。一方、GT1a は、本実験に用いた何れの細胞にも発現は認められなかった。図 5 に、GM1 と GD1a の 18-4 と Jarkat における FACS 解析の結果を示した。

Cell Line	GM1	GD1a
18-4	Strong	Weak
RBL-2H3	Weak	Weak
Jarkat	Weak	Weak
K562	Weak	Weak
MT-1	Weak	Weak



表2 a 経路ガングリオシドに対する MAb。

酸処理した *S. minnesota* (250  $\mu$ g/マウス) に精製ガングリオシド (10  $\mu$ g/マウス) を吸着させたものを免疫原とし、C3H/HeNマウスの尾静脈に免疫した。免疫は、5回行った。最終免疫から3日後、免疫マウスの脾細胞と PAI ミエローマ細胞を細胞融合させ、HAT 選択培地によりハイブリドーマ細胞を得た。目的とする抗体産生ハイブリドーマ細胞の選択は、ELISA 並びに TLC 免疫染色により行った。

Mab	Ganglioside used as immunogen	Ig isotype
GMR6	GM3	IgM ( $\kappa$ )
GMB28	GM2	IgM ( $\kappa$ )
GMB16	GM1	IgM ( $\kappa$ )
GMR17	GD1a	IgM ( $\kappa$ )
GMR11	GT1a	IgM ( $\kappa$ )

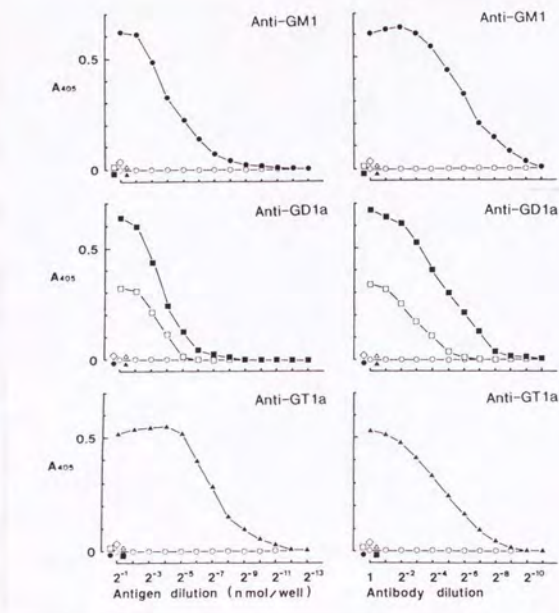


図3 ELISAによる三種のMAb(抗GM1、抗GD1a及び抗GT1a)の各種糖脂質に対する反応性。

各穴に異なる濃度に固相した各種糖脂質に対する抗GM1(左上段)、抗GD1a(左中段)及び抗GT1a(左下段)の反応性を示した。各MAbは、ハイブリドーマ細胞培養上清を用いた。一定濃度に固相した各種糖脂質に対する種々の濃度の抗GM1(右上段)、抗GD1a(右中段)及び抗GT1a(右下段)の反応性を示した。●、GM1；■、GD1a；▲、GT1a；○、他のa経路ガングリオシド(GM3とGM2)；◇、b経路ガングリオシド(GD3、GD2、GD1b並びにGQ1b)；□、GM1bとGT1b；△、中性糖脂質(グルコセレブロシド、ガラクトセレブロシド、ラクトシルセラミド、アシアロGM2、アシアロGM1、グロボトリグルコシルセラミド、グロボシド並びにフォルスマン抗原)。抗GM1と抗GT1aは、対応するガングリオシドとのみ反応し、極めて特異性が高いことを示した。抗GD1aは、対応するガングリオシド以外にGM1bとGT1bに対しても反応したが、それは糖鎖末端が互いに類似した構造のためと考えられた。

表3 各 MAb の糖脂質に対する反応性。

糖脂質 <sup>a</sup>	単クローン抗体 (MAb)				
	抗 GM3	抗 GM2	抗 GM1	抗 GD1a	抗 GT1a
GM3	+++ <sup>b</sup>	-	-	-	-
GM3(NeuGc)	-	-	-	-	-
GM2	-	+++	-	-	-
GM2(NeuGc)	-	++	-	-	-
GM1	-	-	+++	-	-
GM1(NeuGc)	-	-	++	-	-
GD1a	++	-	-	+++	-
GD1a(NeuGc,NeuGc)	-	-	-	-	-
GT1a	-	-	-	-	+++
GM1b	++	-	-	++	-
GT1b	++	-	-	++	-
GM4	+	-	-	-	-
IV <sup>3</sup> NeuAc $\alpha$ -nL <sub>4</sub> Cer	++	-	-	-	-
IV <sup>3</sup> NeuGc $\alpha$ -nL <sub>4</sub> Cer	-	-	-	-	-

<sup>a</sup>記載のないガングリオシドのシアル酸は、NeuAc を表わす。各 MAb は、上記以外のb 経路ガングリオシド (GD3、GD2、GD1b 並びに GQ1b) 及び中性糖脂質 (グルコセレブロシド、ガラクトセレブロシド、ラクトシルセラミド、アシアロ GM2、アシアロ GM1、グロボトリグルコシルセラミド、グロボシド並びにフォルスマン抗原) に対しても全く反応性を示さなかった。

<sup>3</sup>+++、強；++、中；+、弱；-、陰性。

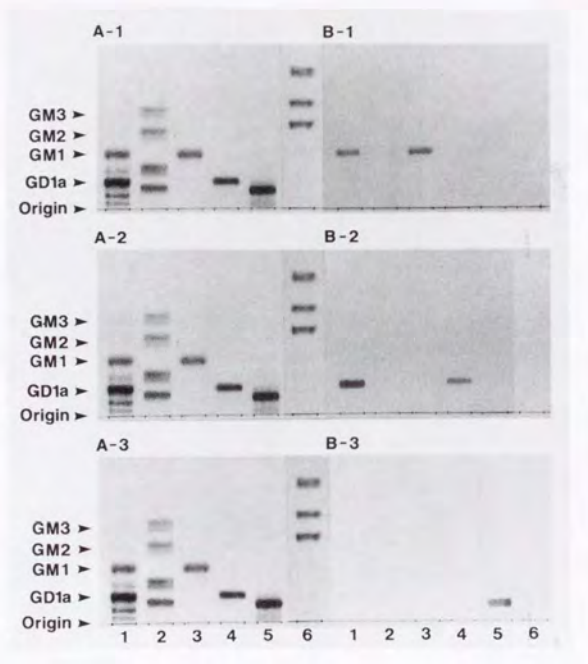


図4 TLC免疫染色による三種のMAb (抗 GM1、抗 GD1a 及び抗 GT1a) の標準ガングリオシドに対する反応性の検討。

(A) 牛脳ガングリオシド画分 (レーン1)、M14ヒトメラノーマ細胞ガングリオシド画分 (レーン2)、精製GM1 (レーン3)、精製GD1a (レーン4)、精製GT1a (レーン5)、中性糖脂質 (ラクトシルセラミド、アジアロGM2並びにアジアロGM1) (レーン6) をクロロホルム:メタノール:0.22% CaCl<sub>2</sub> (55:45:10、V/V) で展開し、オルシノール発色を行った。各試料の添加量は、全て10nM/レーンで行った。(B) 上記と同様のガングリオシドを同様に展開し、三種のMAbを用いて免疫染色を行った。1、抗GM1; 2、抗GD1a; 3、抗GT1a。各MAbは、それぞれに対応するガングリオシドにのみ反応した。B3において、牛脳ガングリオシド画分にはGT1aが存在しているが、抗GT1aは反応しなかった。その理由として、牛脳ガングリオシド画分に含まれるGT1aの量は、検出限界以下であったと考えられた。

表4 TLC免疫染色による各種白血病細胞の発現ガングリオシドの解析。

		Ganglioside <sup>a</sup>		
		GM1	GD1a	GT1a
Mouse	I8-4	+++ <sup>b</sup>	+	-
	EL4	-	-	-
	RBL5	-	-	-
	BALBRVE	-	-	-
	YAC1	-	-	-
	B6RV1	-	-	-
	I-29	-	-	-
	RLM1	-	-	-
Rat	RBL-2H3	++	-	-
Human	Jurkat	+	+	-
	K562	+	+	-
	MT-1	+	-	-
	CCSF-CEM	-	-	-
	IM-9	-	-	-
	Raji	-	-	-
	HL-60	-	-	-
	Hut102	-	-	-
	Hut78	-	-	-
HPB-ALL	-	-	-	
Molt-4	-	-	-	

<sup>a</sup>抗GM1、抗GD1a並びに抗GT1aを用いたTLC免疫染色によって検出した結果を示す。GM1とGD1aは幾つかの細胞において検出されたが、GT1aは検出されなかった。

<sup>b</sup>+++、強；++、中；+、弱；-、陰性。

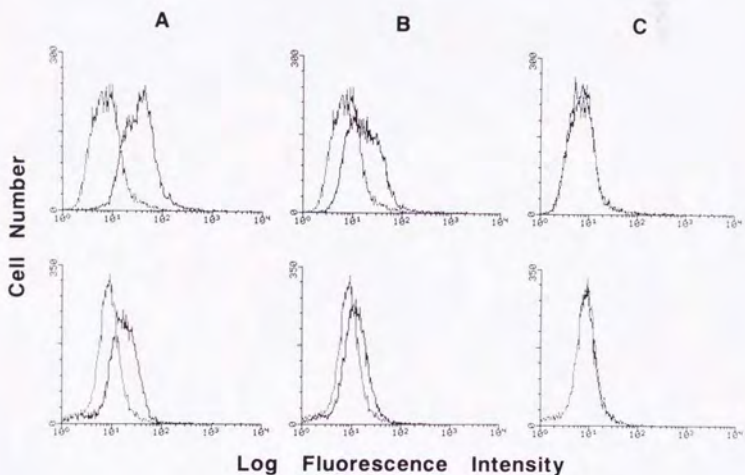


図5 各種白血病株化細胞上に発現しているgangliosideのFACS解析による同定。各種細胞にMAbを加えて4℃1時間反応させた。1% BSAを含むPBSで洗浄後、FITC標識抗マウスIgMを加えて4℃30分間反応させた。1% BSAを含むPBSで洗浄後、一定量のPBSを加えて細胞浮遊液とし、これをFACS star (Becton Dickinson社) 解析に供した。抗GM1 (A)、抗GD1a (B) 及び抗GT1a (C) と反応させた細胞上のganglioside発現量を、横軸の蛍光強度で示す。縦軸は細胞数を示す。各図の左側のピークは陰性コントロールを示す。上段は18.4細胞、下段がJarakat細胞。抗GM1 (A) と抗GD1a (B) で染色した18.4細胞とJarakat細胞では、蛍光強度が右側にシフトし、明らかに細胞表面上にGM1とGD1aが発現していることを示す。抗GT1a (C) で染色した場合、両者の細胞は全く右側にシフトせず、このことは細胞表面上にGT1aが発現していないことを示す。

## 第4節 考察

本実験で、ガングリオシドに対して強い免疫応答能を有する近交系マウス C3H/HeN を免疫動物として用いることによって、a 経路ガングリオシド (GM3, GM2, GM1, GD1a 及び GT1a) を各々特異的に認識する MAb の作製に成功した。

これまで高力価で特異性の高い抗ガングリオシド MAb を得ることは困難であると考えられてきた。その理由として、主に次の二つのことが考えられる。1) 一般的に、糖鎖は免疫原性が低い。従って、微細な糖鎖構造上の差異を識別する抗体ができにくい。2) 得られた抗体の特異性について、タンパク質分子のような高感度な検定法の確立が不十分である。後者の点については、ガングリオシド固相 ELISA 法や TLC 免疫染色法の開発によって解決された<sup>(62, 63)</sup>。前者については、近交系マウス C3H/HeN がガングリオシドに対して強い免疫応答性を示すことから、C3H/HeN マウスの MAb 作製のための免疫動物としての有効性で示唆されたことによって、解決の糸口が得られた<sup>(69)</sup>。事実、C3H/HeN マウスに各種の a 経路ガングリオシドを免疫することによって、比較的容易に各ガングリオシドに対する特異的 MAb を作製することができた。このことは、他の近交系マウスに比べて C3H/HeN マウスは、各種ガングリオシド抗原に対して免疫応答が惹起されやすく、その結果として抗体産生細胞 (B 細胞) が増加し、PAI ミエロマ細胞との融合効率が高まったことによるものと推察された。実際、同様の方法によって、b 経路ガングリオシド (GD3, GD2, GD1b, GT1b 及び GQ1b) に対する特異的 MAb も作製された<sup>(61)</sup>。

a 経路ガングリオシドに分類される GM3, GM2 及び GM1 に対する MAb の作製については、いくつかの研究グループによって報告されている<sup>(66, 67, 64, 66)</sup>。特に、抗 GM3 MAb と抗 GM2 MAb は、その特異性について詳細に検討され<sup>(66, 64)</sup>、現在では市販されている。しかし、これまで GD1a と GT1a に対する MAb 作製についての報告はなく、本研究が初めてである。抗 GT1a MAb、抗 GM1 MAb 及び抗 GM2 MAb の特異性は、極めて高いことが示された (図 2、表 4)。抗 GM1 MAb は、GM1 から末端ガラクトースが 1 分子少ない GM2 を全く認識しない。更に、GM1 にシアル酸 1 分子付加された GD1a と GD1b、及び GM1 からシアル酸 1 分子が外れた構造の GA1 に対して、全く反応しなかった。従って、抗 GM1 MAb の認識エピトープは、シアル酸を結合した内部のガラクトース、すなわち NeuAc  $\alpha$  2-3Gal- 並びに NeuGc  $\alpha$  2-3Gal- であろうと示唆された。一方 GD1a と GM3 に対する特異的 MAb は、作製することができなかった。抗 GM3 MAb は、GM3 のみならず、GM4, GD1a, GM1b, GT1b

及びシリアルパラグロボシドにも反応することから、そのエピトープは末端 NeuAc  $\alpha$  2-3Gal-  
であろうと考えられた。抗 GD1a MAbs の認識エピトープは、その反応性から NeuAc  $\alpha$  2-3Gal  
 $\beta$  1-3GalNAc であろうと推定された。

ganglioside の細胞膜上における機能を *in vitro* で解析するための基礎的検討として、  
細胞膜上の ganglioside の発現の程度を確認することは重要である。本実験の結果から、  
ラット白血病細胞株化細胞の1つである RBL 2H3 には、 $\alpha$  経路 ganglioside の中で GM1  
のみが発現していることが確認された。RBL 2H3 細胞は、GM1 の *in vitro* における機能的  
解析のための有効な細胞株となりうる可能性がある。

生命科学分野における MAbs の有効性については、既に周知の事実となっている。従って、  
今後、各種 ganglioside に対する特異的な MAbs を免疫学的プローブとして駆使すること  
により、これまで十分には明らかにされていなかった ganglioside の機能的な役割につい  
ての分子論的考察が加えられるものと期待される。



## 第2章 成熟ラット中枢神経組織における 主要ガングリオシドの分布

### 第1節 序 論

ガングリオシドは、脊椎動物の神経系に多く存在することが、生化学的解析によって明らかにされている<sup>3)</sup>。また、神経組織の各部位についても生化学的解析によって、ガングリオシドはシナプス領域及び白質に多く存在することが示されている<sup>5,7)</sup>。更に、ラット胎児の各発達段階から成熟までの大脳と小脳組織の形態形成過程において、ガングリオシドは質量的に変化し、胎生初期から中期においてはGM3とGD3が量的に主要であるが、胎生後期から成熟するに従ってGM1、GD1a、GD1b、GT1b及びGQ1bへと組成が変化することが報告されている<sup>40, 41)</sup>。ところが、胎生期及び成熟期の神経組織におけるガングリオシドの分布を免疫組織化学的に解析した報告は極めて少ない<sup>8)</sup>。従って、ガングリオシドが神経組織のどの細胞及び層に分布しているのかを、形態学的に明確に示すことはできない。その原因の一つは、その解析のために有効な免疫学的プローブが極めて少なかったことにある。特に、成熟ラット脳・神経系組織における主要ガングリオシド(GM1、GD1a、GD1b、GT1b及びGQ1b)の免疫組織化学に有効なMAbが作製されていないのが現状である。

ところで、脳組織内におけるガングリオシドの存在意義並びに機能的役割については、これまでのところほとんど解明されていない。最近、脳組織におけるガングリオシドの機能に関する興味ある報告がなされた<sup>9)</sup>。その報告では、インターフェロン $\gamma$ で処理することによってアストログリアはMHC class I及びclass IIを発現するが、同時にガングリオシドを添加することによってその発現を恒常的に抑制することが*in vitro*の系で示され、更にガングリオシドの抑制機構についても究明している。一般的に形態形成などに重要な機能タンパク質は、ある細胞集団や組織、もしくは領域に特異的に分布しており、その発現組織及び細胞を用いて詳細なメカニズムの解析がなされる。従って、ガングリオシドの脳組織における機能的役割を解析していくための一つのアプローチとして、その組織内分布を明確にすることは極めて重要な基礎的知見を提示するものと考えられる。

そこで本章では、前章で確立したガングリオシドに対する特異的MAbを用い間接蛍光抗体法により、成熟ラット中枢神経系、特に小脳、大脳(大脳皮質、海馬)並びに脊髄における主要ガングリオシドの分布を明らかにすることを試みた。これらの中枢神経組織は、何れ

も層構造が明瞭であり、更に形態学的知見が十分に蓄積されている<sup>69)</sup>ことから、ガングリオシドの組織内分布の形態学的同定が比較的容易であると考え、解析部位として着目した。その結果、主要ガングリオシドは、各中枢神経組織の細胞及び層に特異的に分布していることが初めて明らかになった。

## 第2節 材料及び方法

動物：生後12-14週齢の成熟 Wister ラット（雌）を日本チャールズリバー社より購入し、実験に用いた。

糖脂質：GM1、GD1a、GD1b 及び GT1b は、牛脳より精製した。GQ1b（牛脳）は、ヤマトン社より購入した。ラット小脳、大脳及び脊髄組織からのガングリオシドの抽出は、Svennerholm と Fredman (1980)<sup>(70)</sup> の方法に従って行った。表5には、成熟ラット脳における主要ガングリオシドの構造を模式的に示した。

MAb：用いた抗体は、第1章で作製した抗 GM1 MAb と抗 GD1a MAb、更に Ozawa ら (1992)<sup>(61)</sup> によって作製された抗 GD1b MAb、抗 GT1b MAb 並びに抗 GQ1b MAb の五種類である。表5に各 MAb の性状を示した。上記以外のプローブとして、FITC 標識コレラトキシンB-サブユニット (Sigma社) と抗グリア繊維性酸性タンパク質 (GFAP) MAb (IgG) (Sigma社) を使用した。

薄層クロマトグラフィー(TLC)：第2章の第2節に述べた方法に従って行った。

TLC 免疫染色法：第2章の第2節に述べた方法に従って行った。

間接蛍光抗体法：ラットはジエチルエーテルで麻酔した。その後、速やかに頭蓋骨及び頸部脊椎を剥離することによって大脳、小脳及び頸部脊髄を摘出した。摘出した各組織は、液体窒素で急速凍結した後、-100℃に用時まで保存した。凍結ラット神経組織は、クリオスタットミクロトーム (Leica社) で厚さ7 $\mu$ m の連続凍結切片を作製し、それらをスライドガラス上に保持した。切片を十分に風乾後、冷アセトンで5分間固定し、5% BSAを含むPBSで1時間ブロッキングした。一次抗体 (ハイブリドーマ培養上清) を加えて4℃で一晩反応させた。1% BSAを含むPBSで洗浄後、1% BSAを含むPBSで100倍希釈した二次抗体 [FITC 標識抗マウス IgM F(ab)<sub>2</sub> もしくは IgG F(ab)<sub>2</sub>] (Tago社) を加えて室温で1時間反応させた。1% BSAを含むPBSで洗浄後、免疫蛍光用封入剤 (Lipshaw Immunon社) で組織を封入し、落射蛍光顕微鏡 Axiophoto II (Zeiss社) で顕鏡した。対照用の一次抗体は、上記一次抗体と同じアイソタイプのマウス Ig [TEPC (IgM) と MOPC (IgG2b) ; Sigma社] を用いた。コレラトキシンB-サブユニットによる染色は、切片を冷アセトン固定及びブロッキング後、1% BSAを含むPBSで1000倍希釈した FITC 標識コレラトキシンB-サブユニット (Sigma社) を加え、室温で1時間反応させ、洗浄後、上記と同様に封入し、蛍光顕微鏡による観察に供

した。組織の一般染色は、クリューバー-バレラ (KB) 染色とヘマトキシリン-エオジン (HE) 染色により行った。

**組織切片の酵素処理：**組織のシアリダーゼ処理は、0.05M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) で1 U/ml に調整した *Arthrobacter ureafaciens* シアリダーゼ (Calbiochem 社) をアセトン固定した切片に加え、37°C で2時間反応させた。トリプシン処理は、PBS で0.025% に調整したトリプシン (Sigma 社) を切片上に加え、37°C で10分間反応させた。組織切片からの糖脂質の有機溶媒による抽出は、クロロホルム：メタノール (2:1, V/V) 混液で室温1時間処理することにより行った。

**Western blotting：**脳組織を1% トリトンX-100、0.34M ショ糖、5mM エチレングリコール-O,O'-ビス(2-アミノエチル)-N,N,N',N'-四酢酸 (EGTA)、0.1% アプロチニン、1mM フッ化フェニルメチルスルホニル (PMSF) を含む0.05 M トリス緩衝液 (pH 8.3) でホモジナイズし、4°C で5000 rpm で遠心した後、上清を回収した。その上清を、1.7% ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) と4% 2-メルカプトエタノール (2 ME) の存在下で5分間ボイルした後、7.5% SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS PAGE) を行ない、Towbinら (1979) <sup>11)</sup> の方法に従ってニトロセルロース膜 (Millipore 社) へ転写させた。ニトロセルロース膜をレーンごとにカットし、10% BSA を含む PBS に1時間浸してブロッキング後、一次抗体 (ハイブリドーマ培養上清) を加えて4°C で一晩反応させた。1% BSA を含む PBS で洗浄後、1% BSA を含む PBS で100倍希釈した二次抗体 (パーオキシダーゼ標識抗マウス IgG もしくは IgM、Cappel 社) を加えて室温で2時間反応させた。1% BSA を含む PBS で十分に洗浄後、基質溶液を加えて30分間反応させた。基質溶液は、0.3% 4-クロロ-1-ナフトールのメタノール溶解10ml に10mM トリス緩衝液生理食塩水 (TBS) を50 ml と過酸化水素水 5  $\mu$ l を混合したものをを用いた。

表5 成熟ラット脳における主要ガングリオシドの化学構造の模式図並びに本実験に用いたそれらに対する特異的 MAb。

Ganglioside	Structure	MAb	Ig isotype
GM1		GMB16	IgM (x)
GD1a		GMR17	IgM (x)
GD1b		GGR12	IgG2b (x)
GT1b		GMR5	IgM (x)
GQ1b		GMR13	IgM (x)

■, Glc; ○, Gal; □, GalNAc; △, NeuAc; —, Cer.

### 第3節 結果

#### (1) 成熟ラット脳組織におけるガングリオシドの生化学的解析

成熟ラットの脳、小脳及び脊髄に存在するガングリオシドの解析は、TLC並びにTLC免疫染色により行った。脳、小脳及び脊髄におけるガングリオシド含量(シアル酸結合脂質量)は、その湿重量(g)当たり403.5 $\mu$ g、818.1 $\mu$ g及び343.3 $\mu$ gであった。図6Aは、脳の各部位より抽出したガングリオシド画分をTLCにより解析した結果を示す。TLCパターンは、各組織とも基本的によく類似していた。標準ガングリオシドの移動度との対比から、成熟ラット脳、小脳及び脊髄における主要ガングリオシドは、GM1、GD1a、GD1b、GT1b並びにGQ1bであることが示唆された。脳の各部位間において唯一異なった点は、脊髄のGD1a含量が他の部位に比べて有意に少ないことであった。

同様のガングリオシド画分を用いて、主要ガングリオシドに対する特異的MAbを用いたTLC免疫染色を行い、免疫学的同定を行った。図6Bに示すように、各MAbはそれぞれに対応するガングリオシドに対して特異的に反応した。その結果、脳の各部位における主要ガングリオシドは、GM1、GD1a、GD1b、GT1b並びにGQ1bであることが確認された。一方、コレラトキシンBサブユニットは、GM1のみならずGD1bにも強く反応した。

#### (2) 成熟ラット中枢神経組織における主要ガングリオシドの免疫組織化学

##### A) 小脳における分布

ラット小脳は、肉眼的に正虫部分の虫部と両側の小脳半球とに区別される。図7は、成熟ラット小脳半球の矢状断面の模式図を示す<sup>(72)</sup>。ラット小脳の組織構築は、表層の皮質と深層の髄質から成る(図7A)。皮質は、表面から神経細胞が乏しく主に無髄線維により構成される分子層(m)、大型の神経細胞であるプルキンエ細胞が一行に配列したプルキンエ細胞層(p)及び小型の神経細胞である顆粒細胞により構成されている顆粒層(g)の三層に、髄質は有髄線維より成る白質に、それぞれ区別されている(図7B)。

図8は、成熟ラット小脳半球の縦断面での染色結果を示す。図8Fは、小脳組織のクリューパー・バレー染色(K-B染色)で染色した染色像を示す。K-B染色では、有髄線維の髄質が緑青色に、神経細胞体や核をそれぞれ紫色に染色する。成熟ラット小脳半球の矢状断面をK-B染色すると、小脳皮質は表層から染色性の乏しい層(分子層;m)、その下部に一行に配列する大型神経細胞の層(プルキンエ細胞層;p)、更に小型の神経細胞が密に集積している細胞層(顆粒層;g)に分染された(図8F)。また、最深部に白質(w)が観察された(図

8F)。

小脳の主要ガングリオシドに特異的な MAb を用いた間接蛍光抗体法による染色を行い、主要ガングリオシドの分布について組織学的に解析した。その結果を図 8 A から E に示す。抗 GM1 MAb は、白質 (w) 領域を線維状に、分子層 (m) は幾筋もの線状に、更に顆粒層 (g) では散在した点状に染色した。しかしプルキンエ細胞層 (p) は、全く染色しなかった。白質 (w) と顆粒層 (g) における GM1 の分布は、アストログリアのタンパク質マーカーの一つである抗 GFAP MAb の染色パターン (not shown) との比較と顆粒層並びに白質の組織構築から、アストログリアとオリゴデンドログリアと考えられた。また分子層 (w) における GM1 の分布は、パーガマンガリアと考えられた。パーガマンガリアは、アストログリアのマーカー (GFAP) を用いた解析からアストログリアの一種と考えられており、プルキンエ細胞層 (p) のプルキンエ細胞間にその細胞体が存在し、その突起を表面に向かって線状に伸ばしている。

抗 GD1a MAb は、主に分子層 (m) 全体を比較的均一にしかも密に強く染色した (図 8 B)。顆粒層 (g) は弱く染色されたが、白質 (w) 及びプルキンエ細胞層 (p) は全く染色しなかった (図 8 B)。分子層 (m) は神経細胞の乏しい領域であり、主に顆粒細胞の軸索突起である無髄の平行線維 (T 型神経線維とも記載される)、プルキンエ細胞の樹状突起及び延髄のオリブ核から白質 (w) を経てプルキンエ細胞の樹状突起とシナプスを形成する登上線維 (分子層では無髄となる) によって構築される。染色によって構成線維を区別することはできなかったが、抗 GD1a MAb はプルキンエ細胞体を染色しないことと、分子層 (m) における染色の均一性から考えて、GD1a は主に平行線維に分布していると考えられた。また、分子層 (m) を構成しているサテライト並びにバスケット細胞などの神経細胞を染色しているような染色像が得られないことから、これらの細胞には分布していないと考えられた。

抗 GD1b MAb は、顆粒層 (g) 全体にわたって小型細胞を強く染色していた (図 8 C)。しかし他の各層 [分子層 (m)、プルキンエ細胞層 (p) 及び白質 (w)] は、全く染色しなかった (図 8 C)。顆粒層 (g) は、小型の神経細胞である顆粒細胞とその突起、神経膠細胞、更に橋核などから白質 (w) を経て顆粒細胞の樹状突起とシナプスを形成する苔状線維、分子層 (m) に終息する登上線維及びプルキンエ細胞の軸索突起が複雑に入り組んだ領域であるが、その染色が顆粒層 (g) に限局されていることと、その染色パターンから、GD1b は主に顆粒層 (g) の顆粒細胞に分布していると推察された。

抗 GT1b MAb は、分子層 (m)、顆粒層 (g) 及び白質 (w) を強く染色した (図 8 D)。

しかしプルキンエ細胞層 (p) は、全く染色しなかった。分子層 (m) と白質 (w) は比較的均一に、顆粒層 (g) は網目状に染色された。小脳全体の組織構築とその染色パターンから、GT1b の分布領域は苔状線維、登上線維並びに平行線維と考えられた。

抗 GQ1b MAb は、顆粒層 (g) の極めて限られた領域を点状に強く、また顆粒層 (g) の一部を弱く染色した (図 7 E)。しかし、他の各層 [分子層 (m)、プルキンエ細胞 (p) 層及び白質 (w)] は全く染色しなかった。点状に染色された領域は、顆粒層 (g) の上部に位置し、プルキンエ細胞層の直下という極めて限られたところであった。顆粒層 (g) において、顆粒細胞以外に見られる特徴的な構造としては、小脳糸球が考えられる。小脳糸球は、顆粒細胞の樹状突起と苔状線維及びゴルジ細胞の軸索とで形成される複合シナプスであり、神経細胞のない小さな島状の構造を示す。このことから、GQ1b は一部の小脳糸球のシナプス形成領域に局在して分布すると考えられた。

## B) 大脳皮質における分布

ラットの大脳皮質は大脳の表層に位置する (図 9 A) <sup>(72)</sup>。ところで、ヒト大脳皮質の頭頂部から後部に位置する部位の冠状断面をゴルジ、ニッスル及び髄鞘染色のような染色法によって観察すると、何れも六層に区別される (図 9 B) <sup>(73)</sup>。細胞構築の違いによって表層から分子層 (I 層)、外顆粒層 (II 層)、外錐体細胞層 (III 層)、内顆粒層 (IV 層)、内錐体細胞層 (V 層) 及び多形細胞層 (VI 層) に区別され、更に多形細胞層の下部に白質層が位置する。また線維構築の違いによって、表層から切線線維、放線上交織、外バイエルジェ線、髄放線及び放線間交織に区別され、最下部に白質の有髄線維が位置する。

成熟ラット大脳頭頂部より 3 から 4 mm 後部の部位を冠状に組織を切り出し、KB 染色した像を図 10 F に示す。KB 染色は、ニッスル染色と同様に細胞体を明瞭に染色し、更に有髄線維によって構成されている白質 (w) を分染した。その結果、ラット大脳皮質においてもヒト大脳皮質と同様に細胞構築の違いから各細胞層に区別されたが、ラットでは II 層と III 層の境界が不明瞭で、II/III 層として一つの層にまとめ、五層に区別した。

上記と同様の切片を主要ガングリオシドに特異的な MAb を用いた間接蛍光抗体法によって染色を行った。その結果を図 10 A から E に示す。抗 GM1 MAb は白質を比較的強く染色したが、同時に大脳皮質の I 層から V 層までの各層も弱く染色した (図 10 A)。KB 染色との対比から、GM1 は少なくとも神経細胞及び神経線維以外に分布し、その分布はおそらく神経膠細胞 (アストログリア及びオリゴデンドログリア) と推察した。



抗 GD1a MAb は、大脳皮質を三層の帯状に染色した。この三層は、K-B 染色 (図10 F) による層分類から I 層と II/III 層、V 層の上部、それに VI 層上部の領域と考えられた (図10 B)。IV 層、V 層の下部、VI 層の下部及び白質は、全く染色されなかった。染色された各層は比較的均一であり、細胞体の染色像が見られないことから、線維様構造を染色したと考えられた。GD1a の分布を線維構築 (図9 B) を基に分類すると、切線線維 (I 層)、放線上交織 (II 層)、内バイエルジェ線 (V 層) と考えられた。しかし VI 層の上部領域の分布については、特定することができなかった。

抗 GQ1b MAb の染色は弱いものであったが、帯状に IV 層と V 層下部を、放射状に VI 層下部を染色した (図10 E)。他の層及び白質は、全く染色しなかった。抗 GQ1b MAb の染色は、抗 GD1a MAb と同様に神経細胞を染色したような染色像を示さなかった。GQ1b の分布を線維構築 (図9 B) を基に分類すると、外バイエルジェ線 (IV 層) と放線間交織の一部 (VI 層から表層に向かう線維) に分布していると考えられた。V 層の下部については、明確にできなかった。

抗 GD1b MAb は III 層以下の各層を均一に強く、白質 (w) を弱く染色した (図10 C)。しかし、線維状に染色しているのか、あるいは細胞体を染色しているのかは、識別できなかった。I 層と II 層は全く染色しなかった (図10 C)。

抗 GT1b MAb は II/III 層から VI 層と白質 (w) を染色し、I 層はほとんど染色しなかった (図10 D)。各層で染色の濃淡が見られ、II/III 層と V 層で強く染色された。更に VI 層から II/III 層にかけて放射状に染色した。神経細胞体を染色しているような像は得られなかった。GT1b の分布を線維構築 (図9 B) を基に分類すると、主に放線上交織 (II 層)、内バイエルジェ線 (V 層) 及び放線間交織 (VI 層から II/III 層にかけて放射状構造) であると考えられた。

### C) 海馬における分布

ラット海馬は大脳皮質 (新皮質) の脳梁 [白質 (w)] の直下に層構造を有した領域として見られる (図11 A) <sup>(79)</sup>。その構造は歯状回とともに構成されている。歯状回は、三層構造を呈しており、海馬溝に面している表層部から深層にかけて分子層 (m)、顆粒層 (g) 並びに多形細胞層 (p.l) と呼ばれている。海馬皮質の層構築は、海馬白板 (a) に続いて以下の五層に区別されている (図11 B)。表層から、上昇層 (o)、錐体細胞層 (p)、放射層 (r)、網状層 (l) 及び分子層 (m) である。上昇層 (o) には、錐体細胞の軸索と多極性の籠細胞が

見られる。錐体細胞層 (p) は、大型と小型の錐体細胞によって構築されており、更にその神経回路及び錐体細胞の構成の違いから CA1、CA2、CA3 及び CA4 の四つに区別されている。錐体細胞 (p) の底部は上昇層側に向き、頂上部は放射層 (r) の方向を向いている。放射層 (r) の主体は、錐体細胞 (p) の頂上部から出ている先端樹状突起で、この突起は網状層 (l)、分子層 (m) にまで伸びている。一般的に網状層と分子層は、別々な層として区別されず、網状・分子層 (l) の一層として区別され、本実験においても一つの層として記述する。成熟ラット大脳冠状面を K B 染色した組織像を図 12 F に示す。

海馬の組織構築を基に、成熟ラット海馬における主要ガングリオシドの分布について特異的 MA b を用いた間接蛍光抗体法により観察した。図 12 A から E に結果を示す。

抗 GM1 MA b は、海馬白板 (a) と網状・分子層 (l) を強く、上昇層 (o) を弱く染色した (図 12 A)。錐体細胞層 (p) 及び放射層 (r) 並びに歯状回の他の層は染色しなかった。この結果から、GM1 は海馬において網状・分子層 (l) を形成している錐体細胞の樹状突起に分布していると考えられた。

抗 GD1a MA b は、海馬の上昇層 (o) と放射層 (r) を、更に歯状回の分子層 (m) と多型細胞層 (pI) を染色したが、海馬の錐体細胞層 (p) と網状・分子層 (l) 及び、歯状回の顆粒層 (g) は全く染色しなかった (図 12 B)。この結果は、GD1a が神経細胞体に分布していないことを明瞭に示した。従って GD1a は、神経細胞の軸索、樹状突起並びにそれらによって形成されるシナプス領域に分布すると考えられた。

抗 GD1b MA b は、海馬の錐体細胞層 (p) と網状・分子層 (l) 並びに歯状回の顆粒層 (g) を染色した (図 12 C)。他の層は染色しなかった。染色された領域の状態は互いによく類似し、小型の神経細胞を染色していると考えられた。従って GD1b の分布は、海馬と歯状回における小型の錐体細胞体と顆粒細胞体であると考えられた。興味深いことに、海馬における抗 GD1a MA b と抗 GD1b MA b の染色パターンは、互いに相補的な関係を示していた。

抗 GT1b MA b は、海馬では海馬白板 (a) を強く、上昇層 (o) と放射層 (r) を弱く染色した (図 12 D)。歯状回では、分子層 (m) が比較的強く染色された (図 12 D)。海馬と歯状回における他の層は染色しなかった。GT1b の分布は、主に有髄神経と無髄線維に分布していると考えられた。

抗 GQ1b MA b は、海馬では海馬白板 (a)、上昇層 (o) 及び錐体細胞層 (p) の一部の領域のみを染色した (図 12 E)。他の層並びに歯状回の各層は、全く染色しない。抗 GQ1b MA b が染色した領域は、錐体細胞層 (p) の CA1 領域に一致していると思われた。GQ1b の

海馬における分布は、CA1 領域の錐体細胞の細胞体とその細胞の軸索突起に分布すると考えられた。

#### D) 脊髄における分布

脊髄は、上部より頸髄、胸髄、腰髄及び仙髄に分けられる。各髄節は、それぞれ形態的に若干の違いが見られるが、基本的な構築は同じである。ヒト脊髄の全体像と第四頸髄横断面の模式図を図 13 に示す<sup>73)</sup>。灰白質は H 型を呈し、腹側に突き出した部分を前角、背側に突き出した部分を後角といい、それぞれ運動神経細胞（前角細胞）と求心性神経細胞（後角）が集まる。前角と後角に挟まった部分の灰白質は、中間灰白質と呼ぶ。後角の後部末端に位置する領域は、膠様質及び海綿質と呼ばれ、それぞれ小型神経細胞が存在している。一方、Rexed (1952)<sup>74)</sup>は、ネコの頸髄の横断面を各種の染色法を用いて解析し、脊髄灰白質の神経細胞と神経線維には細胞構築上一定の領域分布を認め、それを基に十層に分類した。この分類法を Rexed 分類と呼んでいる（図 13 B）。Rexed 分類とこれまでの分類とは、第 I 層が海綿帯に、第 II 層が膠様質の、第 III 層と第 IV 層が後角固有核の、第 VI 層が後根基底部の、第 VII 層が中間灰白質の、第 VIII 層と第 IX 層が前角の内側核群の、第 X 層が前角の外側核群の領域に対応する。脊髄の白質は、灰白質を取り囲んでいる。そして、上行性、下行性及び脊髄の左右を連結する神経線維で埋められている。それらの神経線維束は左右の各側で大きく後索、側索及び前索に区別されている。

こうした組織構築を基に、ラット頸髄における主要ガングリオシドの分布について解析した。ラット第四から第六頸髄の横断面片をヘマトキシリン・エオジン染色（H E 染色）した組織像を図 14 F 示す。灰白質（g）は H 型を呈し、それを白質（w）が覆っていた。灰白質（g）は頸髄特有の組織像、すなわち前角（a）は比較的広く突出し、後角（p）の発達は乏しかった。H E 染色で観察した限りでは、ヒト頸髄の組織構築と基本的に同様であった。

頸髄における主要ガングリオシドの分布について特異的 MAb による間接蛍光抗体法により解析した（図 14 A - E）。全ての組織像は、H E 染色と同様に横断面で示す。抗 GM1 MAb は、灰白質（g）を多数の点が散在するように、白質（w）を放射状に染色したが、何れの弱も染色いものであった（図 14 A）。GM1 が分布している細胞及び神経線維を特定することはできなかったが、その染色パターンと組織構築から、一部の神経線維と灰白質（g）に存在するグリア系の細胞に分布していると考えられた。

抗 GD1a MAb は、後角（p）の末端領域を網目状に染色した（図 14 B）。灰白質（g）の他

の領域及び白質 (w) は染色しなかった。抗 GD1a MAAb の染色領域は、Rexed 分類 (図13 B) を基に分類すると、第 I 層 (海綿帯) 及び第 II 層 (膠様質) と考えられた。GD1a の分布は、第 I 層 (海綿帯) と第 II 層 (膠様質) を構成する知覚線維と小型神経細胞によって形成されるシナプス領域に分布すると考えられた。

抗 GD1b MAAb は、灰白質 (g) を粒状に、更に灰白質 (g) から白質 (w) にかけて線維状に染色した (図14 C)。しかし、白質 (w) の表層の周辺領域と後角 (p) の末端、Rexed 分類の第 I 層 (海綿帯; z.s) と考えられる領域は、染色しなかった。灰白質 (g) の粒状の染色パターンは、その周囲が比較的強く染色され、内部は染色されないことから、小型の神経細胞を染色していると考えられた。白質 (w) に線維状に染色された構造については、明確にできなかった。GD1b の分布は、主に灰白質 (g) を構成している小型の神経細胞と考えられた。

抗 GT1b MAAb は、灰白質領域を比較的均一に、また灰白質周辺の白質 (w) を細かな網目状に染色した (図14 D)。しかし、灰白質 (g) の灰白交連 (\*) 周囲領域、細胞体と考えられる構造及び後角末端 [Rexed 分類の第 I 層 (海綿帯) と第 II 層 (膠様質)] は染色しなかった (図14 D)。この染色結果からは、GT1b の分布を特定することはできないが、H-E 染色との対比から神経細胞以外であろうと推察された。

抗 GQ1b MAAb は、灰白質 (g) の中間灰白質 (I.g) 領域を強く、後角 (p) 領域を弱く染色したが、灰白質 (g) の前角 (a) 領域、Rexed 分類の第 I 層 (海綿帯) と第 II 層 (膠様質) 及び白質 (w) は全く染色しなかった (図14 E)。染色領域における染色パターンは、比較的均一であり、抗 GT1b MAAb の染色パターン (図14 D) と類似した。中間灰白質 (I.g) は、小型の神経細胞から成り、中間質の内側 (中心管側) と外側にそれぞれ核 (神経細胞が密に集合した領域) を構成している。後角 (p) は、小型の神経細胞によって幾つかの固有核が構成される。更に中間灰白質 (I.g) と後角 (p) 領域は、脊髄神経からの入力線維が出入りし、これらの神経線維と小型神経細胞の細胞体及び樹状突起との間でシナプスを形成するという複雑な形態を示す。従ってこの染色から GQ1b の分布領域は判明したが、分布の特定はできなかった。

表 6 に中枢神経組織における主要ガングリオシドの分布の観察結果をまとめた。

### (3) コレラトキシン B-サブユニットによる免疫組織化学

コレラトキシン B-サブユニットは、GM1 の特異的な検出プローブとして用いられてきた

<sup>75)</sup>。そこで、抗 GM1 MAb 染色で観察された神経組織における染色パターンと比較検討するため、FITC 標識コレラトキシン B サブユニットを用いて同様の免疫染色を行った。図 15 A に小脳の染色結果を示した。コレラトキシン B サブユニットは、顆粒層 (g) と白質 (w) を染色した。この染色パターンは、抗 GM1 MAb による染色パターン (図 8 A) とは明らかに異なっていた。コレラトキシン B サブユニットで染色された領域は、抗 GM1 MAb と抗 GD1b MAb の二つの染色領域 (図 8 A と C) を合わせたものに相当した。この結果は、コレラトキシン B サブユニットの TLC 免疫染色の結果 (図 6 B、レーン 6) と良く一致していた。脊髄では、コレラトキシン B サブユニットは灰白質 (g) と白質 (w) とともに強く染色した (図 15 B)。この結果から、脊髄の白質 (w) には、GM1 と GD1b 以外のコレラトキシン B サブユニットに反応する分子の存在が示唆された。同時に、コレラトキシン B サブユニットが認識する分子の糖鎖構造は、Gal  $\beta$  1-3GalNAc  $\beta$  1-4 (NeuAc  $\alpha$  2-3) Gal であると考えられた。

#### (4) 組織の酵素処理並びに有機溶媒処理による MAb の染色性の変化

本実験に用いた MAb が、組織上において各ガングリオシド糖鎖を特異的に認識していることを確認するため、組織切片を酵素処理並びに有機溶媒処理後、抗ガングリオシド MAb を用いた間接蛍光抗体法により染色した。ところで主要ガングリオシド (GM1、GD1a、GD1b、GT1b 及び GQ1b) の糖鎖は、シアリダーゼ処理することによって GM1 の糖鎖構造へ移行することが *in vitro* において確認されている。なお GM1 のシアル酸残基は、糖鎖の内部に位置するガラクトースに結合しているために立体障害が働いて、*A. ureafaciens* シアリダーゼでは切断されない。図 16 にその糖鎖変換を模式化して示した。このことは、組織切片をシアリダーゼ処理した後抗 GM1 MAb で染色すると、五つの主要ガングリオシドが分布する領域全てが染色され、一方抗 GM1 MAb 以外の四つの MAb では全く染色されなくなることが期待される。そこで、小脳の組織切片をシアリダーゼ処理した後、各 MAb による染色を試みた。その結果を図 15 C と D に示した。予測したように、シアリダーゼ処理後の抗 GM1 MAb の染色パターンは、五つの MAb によって染色された領域全てを染色しており、明らかに処理前の染色パターン (図 8 B と C) とは異なっていた。

一方、同様の組織切片を抗 GD1a MAb、抗 GD1b MAb、抗 GT1b MAb 及び抗 GQ1b MAb によって染色したところ、陽性領域は全く観察されなかった (not shown)。次に、これらの MAb の糖タンパク質糖鎖に対する交叉反応の有無について検討するために、切片を

トリプシン処理を行った後、各 MAb で染色した。その結果、処理前と処理後の各 MAb による染色パターンの変化は認められなかった (not shown)。更に、組織中の糖脂質は、有機溶媒によって速やかに抽出されることが知られている<sup>70)</sup>。そこで、組織切片をクロロホルム：メタノール (2:1、v/v) 混液で処理した後、各 MAb で染色した。その結果、処理後の組織切片は、各 MAb によって全く染色されなかった (not shown)。以上の結果から、各 MAb の組織内における認識抗原は、各ガングリオシド糖鎖に対して特異的であることが強く示唆された。また、ラット脳より調製したタンパク質画分の Western blot は、何れの抗ガングリオシド MAb とも反応が認められなかった (not shown)。この結果は、各 MAb は組織内のシアル酸含有糖タンパク質糖鎖と交叉反応せず、ガングリオシド特異的であることを示す。

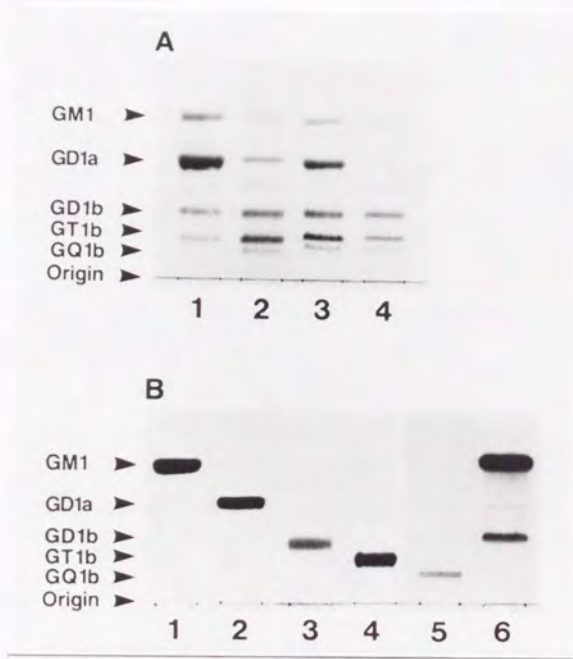
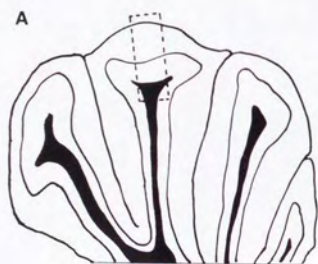
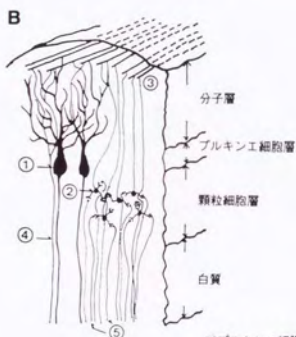


図6 ガングリオシド特異的MAbによるラット脳ガングリオシドのTLC免疫染色法による解析。(A)は、ラット小脳、大脳並びに脊髄から得た各ガングリオシド(10nM シアル酸/レーン)をクロロホルム:メタノール:0.22% CaCl<sub>2</sub> (55:45:10, v/v)で展開し、レゾルシノール-塩酸試薬で染色した。1、標準牛脳ガングリオシド; 2、ラット小脳; 3、ラット大脳; 4、ラット脊髄。(B)は、ラット小脳ガングリオシド(1 nM/レーン)をAと同様に展開後、五種の特異的MAbで免疫染色を行った。1、GMB16(抗GM1 MAb); 2、GMR17(抗GD1a MAb); 3、GGR12(抗GD1b MAb); 4、GMR5(抗GT1b MAb); 5、GMR13(抗GQ1b MAb); 6、パーオキシダーゼ標識コアラキシン。大脳及び脊髄ガングリオシドのTLC免疫染色においても、主要ガングリオシド特異的MAbはそれぞれの抗原に特異的に反応した。



□、皮質；■、白質。



- ①ブルキンエ細胞
- ②顆粒細胞
- ③平行線維 (T型線維)
- ④登上线維
- ⑤苔状線維

図7 小脳の組織並びに細胞構築の模式図 (文献72より一部改変)。  
 (A)は、ラット小脳の矢状断面における組織構築の全体像の模式図を示す。(B)は、ラット小脳皮質における細胞及び神経線維の構築の模式図を示す。



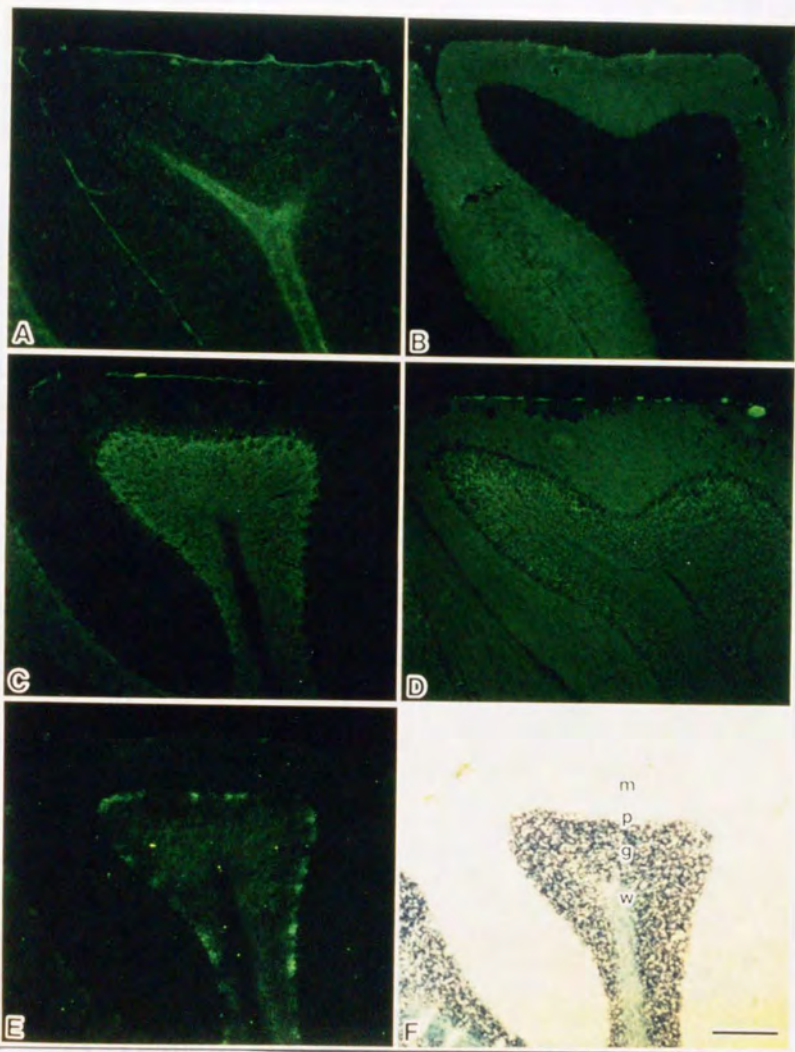


図8 間接蛍光抗体法による成熟ラット小脳皮質における主要ガングリオンドの分布の観察。矢状断面での組織像を示す。(A)はGMB16(抗GM1 MAb)、(B)はGMR17(抗GD1a MAb)、(C)はGGR12(抗GD1b MAb)、(D)はGMR5(抗GT1b MAb)、(E)はGMR13(抗GQ1b MAb)、(F)はKB染色で染色した組織像を示す。スケールバーは500  $\mu$ mを示す。KB染色(F)によって成熟ラット小脳は、四層に区別される。表層から分子層(m)、プルキンエ細胞層(p)、顆粒層(g)及び白質(w)を表わす。抗GM1 MAb(A)は白質(w)を線維状に、また顆粒層(g)を点状(小矢印)に染色する。分子層(m)では、線状構造(大矢印)が染色される。プルキンエ細胞層(p)は染色されない。抗GD1a MAb(B)は、分子層(m)を強くしかも均一に染色する。顆粒層(g)も線維状に弱く染色する。プルキンエ細胞層(p)と白質(w)は染色されない。抗GD1b MAb(C)は、顆粒層全体を染色する。分子層(m)も点状に一部染色する。プルキンエ細胞層(p)と白質(w)は染色されない。抗GT1b MAb(D)は、プルキンエ細胞層(p)以外の各層を強く染色する。分子層(m)と白質(w)は比較的均一な染色であるが、顆粒層(g)は網目状を示す。抗GQ1b MAb(E)は、顆粒層(g)を染色する。特に、強く点状に染色した領域は、プルキンエ細胞層(p)直下で顆粒層(g)の上部に位置する小脳糸球と考えられる。分子層(m)、プルキンエ細胞層(p)及び白質(w)は染色されない。

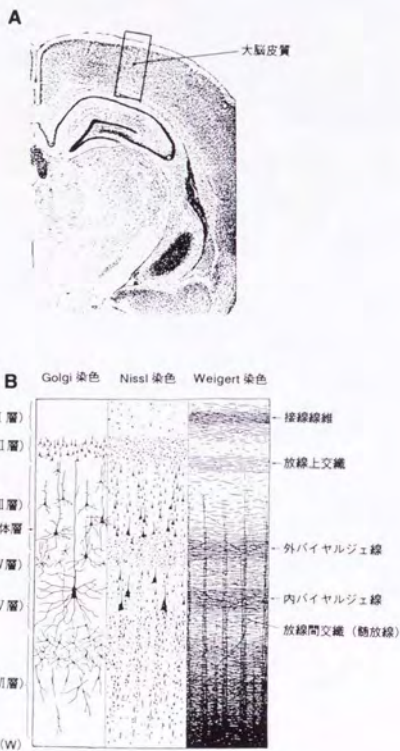


図9 大脳皮質の全体像とその細胞並びに線維構築の模式図。

(A) は、ラット大脳の冠状面での組織構築の全体像を示す(文献 72 より一部改変)。  
 (B) は、ヒト大脳皮質の冠状面における細胞構築を Golgi 鍍銀染色と Nissl 染色による模式図で、線維構築を Weigert 染色による模式図で示す<sup>(73)</sup>。

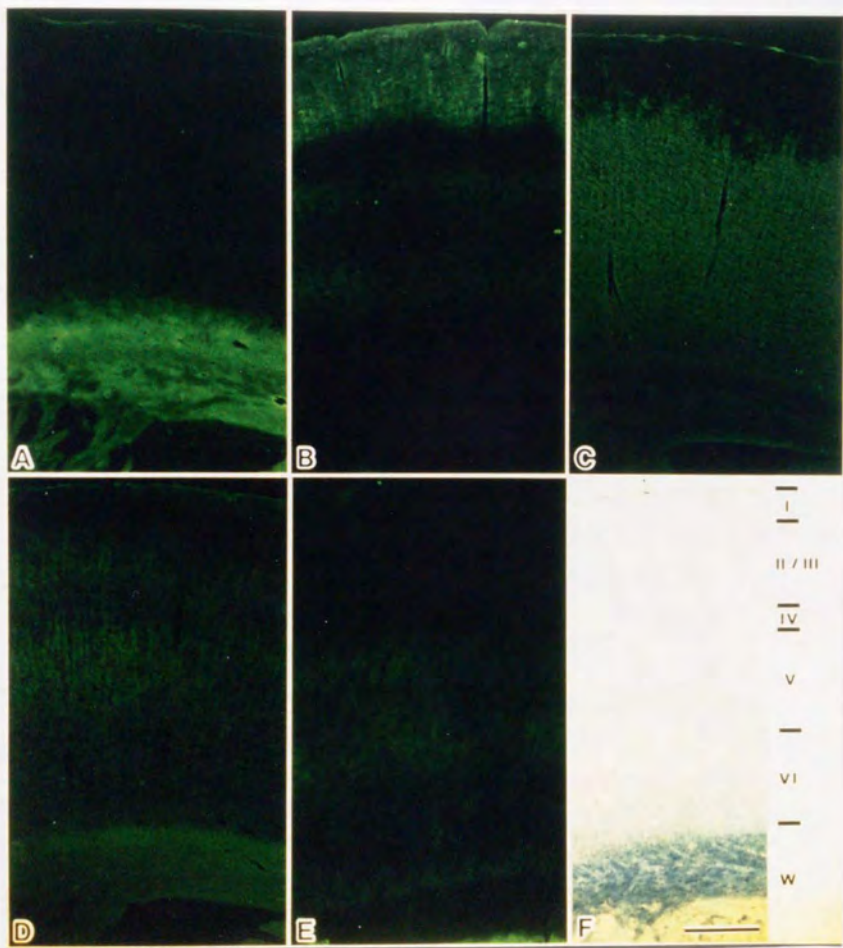


図10 間接蛍光抗体法による成熟ラット大脳皮質における主要ガングリオシドの分布の観察。環状面での組織像を示す。(A)は GMB16 (抗 GM1 MAb)、(B)は GMR17 (抗 GD1a MAb)、(C)は GGR12 (抗 GD1b MAb)、(D)は GMR5 (抗 GT1b MAb)、(E)は GMR13 (抗 GQ1b MAb)、(F)は K-B染色で染色した組織像を示す。スケールバーは 500  $\mu\text{m}$  を示す。成熟ラット大脳皮質は、K-B染色によって五層に区別され、それは表層から分子層 (I層)、外顆粒・外錐体細胞層 (II/III層)、内顆粒層 (IV層)、内錐体細胞層 (V層) 及び多型細胞層 (VI層) から成る。更に皮質に続いて、白質 (w) が観察される。抗 GM1 MAb (A) は、白質 (w) を強く染色する。抗 GD1a MAb (B) は、帯状の三層を染色する。表層の I層と II/III層が一つの層として比較的強く染色されている。他の二層は V層の上部と VI層の上部であり、その染色は弱い。抗 GD1b MAb (C) は、III層以下を強く染色し、I層、II層とIII層の一部を染色しない。また、白質 (w) も染色しない。抗 GT1b MAb (D) は、II/III層からVI層を染色し、I層はほとんど染色しない。II/III層とV層は比較的強い染色を示す。VI層から II/III層にかけて放射状の染色が見られる。白質 (w) も強く染色する。抗 GQ1b MAb (E) は、IV層、V層の下部及びVI層の下部領域を帯状に染色する。しかし、染色は何れの層も弱い。

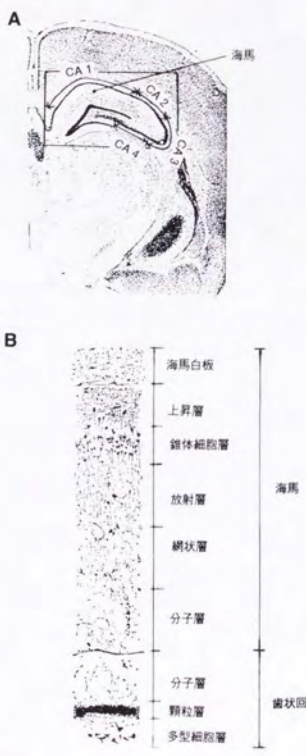


図11 海馬の組織構築とその細胞構築の模式図。  
 (A) は、ラット大脳における海馬及び歯状回の存在位置を示す(文献72より一部改変)。  
 海馬の錐体細胞層は、CA 1、CA 2、CA 3及びCA 4に区別して示す。(B) は、ヒト海馬  
 及び歯状回の細胞構築を示す(文献73より一部改変)。

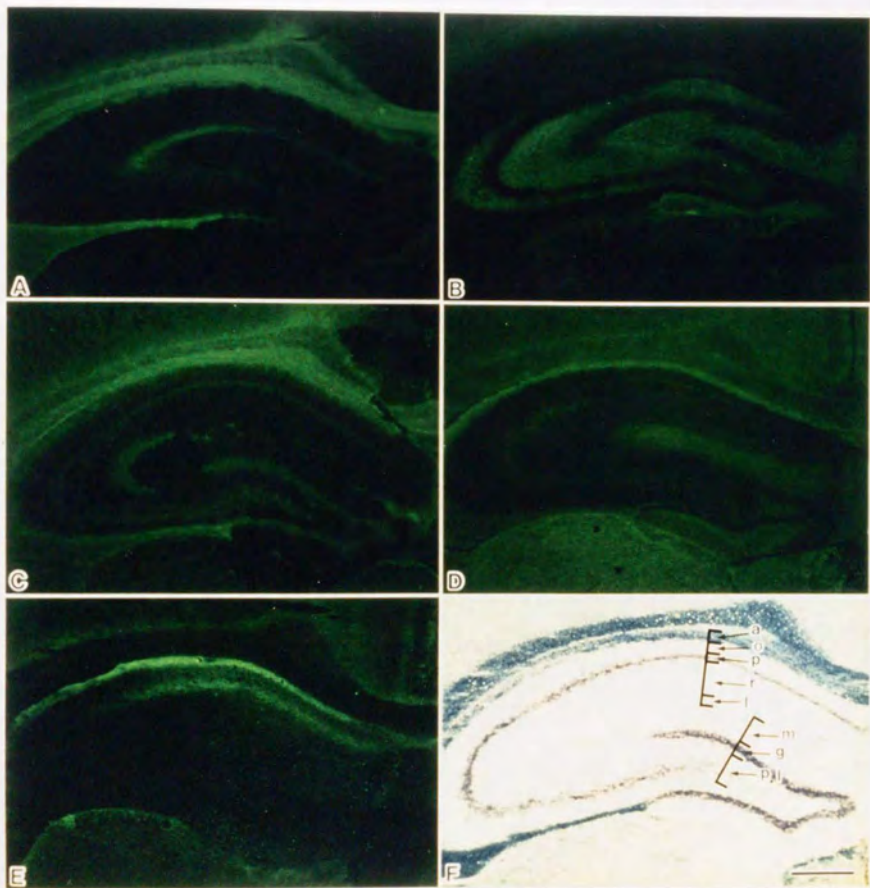


図12 間接蛍光抗体法による成熟ラット海馬における主要ガングリオシドの分布の観察。環状面での組織像を示す。(A)はGMB16(抗GM1MAb)、(B)はGMR17(抗GD1aMAb)、(C)はGGR12(抗GD1bMAb)、(D)はGMR5(抗GT1bMAb)、(E)はGMR13(抗GQ1bMAb)、(F)はK-B染色で染色した組織像を示す。スケールバーは500 $\mu$ mを示す。K-B染色によって成熟ラット海馬は四層に、歯状回は三層に区別される。海馬は、表層から海馬白板(a)、上昇層(o)、錐体細胞層(p)、放射層(r)及び網状・分子層(i)の四層が見られる。歯状回は、分子層(m)、顆粒層(g)及び多型細胞層(p・l)の三層が見られる。抗GM1MAb(A)は、海馬白板(a)と網状・分子層(i)を染色する。抗GD1aMAb(B)は、海馬の上昇層(o)と放射層(r)並びに歯状回の分子層(m)と多型細胞層(p・l)を染色する。しかし、海馬の錐体細胞層(p)並びに歯状回の顆粒層(g)は染色しない。抗GD1bMAb(C)は、海馬の錐体細胞層(p)と網状・分子層(i)の一部並びに歯状回の顆粒層(g)を染色する。他の各層は染色しない。抗GD1aMAbと抗GD1bMAbの染色パターンは、互いに裏表の関係を示している。抗GT1bMAb(D)は、海馬の海馬白板(a)を強く染色する。上昇層(o)と放射層(r)を弱く染色するが、錐体細胞層(p)は染色しない。歯状回では、分子層(m)だけを比較的強く染色する。抗GQ1bMAb(E)は、海馬白板(a)、上昇層(o)及び錐体細胞層(p)の一部の領域を染色する。錐体細胞での染色領域は、CA1であろうと推察する。海馬の他の各層及び歯状回の各層は染色しない。



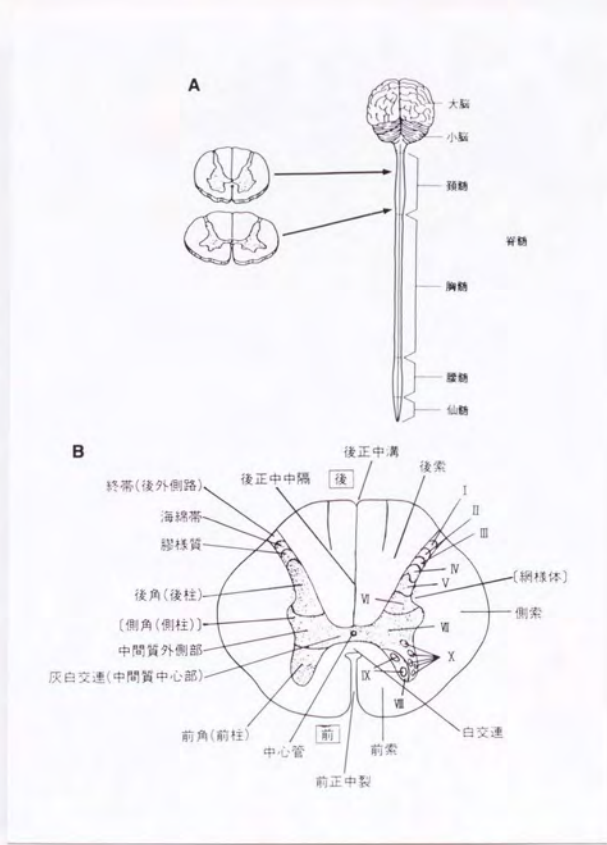


図13 脊髓の全体の組織像と頸部脊髓の組織構築の模式図<sup>173)</sup>。  
 (A)は、ヒト脊髓組織全体の背側からの模式図を示す。(B)は、ヒト頸部分節の横断面での組織構築の模式図を示す。一般名称以外のIからXの表示は、Rexedの分類を表わす。

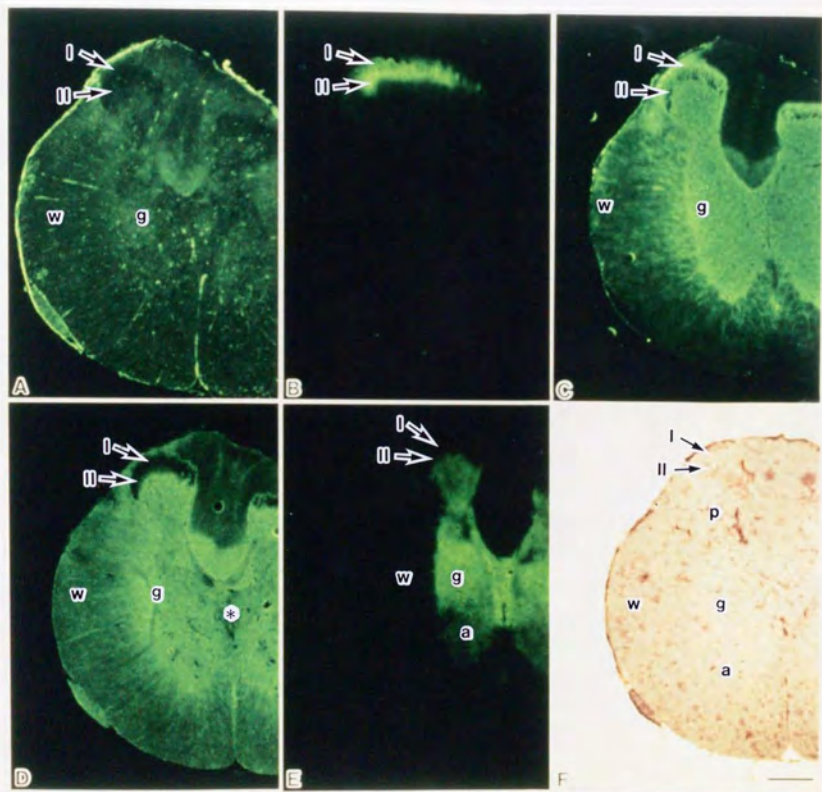


図14 間接蛍光抗体法による成熟ラット脊髄における主要ガングリオシドの分布の観察。頸部分節の環状面での組織像を示す。(A)はGMB16(抗GM1 MAb)、(B)はGMR17(抗GD1a MAb)、(C)はGGR12(抗GD1b MAb)、(D)はGMR5(抗GT1b MAb)、(E)はGMR13(抗GQ1b MAb)、(F)はHE染色で染色した組織像を示す。スケールバーは500  $\mu$ mを示す。HE染色によって成熟ラット頸部脊髄はH型の灰白質(g)とそれを取り囲む白質(w)が観察される。頸部脊髄の特徴として、前角(a)の発達が乏しく、逆に後角(p)の発達、特に膠様質(i)並びに海綿帯(II)の発達が顕著に示される。抗GM1 MAb(A)は、灰白質(g)を散在性の点状に、白質(w)を放射状に染色する。しかし、何れの染色も弱い。抗GD1a MAb(B)は、後角(p)の末端領域を明瞭に染色する。この領域は、図13 BのRexed分類に照らし合わせると第I層(海綿帯)と第II層(膠様質)と考えられる。他の領域は全く染色しない。抗GD1b MAb(C)は、灰白質(g)を小型の顆粒状に染色する。これは、灰白質(g)を構成している小型神経細胞を染色していると推察される。また、灰白質(g)から白質(w)の上部にかけて見られる線維状の染色は、小型神経細胞の軸索と推察する。白質(w)の周辺部とRexed分類の第I層(海綿帯)と考えられる領域は、染色しない。抗GT1b MAb(D)は、灰白質(g)を比較的均一に染色するが、灰白交連(中間質中心部;\*)周囲、細胞体と思われる構造及び後角(p)末端[Rexed分類の第I層(海綿帯)と第II層(膠様質)]は染色しない。抗GQ1b MAb(E)は、灰白質の中間灰白質(Ig)領域を強く、また後角(p)を弱く染色する。しかし、灰白質の前角(a)領域、Rexed分類の第I層(海綿帯)と考えられる領域及び白質(w)は染色しない。

表6 成熟ラット中枢神経組織における主要ガングリオシドの免疫組織化学的分布<sup>a</sup>。

Rat region	Ganglioside				
	GM1	GD1a	GD1b	GT1b	GQ1b
<i>Cerebellar cortex</i>					
Molecular layer	+ <sup>b</sup>	+++	+	++	-
Purkinje cell layer	-	-	-	-	-
Granular layer	+	+	+++	+++	++
White matter	+++	-	-	+	-
<i>Cerebral cortex</i>					
Molecular layer (I)	+	+++	-	+	-
External granular layer (II)	+	+++	+	-	-
External pyramidal layer (III)	+	+++	++	++	-
Internal granular layer (IV)	+	-	+++	+	+
Internal pyramidal layer (Va)	+	+	+++	++	-
(Vb)	+	-	+++	++	+
Polymorphic cell layer (VI)	+	+	+++	+	+
White matter	++	-	+	+++	-
<i>Hippocampal formation</i>					
Hippocampus					
Alveus	++	-	++	++	+++
Stratum oriens	++	++	-	+	+
Stratum pyramidale	-	-	+	-	++
Stratum radiatum	-	++	-	+	-
Stratum lacunosum-moleculare	++	-	++	+	-
Dentate gyrus					
Polymorphic layer	+	++	+	+	-
Granular layer	-	-	++	-	-
Molecular layer	+	++	-	++	-
<i>Spinal cord</i>					
Grey matter					
Anterior horn	+	-	+++	+++	++
Posterior horn	+	+++	+++	+++	++
White matter					
Anterior funiculus	+	-	+	++	-
Lateral funiculus	+	-	+	++	-
Posterior funiculus	+	-	+	++	-

<sup>a</sup>主要ガングリオシド (GM1、GD1a、GD1b、GT1b及GQ1b) の分布は、特異的なMAbを用いた間接蛍光抗体法により観察した。<sup>b</sup>+++、強；++、中；+、弱；-、陰性。

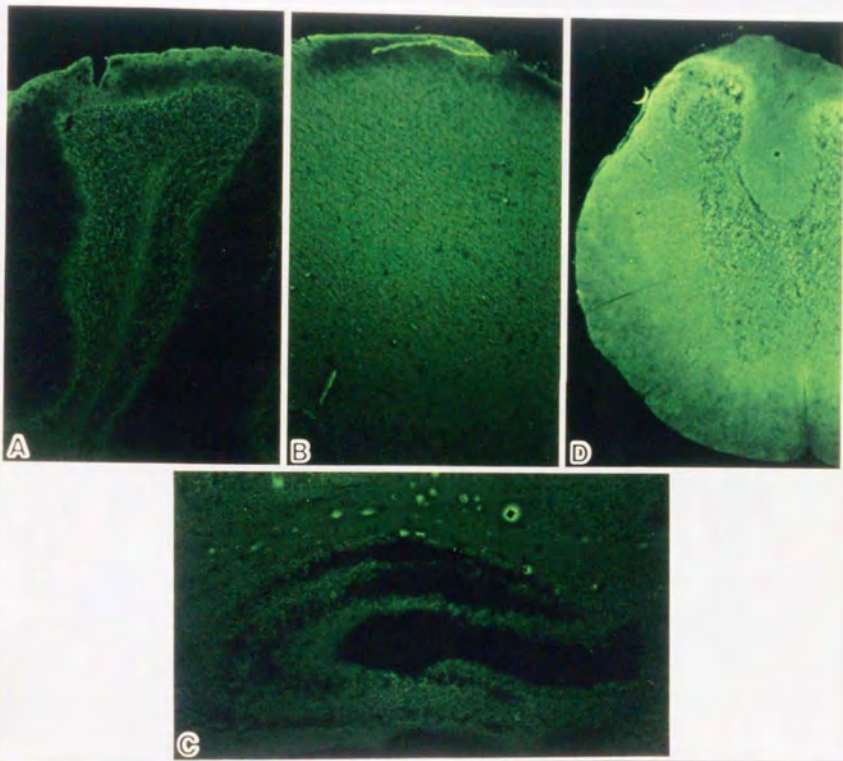


図15 コレラトキシンによるガングリオシドの分布の観察とシアリダーゼ処理切片のGM1の分布。(A)と(B)は小脳皮質(矢状断面)と頸髄(横断面)を、FITC標識コレラトキシンB-サブユニットによる染色を示す。(C)と(D)は大脳皮質(環状面)と海馬(環状面)をシアリダーゼ処理後、抗GM1 MAbによる染色を示す。スケールバーは500  $\mu\text{m}$ を示す。

小脳皮質(A)においてコレラトキシンB-サブユニットは主に顆粒層(g)と白質(w)を強く染色する。この染色領域は、抗GM1 MAb(図8 A)と抗GD1b MAb(図8 C)によって染色された両者の染色領域を重ね合わせたものに類似する。頸髄(B)では、灰白質(g)を顆粒状に、白質(w)を比較的均一に、強く染色した。灰白質(g)における染色パターンは抗GD1b MAb(図14 C)に類似する。白質における染色パターンは、主要ガングリオシド特異的MAbでは観察されない(図14 A-E)。大脳皮質(C)では、抗GM1 MAbは第III層から第VI層までを強く、更に第I層及び第II層を点状に弱く染色した。この染色パターンは、処理前の抗GM1 MAbでの染色パターン(図10 A)と明らかに異なることを示す。この染色の変化は、シアリダーゼ処理によってGM1以外の主要ガングリオシド(GD1a、GD1b、GT1b及びGQ1b)の糖鎖がGM1へ変換したことを示す。海馬(D)においても、処理前の抗GM1 MAbでの染色パターン(図12 A)とは明らかに異なることを示す。処理後は、各層によって染色の濃淡が見られたが、全層[海馬の海馬白板(a)、上昇層(o)、錐体細胞層(p)、放射層(r)と網状・分子層(l)並びに歯状回の分子層(m)、顆粒層(g)と多型細胞層(p.l)]が染色される。

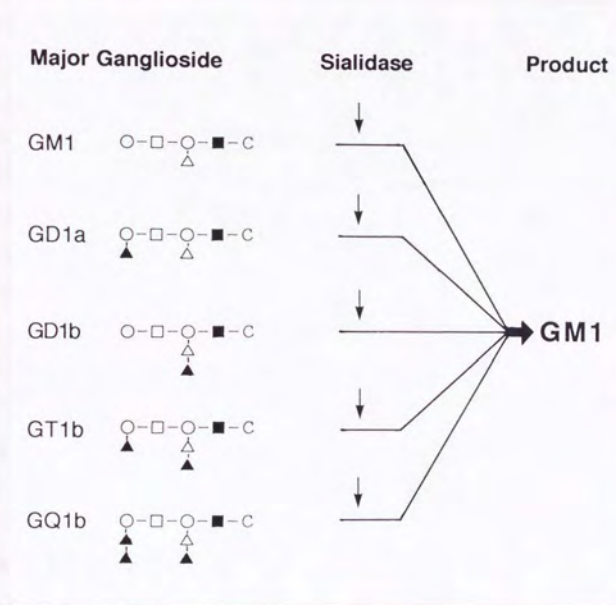


図16 シアリダーゼ処理による主要ガングリオシドの糖鎖構造の変化。  
 GM1 のシアル酸残基は、糖鎖の内部に位置するガラクトースに結合するために立体障害が働き、*A. ureafaciens* では切断されない。▲は、*A. ureafaciens* によって酵素切断されるシアル酸を示す。

■、Glc；○、Gal；□、GalNAc；△、NeuAc；Cer, ceramide。

#### 第4節 考察

これまで GM1 以外の主要ガングリオシドの神経組織における免疫組織学的分布に関する報告は見られない。その主な理由は、GM1 以外の主要ガングリオシドに対する特異的な MAb が作製されていなかったからである。従って、神経組織におけるガングリオシドの免疫組織化学的解析は、十分に行われていないのが現状であった。第1章で作製した a 経路ガングリオシドに対する MAb と Ozawa ら<sup>[61]</sup>によって作製された b 経路ガングリオシドに対する MAb は、特異性が極めて高く、更に未固定の細胞の細胞膜上に発現している各ガングリオシドを認識できることから、免疫学的プローブとして極めて有用性の高いことが予測された。その内、少なくとも本実験に用いた MAb は、更に免疫組織化学においても有用であることが確認された。

本実験において、成熟ラット中枢神経組織に存在する主要ガングリオシドが、細胞及び層構築に特異的に分布していることを各ガングリオシド特異的 MAb による免疫組織化学によって初めて明らかにした。それは、特に小脳で明瞭であった。ラット中枢神経系の主要ガングリオシドは、脳ガングリオシド量の 95% 以上を占めている<sup>[76]</sup>ことから、本研究で脳内ガングリオシド分布の大部分を観察したことになる。

小脳において、GM1 は神経膠細胞、特に分子層のパーグマングリアと白質及び顆粒層のアストロサイトに分布していることが観察された。これまで、哺乳類の脳組織におけるガングリオシドの免疫組織化学的観察に関しては、GM1 特異的 MAb を用いた報告がある<sup>[77-79]</sup>が、GM1 の脳内分布については、必ずしも一致した結論は得られていない。De Baecque らは、ラット小脳の GM1 は顆粒層に認められると報告した<sup>[77]</sup>が、Laev らは顆粒層のみならず白質にも認められると報告した<sup>[78,79]</sup>。ただ GM1 は、神経細胞に分布するという点では一致していた。GM1 特異的 MAb を用いた本実験の結果は、これまで報告された何れの結果とも異なっていた。このような相違が得られた主な要因としては、用いた抗体の特異性の差、抗体の抗原に対する親和性の差、使用した固定液の違い等が考えられる。組織染色における固定液の選択は、重要な点であることは言うまでもないことである<sup>[80]</sup>。著者は、アセトン以外に中性ホルマリン並びにバラホルムアルデヒドによる固定も試みた (not shown)。その結果、ラット中枢神経系におけるガングリオシドの検出には、最も固定操作が簡便であるアセトン固定が最適であることが判明した。一方小脳における GM1 分布に関しては、コレラトキシンを用いた免疫組織化学的研究があり、GM1 は主に白質と顆粒層に分布すると報告されている<sup>[78]</sup>。コレラトキシンは、GM1 に対する特異的検出プローブと考えられてきたが、GM1 以外のガン



リオシドとも反応することが報告されている<sup>(81)</sup>。本実験においても、コレラトキシンは、GM1のみならずGD1bや他の幾つかのガングリオシドをも認識することが、TLC免疫染色によって示され(図7)、更に免疫組織化学においても同様の結果が得られた(図15)。従ってコレラトキシンによる染色結果は、GM1特異的な組織分布を示すものではないと結論された。GT1bは、ブルキンエ細胞層以外の各層に分布していた。これまでの組織学的知見から考えて、GT1bは苔状繊維(白質を經由して顆粒細胞の樹状突起にシナプスを形成する)と登上繊維(白質を經由してブルキンエ細胞の樹状突起にシナプスを形成する)に分布しているものと推察される。一方白質にはGT1b結合タンパク質が発現しているとの報告がある<sup>(82)</sup>。このことから白質におけるGT1bは、GT1b結合タンパク質との細胞膜上で相互作用している可能性が示唆される。この相互作用は、白質形成及びその安定化に関与している可能性が想像される。GD1aは、小脳において分子層の平行線維に分布していると推察された。この線維は、顆粒細胞の軸索であり、ブルキンエ細胞の樹状突起とシナプスを形成すると考えられている。従って、GD1aは分子層におけるシナプス領域に発現し、GT1bと同様な機能を有している可能性を示唆する。GD1bは、顆粒細胞に特異的に分布していると考えられた。これまで顆粒細胞の特異的マーカーとしては、NF160<sup>(83)</sup>、MAP1<sup>(84)</sup>及びNSE<sup>(85)</sup>のような細胞質内タンパク質分子がよく知られている。GD1bは、新たな顆粒細胞の特異的分子マーカーとして有効な分子になりえるものと思われる。今後、その発現が細胞表面上であるかどうか検討しなければならない。GQ1bは、小脳系球という極めて限られた領域に分布していた。このことは、GQ1bの分布は細胞体ではなく、神経繊維によって密に形成されるシナプス領域であることを強く示唆している。GQ1bのシナプス領域での機能を考察する際に、その分布が前シナプス膜なのか後シナプス膜であるのか極めて重要な問題であり、更に免疫電子顕微鏡により明確にする必要があるものと思われる。

海馬において、GQ1bの分布は極めて特徴的であった。その分布は、錐体細胞層のCA1領域とその領域の上昇層及び海馬白板であった。これまで、CA1領域に局在している分子に関する報告は少ない。その一つの分子としてcalbindin D 28Kが報告されている<sup>(86, 87)</sup>。この分子は、抑制性の神経伝達物質の一つであるγ-アミノ酪酸(GABA)含有細胞の細胞質内に存在しているビタミンD依存性カルシウム結合タンパク質である。しかしcalbindin D 28Kは、CA1だけでなく歯状回にも分布している。GQ1bを含めた主要ガングリオシドが、脳内において免疫抑制的に作用しうると報告された<sup>(87)</sup>ことから、大脳においてGQ1bは、CA1錐体細胞から海馬台(上昇層と海馬白板)を経て嗅内野への投射領域までの興奮性神経

回路<sup>65)</sup>に分布するとも考えられる。一定期間、神経細胞に興奮性の刺激が加わると、その後は回路系の恒常性維持のために興奮抑制がかかることはよく知られている。上記の興奮性神経回路網に発していると考えられるGQ1bは、この抑制メカニズムに関与する機能分子の一つである可能性を示唆させる。

脊髄では、GD1aが特徴的な分布を示した。その分布は、Rexed分類<sup>74)</sup>のI層とII層に認められた。I層(海綿帯)とII(膠様質)には、痛覚や温覚を視床へと伝える求心性神経細胞が存在している。この神経路の第1神経元は、後根神経節の偽単極神経細胞であり、この神経細胞の中枢端が膠様質に入りこみ、その中の小型神経細胞とシナプスを形成し、更に上部の視床へと刺激を伝達する<sup>69)</sup>。すなわち、I層とII層は、小型神経細胞とシナプス形成の場であるといえる。従って小脳におけるGQ1bと同様に、GD1aはシナプス形成領域に分布していることが強く示唆された。

成熟ラット中枢神経組織において、主要ガングリオシドは極めて特徴的な分布を示したことから、それぞれの分布領域において何らかの生物学的機能を有する可能性を示唆させた。

### 第3章 Tay-Sachs病並びに正常ヒト皮膚由来繊維芽細胞における GM2 の細胞内分布

#### 第1節 序論

スフィンゴ糖脂質は、疎水性のセラミドと親水性の糖鎖から構成され、主に細胞膜に存在する<sup>85)</sup>。その存在様式は、セラミドを脂質二重膜に埋め込み、糖鎖部位を細胞質外に向けた状態であると考えられている。このことから、スフィンゴ糖脂質の生物学的機能を発揮する場合は、主に細胞膜上であると考えられてきた。事実、細胞膜上のスフィンゴ糖脂質は、情報伝達系への関与<sup>49, 89)</sup>や、分化誘導及び神経突起伸展の促進因子としての機能<sup>20, 90, 91)</sup>や、またある種の腫瘍細胞やリンパ球サブセットを同定するための表面マーカーとして有用であることが報告されている<sup>92)</sup>。ところが近年、細胞膜表面上の分布に加えて、糖脂質が細胞質内小器官にも分布していることが報告された。例えば、グロボシドがヒト肥満細胞の分泌顆粒<sup>93)</sup>に、ラクトシルセラミドがヒト好中球のリソソーム顆粒<sup>94)</sup>に、フォルスマン抗原がMDCK 細胞の核膜<sup>47)</sup>に、M5 ガングリオシドがウニ卵の小胞体<sup>95)</sup>に分布していることがそれぞれ特異抗体を用いた免疫組織化学によって観察された。一方、カルシウム依存性ガングリオシド結合タンパク質が、マウス脳から単離された。そのタンパク質分子は、細胞質内に分布しているカルシウム依存性の情報伝達分子の一つであるカルモジュリンであると同定された<sup>88)</sup>。更に、カルモジュリン依存性酵素の一つである環状ヌクレオチド・フォスフォジエステラーゼの活性は、ガングリオシドによって制御されることが示された<sup>96)</sup>。これらの結果は、ガングリオシドを介した新たな細胞質内情報伝達経路の存在を予測させるとともに、細胞膜上だけでなく細胞質内において未同定のタンパク質分子にアンカーした状態のガングリオシドの存在を示唆するものである。事実、幾つかの糖脂質は、細胞骨格タンパク質と会合して存在していることが免疫細胞化学によって観察されている<sup>85, 97)</sup>。しかしその分子間会合の詳細並びにその生理的機能については、全く不明である。

Tay-Sachs 病は、体細胞及び組織内に過剰量の GM2 が蓄積するヒト遺伝病の一つである<sup>98)</sup>。それ故この患者の皮膚由来繊維芽細胞は、細胞質内における GM2 の分布を明らかにし、更にその分布と発症との関連を解析するための極めて良いモデルの一つであると考えられる。本章では、正常皮膚由来繊維芽細胞と Tay-Sachs 病患者皮膚由来繊維芽細胞における GM2 の細胞内分布を、特異的 MAAb による間接蛍光抗体法により明らかにした。これら二つの細胞で

は、明らかに GM2 の分布が異なっていたが、一方両細胞に共通する分布も観察された。それは、フィラメント様の GM2 の分布であった。そこで、更に正常ヒト繊維芽細胞とマウス肥満細胞より単離・精製したビメンチン中間系フィラメント (IF) を用いて、細胞質内 GM2 はビメンチン IF に結合した状態で存在することを生化学的に明らかにし、その生理的意義について考察した。

## 第2節 材料及び方法

材料：GM3、GM2 及び GM1 に対する MAb の作製及びそれらの特異性については、第2章で述べた。各 MAb (全てIgM) は、マウス腹水中に回収した。MAb の精製は、セファロース CL 6B (Pharmacia-LKB 社) を用いたゲルろ過により行った。抗ビメンチンMAb (IgG) は、Oncogenescience 社より購入した。GM3、GM2 及び GM1 は、Momoi ら (1976) <sup>(99)</sup> の方法に従って、マウス赤血球、Tay Sachs ヒト脳及び正常ヒト脳より各々精製した。

細胞及び培養：正常ヒト皮膚由来繊維芽細胞と Tay Sachs 病患者皮膚由来繊維芽細胞の培養は、10% FCS、20mM グルタミン、10mM ビルビン酸ナトリウム、10mM HEPES、100  $\mu$ g/ml ストレプトマイシン並びに100U/ml ペニシリンを含むRPMI-1640 培地 (pH 7.2) で行った。Tay Sachs 病の臨床診断は、 $\beta$ -ヘキササミニダーゼ A の欠損と生体組織中での GM2 蓄積の確認により行った。

蛍光抗体法：ラプテック・チャンバースライド (Nunc 社) 上で培養した細胞を 2.5% パラホルムアルデヒドを含む PBS (pH 7.4) で 15 分間固定した後、5% BSA を含む PBS を加えて室温で 1 時間ブロッキングした。単一染色の場合、上記細胞に各 MAb を加えて、室温で 1 時間反応させた。1% BSA を含む PBS で洗浄後、ブロッキング液で 100 倍希釈した FITC 標識抗マウス IgM F(ab')<sub>2</sub> 及び IgG F(ab')<sub>2</sub> (Cappel社) を各々加えて、室温で 1 時間反応させた。1% BSA を含む PBS で洗浄後、封入し検鏡した。二重染色の場合、上記細胞に抗 GM2 MAb (10  $\mu$ g/ml) と抗ビメンチン MAb (1  $\mu$ g/ml) を加えて、室温で 1 時間反応させた。1% BSA を含む PBS で洗浄後、ブロッキング液で 100 倍希釈した FITC 標識抗マウス IgM F(ab')<sub>2</sub> と IgG F(ab')<sub>2</sub> (Cappel 社) を同時に加えて、室温で 1 時間反応させた。1% BSA を含む PBS で洗浄後、封入し検鏡した。細胞からの脂質抽出は、固定した細胞をメタノールに 10 分間浸し、続いてクロロホルム：メタノール：水 (4:8:3, v/v) <sup>(70)</sup> に 1 時間浸し、最後にメタノールに 10 分間浸すことにより行った。処理した細胞の MAb による免疫染色は、上述した染色法と同様に行った。細胞の観察は、MRC-600 共焦点レーザー顕微鏡装置 (Bio Rad 社) を装着した Axiophoto II (Zeiss 社) で観察した。

ビメンチンの単離：ビメンチンの単離は、Geisler と Weber (1981) <sup>(100)</sup> の方法に従って行った。細胞ベレット (500  $\mu$ g) に 1% トリトン X-100、1% 2-ME、2 mM PMSF、0.005%

ロイペプチン、0.6 M 塩化カリウム、10 mM 塩化マグネシウム、2 mM EGTA と 10 mM リン酸 (pH7.5) を含む緩衝液 3 ml を加えて水中で 2 分間ホモジナイズした後、4℃ 30 分間 13000 g で遠心した。その沈渣に 1% 2-ME、2 mM PMSF、0.001% ロイペプチン、2 mM EGTA と 10 mM リン酸 (pH7.5) の緩衝液 2 ml を懸濁し、4℃ 15 分間 6000 g で遠心した。沈渣画分を単離ビメンチンとして回収した。得られた単離ビメンチンは、最終濃度 100  $\mu$ g/ml になるように 50 mM 2-ME、1 mM PMSF、2 mM EGTA、7 M 尿素 と 25 mM トリス-塩酸 (pH 8.8) (A 液) に溶解し、用時まで -80℃ で保存した。マウス肥満細胞からのビメンチンの精製は、Inagaki ら (1987) <sup>(10)</sup> の方法により行った。

Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) : 96 穴タンパク質固相用 ELISA プレートは、SUMILON H タイプ (住友ベークライト社) を用いた。各種濃度に調整した単離ビメンチンを各穴に加え、4℃ で 1 晩静置した。1% BSA を含む PBS で洗浄後、更に 5% BSA を含む PBS を加えて、室温で 1 時間ブロッキングした。1% BSA を含む PBS で洗浄後、一次抗体として抗 GM2 MAb (10  $\mu$ g/ml)、抗 GM3 MAb (10  $\mu$ g/ml)、抗 GM1 MAb (10  $\mu$ g/ml) 及び抗ビメンチン MAb (1  $\mu$ g/ml) をそれぞれ 100  $\mu$ l 加えて、室温で 1 時間反応させた。1% BSA を含む PBS で洗浄後、パーオキシダーゼ標識抗マウス IgM F(ab')<sub>2</sub> (Cappel 社) (10  $\mu$ g/ml) 及びパーオキシダーゼ標識抗マウス IgG F(ab')<sub>2</sub> (Cappel 社) (10  $\mu$ g/ml) を加えて、室温 1 時間反応させた。1% BSA を含む PBS で洗浄後、基質溶液を加えて 15 分間反応させた後、405 nm に設定した ELISA リーダー (Bio-Rad 社) にて測定した。基質溶液は、第 2 章の第 2 節と同様のものを用いた。

単離ビメンチンからの脂質抽出とその TLC 免疫染色 : 蒸留水に対して十分に透析したビメンチン (100  $\mu$ g) にクロロホルム:メタノール:水 (4:8:3, v/v) 0.5 ml を加えて攪拌し、一晩抽出した。3000 rpm で 15 分間遠心後、上清を回収した。この操作を更に 2 回繰り返した。この上清を脂質画分とし、窒素気流下にて溶媒を留去させた後、一定量のクロロホルム:メタノール (2:1, v/v) に溶解した。クロロホルム:メタノール:0.2% 塩化カルシウム (60:40:9, v/v) の展開溶媒系を用いた TLC で展開後、第 2 章第 2 節に述べた方法に従って抗 GM2 MAb による免疫染色を行った。

Western blot 解析 : 単離ビメンチン (10  $\mu$ g/12.5  $\mu$ l A 液) に GM2 (15  $\mu$ g/12.5  $\mu$ l

PBS) を加え、室温で1時間静置した試料と、PBSのみと混合した試料を2倍濃度の Laemmli の試料緩衝液<sup>(102)</sup> に等量になるように加えた。このように調整した泳動用試料をボイルせずに4-20%の SDS-ポリアクリルアミドグラジエントゲルを用いた SDS-PAGE<sup>(100)</sup> に供した。泳動後、分離タンパク質を PVDF 膜 (Millipore 社) に転写した<sup>(103)</sup>。その膜を各レーンごとにカットし、1% スキムミルクを含む PBS で1時間ブロッキングした。ブロッキング終了後、抗 GM2 MAb (10  $\mu$ g/ml)、抗ビメンチン MAb (1  $\mu$ g/ml) もしくはマウス Ig (10  $\mu$ g/ml) (Sigma 社) を加えて、室温で1時間反応させた。1% スキムミルクを含む PBS で十分に洗浄した後、ベクタステイン ABC キット (Vector 社) を用いて酵素染色を行った。基質溶液は、10 ml の 4-クロロ-1-ナフトール (0.3 mg/ml 冷メタノール) 液に 50 ml の トリス緩衝液 生理的食塩水 (137 mM 塩化ナトリウム、20 mM トリス 塩酸、pH 7.6) と 5  $\mu$ l 過酸化水素を混合したものをを用いた。

### 第3節 結果

#### (1) Tay-Sachs病患者皮膚由来繊維芽細胞と正常ヒト皮膚由来繊維芽細胞におけるGM2の細胞内分布

図17Aに示すように、抗GM2 MA bによる染色で、ほとんど全てのTay-Sachs病患者皮膚由来繊維芽細胞の細胞質内に大きな顆粒様構造が観察された。ヒト正常皮膚由来繊維芽細胞の細胞質内には、そのような顆粒様構造はほとんど認められなかった(図17B)ことから、この顆粒はGM2を蓄積したリソゾームであると考えられた。

それに加えてGM2 MA bは、両細胞の細胞質内のフィラメント様構造を染色した(図17AとB)。ヒト正常繊維芽細胞における主要ガングリオシドはGM3であると報告されている<sup>(104)</sup>が、このフィラメント様構造は抗GM3 MA bや抗GM1 MA bでは染色されなかった(not shown)。

抗GM2 MA bの糖タンパク質糖鎖との交叉反応性の有無を確認するために、細胞を有機溶媒で処理した後、抗体で染色を行った。図17Eに示すように、抗GM2 MA bによる染色性は、完全に失われた。この結果は、抗GM2 MA bは両細胞の糖脂質と特異的に反応し、糖タンパク質糖鎖とは交叉反応していないことを示している。この処理による細胞の形態に及ぼす影響は、位相差像並びに抗ビメンチンMA b染色で観察する限りにおいて、ほとんど問題にならなかった(図17FとG)。

両繊維芽細胞において、抗GM2 MA bで染色された細胞質内のフィラメント様構造は、その形態的な特徴からビメンチンIFと推察された。このことを確認するために、Tay-Sachs病患者由来繊維芽細胞を抗GM2 MA bと抗ビメンチンMA bによる二重染色を行った。図17CとDに示すように、抗GM2 MA bの染色パターン(図17C)は、抗ビメンチンMA bによる染色パターン(図17D)と極めてよく類似していた。このことから、抗GM2 MA bによって染色されたフィラメント様構造は、ビメンチンIFであることが強く示唆された。

#### (2) 単離ビメンチンの抗GM2 MA bに対する反応性

ビメンチンをヒト正常皮膚由来繊維芽細胞とマウス肥満細胞より単離した。ビメンチンは、その分子量が55-58 kDaであることが知られている<sup>(101)</sup>。本実験で単離したタンパク質分子がビメンチンであることは、その分子量並びに抗ビメンチンMA bとの反応性から確認した(図18A)。次に抗GM2 MA bが単離ビメンチンに反応するか否かについて、ELISAにより検討した。図18に示すように、ELISAプレートに固相されたビメンチンは、抗ビメンチンMA b並びに抗GM2 MA bと量依存的に反応するが、抗GM3 MA bや抗GM1 MA bとは全く反応しなかった。本実験で用いたビメンチンは、1%トリトンX-100存在下で単離し、用時まで7M尿素存在下で保存した。従って単離ビメンチン画分からは、水溶性タンパク質並び



に脂質は除去されていると考えられる。この結果は、それにもかかわらずビメンチンに GM2 が極めて安定な状態で結合していることを示唆するものである。ELISA プレートへのビメンチン固相率は、約 30-32% であった。また、GM2 の固相化率は、約 21% であることが報告されている<sup>(62)</sup>。これらデータを基にしてビメンチンと GM2 の会合モル比を算出したところ、約 20:1 (GM2 : ビメンチン) であった。

### (3) 単離ビメンチンからの脂質抽出とその TLC 免疫染色による解析

ビメンチンに直接 GM2 が結合していることを証明するために、単離ビメンチンから脂質抽出を行い、その抽出物を TLC で展開し、抗 GM2 MA b を用いた TLC 免疫染色を試みた。単離ビメンチンから抽出した脂質試料中には、確かに抗 GM2 MA b と反応する脂質成分が一本のバンドとして検出された (図19)。このバンドの TLC 上での R<sub>f</sub> 値は、標準 GM2 の値とよく一致するものであった。検出された脂質成分は、抗体の特異性並びに R<sub>f</sub> 値から GM2 であると同定された。スタンダード GM2 の R<sub>f</sub> 値との若干の差異は、おそらくセラミド部分の脂肪酸組成の違いに起因していると考えられた<sup>(108)</sup>。これらの結果は、ビメンチンには確かに GM2 が結合した状態で存在していることを強く示唆する。

### (4) 抗 GM2 MA b による単離ビメンチンの Western blot 解析

更に、GM2 が直接ビメンチンに結合した状態で存在していることを証明するために、抗 GM2 MA b を用いて Western blot 解析を行った。その結果を図20に示した。単離ビメンチンを Laemmli の試料緩衝液と混ぜ、ボイルせずに SDS-PAGE を行い、抗 GM2 MA b で Western blot したところ、57 kDa に1本のバンドが検出された (図20A)。このバンドは、抗ビメンチン MA b 並びにクーマジープリアントブルー (CCB) 染色によって検出されたバンドと全く同じ移動度を示すことから (図20A)、抗 GM2 MA b で検出された分子はビメンチンであることが明らかになった。一方、上記試料をボイルし、同様の解析を行ったが、抗 GM2 MA b と反応する分子は全く検出されなかった (not shown)。

更に上記試料に過剰量の GM2 を加えて、ボイルしないで SDS-PAGE 後、同様の解析を行った (図20B)。抗 GM2 MA b は、GM2 を加えた時の方が、GM2 を加えない時に比べて明らかに強く 57 kDa のバンドを染色した。また、脂質抽出した後のビメンチンを同様に解析したが、抗 GM2 MA b と反応する分子は検出されなかった (not shown)。

一連の結果は、ビメンチンに GM2 が非共有結合的に直接結合して存在していることを示すとともに、その結合は GM2 特異的糖鎖構造とセラミド部位を介してビメンチンに結合しているものと考えられた。

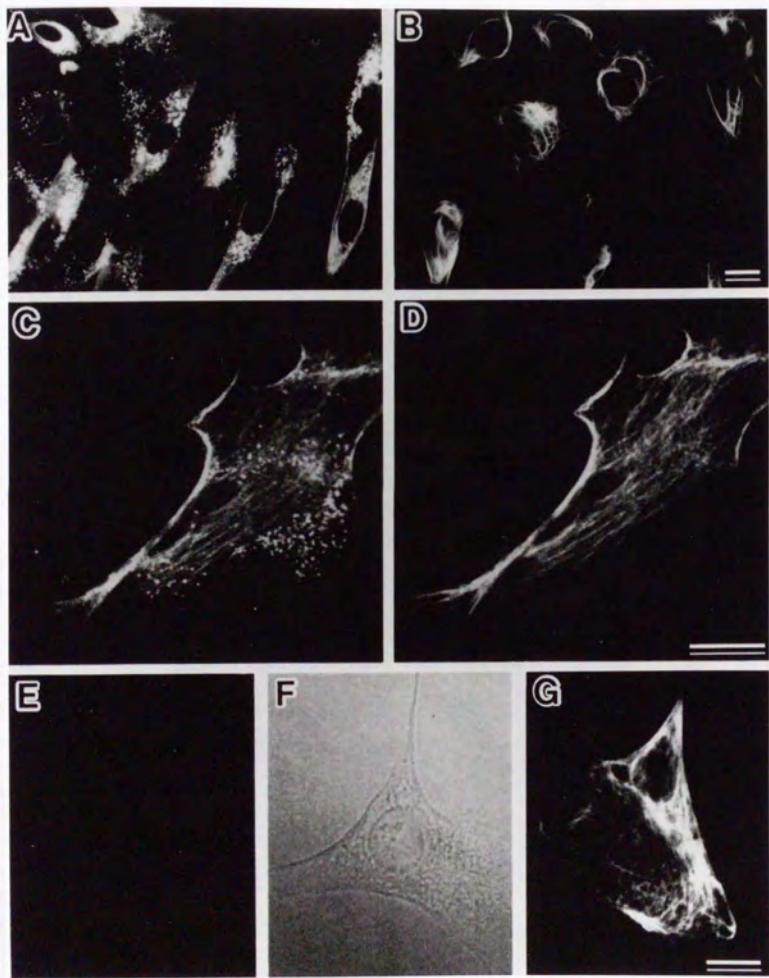


図17 Tay-Sachs病患者皮膚由来繊維芽細胞並びに正常ヒト皮膚由来繊維芽細胞の抗GM2 MAbによる免疫蛍光染色。

Tay-Sachs病患者皮膚由来繊維芽細胞 (A) には、GM2 が蓄積したリソソーム様顆粒が細胞質内に多数観察されたが、正常ヒト皮膚由来繊維芽細胞 (B) ではそのような顆粒はほとんど観察されなかった。両細胞は、抗 GM2 MAb によって細胞骨格様構造が染色された。Tay-Sachs 病繊維芽細胞を用いて、抗 GM2 MAb と抗 ビメンチン MAb による二重染色を行うと、抗 GM2 MAb (C; B 励起光) の染色パターンは、抗 ビメンチン MAb (D; G 励起光) のパターンに極めて類似していた。Tay-Sachs 病繊維芽細胞をクロロホルム:メタノール:水 (4:8:3, v/v) で処理後、抗 GM2 MAb と抗 ビメンチン MAb でそれぞれ染色すると、抗 GM2 MAb (E) では全く染色されないが、抗 ビメンチン MAb (G) は処理前と同様にビメンチン IF を染色した。F は、E と G の位相差像を示す。スケールバーは、15  $\mu\text{m}$  を示す。

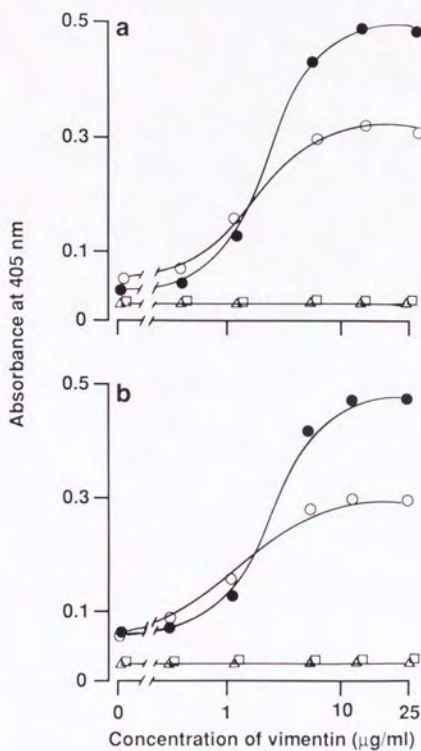


図18 ELISAによるビメンチン結合GM2の検出。

正常ヒト皮膚由来繊維芽細胞 (a) 及びマウス肥満細胞 (b) から調整した精製ビメンチンをタンパク質固相用マイクロプレートに固相させ、抗GM2 MAb (○) 及び抗ビメンチン MAb (●) と反応させた。両抗体は、精製ビメンチンと量依存的に反応した。一方、抗GM1 MAb (△) 及び抗GM3 MAb (□) は、全く反応しなかった。

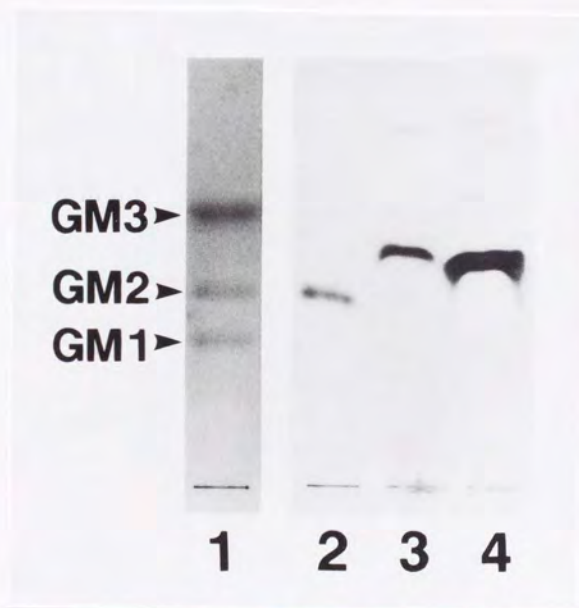


図19 精製ピメンチンから抽出した脂質画分のTLC免疫染色による解析。

レーン1は、標準ガングリオシド (GM3、GM2並びにGM1) を各々  $1 \mu\text{g}$  ずつ展開した。GM3は犬赤血球由来、GM2はTay-Sachs脳由来、GM1はヒト脳由来のものを用いた。レーン2は標準ガングリオシド (GM3、GM2並びにGM1) を各  $0.1 \mu\text{g}$  ずつ、レーン3は正常ヒト皮膚由来繊維芽細胞から単離したピメンチン  $100 \mu\text{g}$  の脂質抽出画分、レーン4はマウス肥満細胞から単離したピメンチン  $200 \mu\text{g}$  の脂質抽出画分を展開した。展開溶媒は、クロロホルム：メタノール：0.2%  $\text{CaCl}_2$  (60：40：9、v/v)。レーン1はオルシノール発色、レーン2から4は抗GM2 MAbによる免疫染色を示す。

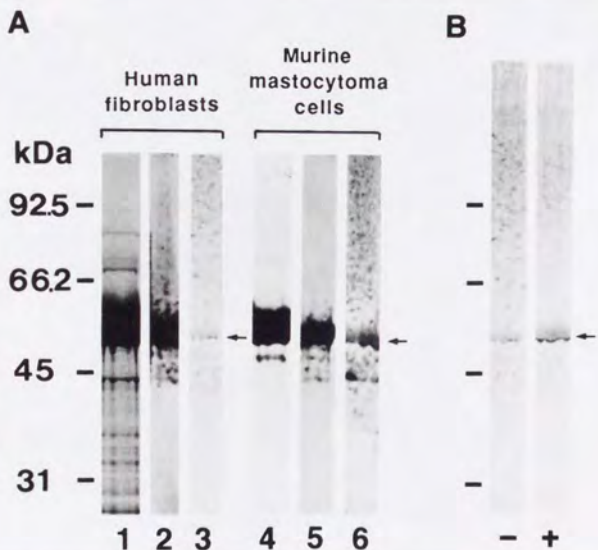


図20 抗 GM2 MAb による単離ビメンチンのWestern blot 解析。

(A) 正常ヒト皮膚由来繊維芽細胞の単離ビメンチン (10 $\mu$ g/レーン) とマウス肥満細胞の精製ビメンチン (10 $\mu$ g/レーン) を SDS PAGE により分離後、PVDF 膜に転写した。レーン 1 から 3 は正常ヒト皮膚由来繊維芽細胞の単離ビメンチンを、レーン 4 から 6 はマウス肥満細胞の精製ビメンチンを示す。各転写試料を CBB (レーン 1 と 4)、抗ビメンチン MAb (レーン 2 と 5) 及び抗 GM2 MAb (レーン 3 と 6) により染色した。抗 GM2 MAb は、ビメンチンと特異的に反応した。(B) 正常ヒト皮膚由来繊維芽細胞の単離ビメンチンに過剰量の GM2 を添加した試料 (+) と、添加しなかった試料 (-) を SDS PAGE 後、抗 GM2 MAb を用いて Western blot を行った。GM2 を添加した試料 (+) は、に抗 GM2 MAb によってより強く染色された。矢印は、染色バンドの位置を示す。

#### 第4節 考察

Tay Sachs 病は、 $\beta$ -ヘキソサミニダーゼ A あるいは GM2 活性化タンパク質の遺伝的欠損によって、細胞質内に過剰量の GM2 が蓄積し、脳神経に異常をきたすヒト遺伝性疾患である<sup>98</sup>。本実験で用いた Tay Sachs 病患者皮膚由来繊維芽細胞は、 $\beta$ -ヘキソサミニダーゼ A 欠損であることが臨床診断により明らかにされている。これまで、Tay Sachs 病患者皮膚由来の細胞において、細胞質内に蓄積した GM2 の分布を免疫細胞化学的に解析した報告は少ない<sup>106, 107</sup>。その一つの原因は、GM2 を特異的に検出可能な免疫学的プローブがなかったことがあげられる。これまでの Tay Sachs 病に関する基礎データ<sup>98</sup>から、GM2 特異的な MAb を用いて Tay Sachs 病患者皮膚由来繊維芽細胞の細胞質内を染色すれば、その細胞質内に GM2 が過剰に蓄積したリソソーム顆粒が観察されることが予想された。本実験において、Tay Sachs 病患者皮膚由来繊維芽細胞の細胞質内には、確かに抗 GM2 MAb によって染色される大きなリソソーム様顆粒が観察され、MAb の特異性から考えてリソソーム内に過剰に蓄積した GM2 を検出しているものと考えられた (図17 A と C)。正常ヒト皮膚由来繊維芽細胞には、ほとんどこのような顆粒様構造は検出されなかったことも、上記の結論を支持する。この観察結果は、抗 GM2 MAb を用いた免疫細胞化学は、Tay Sachs 病の臨床診断のための一つの有用な検査法の一つになりうることを示唆する。

それに加えて抗 GM2 MAb は、両細胞の細胞質内のフィラメント様構造を明瞭に染色した (図17)。これまで、細胞骨格タンパク質と糖脂質との会合に関して幾つの報告がある<sup>50, 97, 108, 109</sup>。例えば、グロボシドはヒト及びマウス繊維芽細胞のビメンチンに、平滑筋細胞のデスマミンに、ヒトケラチノサイトーマ及び肝腫瘍細胞のケラチンに、更にグリア細胞のグリア繊維酸性タンパク質に、それぞれ会合して分布していることが免疫細胞化学的に観察されている。本研究においても、GM2 がヒト皮膚由来繊維芽細胞のフィラメント様構造に会合していることを観察し、そのフィラメント様構造はビメンチン IF であることを確認した。Gillard ら (1990) は、グロボシドとビメンチンとの会合を観察し、それらの分子会合について二つの仮説を提示している<sup>97</sup>。①ビメンチンに直接結合している。②ビメンチンあるいはビメンチン会合タンパク質に、グロボシドを含む微小胞を介して間接的に会合している。これまでのところ、細胞骨格タンパク質と糖脂質がどのような会合をしているかについては、全く不明であった。

本実験では、単離ビメンチンを生化学的に解析することによって、ビメンチンと GM2 との会合の実体を明らかにすることを試みた。ビメンチンの単離は、1% トリトン X 100 と 7 M 尿素の存在下で行った。この単離過程によって、プレクチン<sup>110</sup>、シネミン<sup>108</sup> 及び他のビメンチン<sup>108</sup> 会合分子は除去され、ビメンチンのみを純粋に得ることができる。従ってこのような条件下で単離されたビメンチンに GM2 が検出される場合、GM2 はビメンチンに直接

結合していると解釈される。

正常ヒト皮膚由来繊維芽細胞とマウス肥満細胞から単離したビメンチンは、SDS PAGE において 57 kDa の 1 本のバンドとして検出され (図 20 A)、以前にマウスの同様の細胞で報告された分子量と一致していた<sup>[101]</sup>。この試料を Western blot 解析したところ、抗 GM2 MAb により 57 kDa の分子量をもつ 1 本のバンドが検出された (図 20 A と B) が、抗 GM3 MAb 及び抗 GM1 MAb では検出されなかった (not shown)。一方、Western blot 解析の際、試料をボイルすると抗 GM2 MAb との反応性は失われた。更に、ビメンチンより脂質抽出を行い、得られた脂質画分を抗 GM2 MAb を用いた TLC 免疫染色を行ったところ、その画分に GM2 が存在していることが明らかになった (図 19)。これらの実験事実は、GM2 がビメンチンに直接結合していることを示している。そして、その結合様式は非共有結合であろうと推測された。これまでビメンチンは、その DNA 並びにアミノ酸配列から“単純タンパク質”であると考えられていた<sup>[111]</sup>。しかし、本実験においてビメンチンには、GM2 が非共有結合的に結合していることが強く示唆されたことから、ビメンチンは“単純タンパク質”ではなく、“偽糖タンパク質”とも呼ばれるべきであろう。

ビメンチン IF は、生物種間において高度に保存されていることが、cDNA 並びにアミノ酸配列の解析により明らかにされている<sup>[12]</sup>。細胞内分布についても類似性が高い<sup>[13]</sup>。このことは、ビメンチンと糖脂質の会合は、脊椎動物だけでなく無脊椎動物の細胞においても同様のことが観察される可能性を示唆する。その一つの例として、ウニ卵には IF としてビメンチンが存在することが知られている<sup>[112]</sup>。ところが、ウニ卵には、これまでのところ GM2 は見いだされていない<sup>[11]</sup>。更にガングリオシドの糖鎖構造も、脊椎動物とは異なっていることが報告されている<sup>[11]</sup>。ウニ卵のビメンチンには、どのような糖脂質が結合しているか極めて興味のある問題点の一つである。もし、細胞のビメンチンに糖脂質が結合していることが一般化できるならば、その糖脂質はビメンチンの機能発現及び調節に重要な関わりを有すると考えられる。

ところで、ビメンチン IF の機能については、微小管やアクチンなどの他の細胞骨格タンパク質に比べて、あまり理解されていない。しかしその機能としては、細胞の運動性や細胞内小器官の分布の保持にあるものと考えられている<sup>[114, 116]</sup>。本実験における GM2 添加実験において、ビメンチンへの GM2 結合能には、量依存性が認められた (図 20 B)。このことは、ビメンチンへの GM2 の結合量がビメンチン機能の発現調節に関与している可能性を推測させる。



## 第4章 総 括

MAb の作製技術は、1975 年に Kohler と Milstein<sup>(116)</sup> によって確立され、医学・生物学分野を含めた多くの自然科学分野に導入されている。MAb は、従来のポリクローナル抗体に比べて極めて特異性の高いことがこれまでの数多くの報告から実証され、それに伴って分子の機能解析のために MAb は解析プローブとして必須なものとなってきた。特異性の高い MAb を得ることによって、MAb 認識分子の細胞及び組織における分布、*in vitro* 及び *in vivo* における免疫学的手法を用いた機能解析、MAb を用いた遺伝子クローニング等、多くの解析が可能となる。

ganglioside を含む糖脂質に対する特異的な MAb の作製は、糖鎖の免疫原性が低いことからタンパク質に比べて困難とされていた。しかし、本研究で示した精製ganglioside を免疫原とする MAb の作製法（第1章）によって、効率よくganglioside に対する特異的な MAb の作製が可能であることを示した。この方法は、多くの微量なganglioside 並びに化学合成された糖脂質等に対する MAb 作製のために応用されていくものと考えられる。既に、この MAb 作製法を用いて b 経路ganglioside (GD3、GD2、GD1b、GT1b 並びに GQ1b) 並びにシアル酸として NeuGc を含むganglioside系ganglioside (GM3、GM2 並びに GD3) に対する特異的な MAb が作製されている<sup>(61,17)</sup>。免疫学のプローブとしての MAb が得られたことによって、免疫学的手法を用いてganglioside の機能について探究することが可能となった。

これまでganglioside は、細胞の分化、形態形成及び組織構築に関与することが予想されてきた<sup>(18)</sup>。こうした多くの研究は、脳・神経系由来の神経細胞株を用いて解析されてきた。しかし、いずれの研究も現象を捕えたのみの報告が多く、その作用のメカニズムについては推論の域を出るに至っていないのが現状である。一般的に機能的に未知な分子については、特異的な MAb を用いて細胞及び組織における発現及び分布を形態学的に解析することによって、これまでに蓄積された形態学的及び解剖学的知見のパラメーターと組み合わせることにより機能を推察していく。このような観点から、脳・神経系組織及び繊維芽細胞をモデルとして、これらの組織及び細胞におけるganglioside の分布を特異的な MAb を用いて明確にし、ganglioside の各分布領域における機能的役割について考察を加えた（第2章と第3章）。

糖脂質は、糖脂質合成の中間体としてゴルジ体や糖脂質の輸送に関わる細胞質内顆粒に若干存在するとしても、その多くは細胞膜に輸送され膜上に発現されると考えられ、細胞質内に糖脂質の明瞭な分布が観察されるとは考えられなかった。ところが免疫電子顕微鏡や免疫細胞化学による観察によって、細胞質内小器官や細胞骨格にも糖脂質が存在していることが

相次いで報告された<sup>(47, 97, 108, 109)</sup>。本研究では、Tay Sachs 病患者皮膚由来繊維芽細胞 (GM2 蓄積症) をモデルとして、細胞質内における GM2 の分布を抗 GM2 MAb を用いた免疫細胞化学により明らかにした (第3章)。その結果、GM2 は Tay Sachs 病患者皮膚由来繊維芽細胞の細胞質内において GM2 が蓄積したと考えられるリソソーム様顆粒と繊維様構造に存在し、一方正常ヒト皮膚由来繊維芽細胞には繊維様構造のみに GM2 が分布していた。この繊維様構造は中間系フィラメントの一つであるビメンチンであり、更に GM2 が直接ビメンチンに非共有結合的に存在していることが判明した。マウス肥満細胞から得た精製ビメンチンにおいても同様の結果を得た。今回の実験において哺乳動物細胞における GM2 は、細胞質内においてビメンチンと非共有結合によって比較的安定に存在していると結論される。ビメンチンは、動物の進化の過程において極めてよく保存された機能タンパク質であり、種を超えたビメンチン IF の機能、特にビメンチン IF の重合・脱重合への GM2 の作用に興味もたれた。それは、外部から過剰量の GM2 を単離ビメンチンに添加することによって、明らかにビメンチンへの GM2 結合量に変化が見られたからである (第3章、図20)。この事実は、GM2 結合量の動的変化によってビメンチン IF の重合・脱重合を調節している可能性を予測させる。既にビメンチン IF の脱重合は、ヘッド領域 (N 末端側) のある特異的な領域がタンパク質キナーゼC及びタンパク質キナーゼAによるリン酸化により、また重合は脱リン酸化されることによって生じることが *in vitro* の実験系で示されている<sup>(101)</sup>。一方、幾つかのガングリオシドは、タンパク質キナーゼCやキナーゼAの活性化に対して抑制的に、また促進的に作用することが報告されている<sup>(96,119)</sup>。これらの事実を踏まえて、今後ビメンチン IF における GM2 の局在を免疫電子顕微鏡により同定すると同時に、Inagaki ら (1987)<sup>(101)</sup> の *in vitro* の実験系を用いた解析を行うことによって、上記した GM2 の機能的役割が明らかになってくるものと考えている。

一方、ガングリオシドは、脳・神経系における存在意義、存在領域並びに生物学的機能についてはほとんど不明であった。そこで、ガングリオシドの脳・神経系における機能的役割を探究して行くための一つのアプローチとして、まず主要ガングリオシドに焦点を当て、これらの組織分布を免疫組織化学の一つである間接蛍光抗体法により解析した (第2章)。成熟ラットにおける中枢神経組織 (大脳、小脳及び脊髄) の各組織における主要ガングリオシドは、GM1、GD1a、GD1b、GT1b 並びに GQ1b であることを確認した。この結果は Yu らの報告<sup>(41)</sup> とよく一致していた。しかし、脊髄においては GD1a の含量が他の神経組織に比べて少ない傾向を示していた。主要ガングリオシドの組織分布は、組織構築の明瞭な小脳、大脳皮質、海馬並びに脊髄を選択した。その結果、主要ガングリオシドは四つの中枢神経組織において、細胞及び層構造に特異的に発現していることを初めて明らかにした。免疫組織化学による解析の有用性は、組織形態学を基礎とした特定分子の分布観察が生理的条件下に極め

て近い状態で捉えられる点にある。従って、この方法によって得られた知見を基に組織構造学上との関連から分子の機能的役割を推察することが可能となる。本実験において、各ガングリオシドが細胞及び層に特異的な分布を示した事実は、その発現領域において何らかの機能的役割を担っていることを強く示唆する。成熟ラット小脳において、GM1 はバーグマングリアにも分布していた。この観察は、本実験が初めてである。生後から成熟に至る過程における小脳の形態形成において、バーグマングリアは外顆粒層の顆粒細胞が内顆粒層へと移動する際のガイド細胞としての役割をしていると考えられている<sup>[120, 121]</sup>。事実、これまでにバーグマングリアを移動すると考えられている顆粒細胞の膜表面上から、その移動に関与する分子が幾つか報告されている<sup>[122-124]</sup>。しかし、これまでに報告された細胞移動及び細胞接着に関わる分子は、イムノグロブリンスーパーファミリーに属する糖タンパク質であり、ホモフィリックな結合並びに接着を示すものである。ところが、細胞移動や細胞接着のようなダイナミックな現象は、複数の分子の機能的集合によって遂行されることが予想されることから、バーグマングリアの GM1 は、顆粒細胞の移動に関与している一つのリガンド分子である可能性を示唆する。著者は、顆粒細胞の移動期（生後 1 日から 20 日の間の小脳）における GM1 の分布について検討し、細胞移動期のバーグマングリアには成熟小脳のバーグマングリアよりも GM1 が強く分布していることを確認している（未発表）。今後は、GM1 が顆粒細胞の移動に関わる分子である証明として、まず GM1 結合膜タンパク質の検索を行う予定である。一方、GD1a、GT1b 及び GQ1b は、シナプス形成領域に発現していたことから、その形成及び機能との相関に興味を持たれた。最近、シナプス小胞膜を構成しているタンパク質の一つであるシナプトタグミンは、ガングリオシドと複合体を形成することによってボツリヌス B 型毒素の受容体となることが報告された<sup>[125]</sup>。すなわち、ボツリヌス B 型毒素のシナプトタグミンへの結合には、シナプトタグミンと GT1b/GD1a が複合体を形成することが必須であり、各々単独では全く結合しない。この分子は、コリン作動性神経細胞によって形成されるプレシナプス領域のシナプス小胞膜上に分布し、この神経細胞が外部刺激を受けてシナプス小胞内の各種機能タンパク質並びにペプチド（神経伝達物質）を細胞外へ放出する際に、シナプス小胞膜とプレシナプス膜の融合に関与している。GD1a と GT1b は、プレシナプス領域に分布している機能タンパク質の機能発現を制御するための複合体として存在している可能性が示唆される。GQ1b は、GD1a や GT1b とは異なり、極めて限られたシナプス領域（小脳糸球）に分布していたことから、その機能においても異なる可能性が示唆される。GM1 と同様に小脳の発達過程における GQ1b の分布変化を観察し、GQ1b の小脳糸球への分布は生後 30 日目になって初めて観察されるが、それ以前では全く観察されないことを確認している（未発表）。この観察と本実験による結果から、GQ1b の小脳糸球への発現は小脳の形態形成に伴っていることを明確に示すものである。従って、GQ1b は小脳糸球シナプス

の機能発現のために、安定的なシナプス形成維持に関与していると考えられた。今後、電子顕微鏡による詳細な分布の解析が必要であると考えている。

一連の組織分布の観察から、ガングリオシドは各分布領域において各々異なった機能的な役割を担っていることが推察された。特に、小脳については本実験における解析とともに発達過程におけるガングリオシドの分布変化の解析（未発表）と併せて興味ある知見を得つつある。ガングリオシドを機能分子として捉える場合、タンパク質及び糖タンパク質との分子間的繋がりやを予想していかなければならないと考えている。これまで、細胞膜上での糖鎖とタンパク質との繋がりを示すものとして、細胞接着現象が上げられる。この現象を解析するなかで、糖鎖をリガンドとする細胞接着タンパク質が発見された<sup>127</sup>。それは、セレクトインファミリーと呼ばれ、これまでに三つの分子（E-セレクトイン、P-セレクトイン、L-セレクトイン）が報告されている<sup>(127, 128)</sup>。これらは、何れも分子N末端にC-タイプレクチン様のドメインを有しており、このドメインを介して別の細胞表面に存在する特定の糖鎖と  $Ca^{2+}$  存在性に結合する。しかし、リガンド糖鎖としてガングリオシドは、認識されない。これまでに、ガングリオシド結合膜タンパク質の存在を示唆する報告がある<sup>(129, 130)</sup>が、未だ明確にした報告はない。本実験において、ガングリオシドの機能の一つとして、細胞移動及び細胞認識におけるリガンドとしての役割が考えられた。現在、幾つかのガングリオシドに対する結合膜タンパク質の検索を行うための新たな検出システムの開発を行っており、良好な結果を得つつある。今後は、更にその分子の性状について詳細な生化学的、免疫学的及び遺伝子工学的な解析を行う予定である。ガングリオシド結合膜タンパク質の存在とその分子の性状を明らかにして行くことによって、ガングリオシドの生体における機能的役割が浮かび上がってくるものと考えている。

## 謝 辞

本実験の遂行に当たり、終始御懇切なる御指導並びに御討論を賜りました東京都臨床医学総合研究所腫瘍免疫研究部門の田井 直室長に深甚なる謝意を表します。

また、本論文を作成するにあたり種々の御懇切なる御指導、御助言並びに御校閲を賜りました、東京大学分子細胞生物学研究所の鈴木絃一教授に心より深謝いたします。

更に、実験並びに本論文作製に際し、多大な御協力をいただいた東京都臨床医学総合研究所腫瘍免疫研究部門の小沢秀樹博士、川島育夫博士、小倉 潔博士、東京都臨床医学総合研究所の鈴木義之副所長、東京都臨床医学総合研究所臨床遺伝学研究部門の桜庭均室長、伊藤孝司博士、東京都臨床医学総合研究所超微形態研究部門の矢崎和盛室長、東京都臨床医学総合研究所生体膜研究部門の久保英夫博士、東京都神経科学総合研究所解剖学研究室の寺島俊雄博士、東京都老人医学研究所神経生理学研究室の稲垣昌樹室長、楠畑 雅博士、広島大学理学部動物学科の細谷浩史助教授に深謝いたします。解剖用語等について御助言いただいた日本大学医学部第2解剖学教室の今田正人助教授に深謝いたします。最後に、常に精神的な支えとなってくれた妻・李 淑娟に心から感謝いたします。

## 引用文献

- (1) Ishizuka, I., Suzuki, M., and Yamakawa, T. (1973) *J. Biochem.*, 73, 77-84.
- (2) Hammarstrom, S. (1971) *Biochim. Biophys. Acta*, 45, 468-476.
- (3) Wiegandt, H. (1982) *Advances in Neurochemistry* (Agranoff, B. W. and Aprison, M. H., eds.), 4, pp. 149-223, Plenum Press, New York.
- (4) Klenk, E. (1942) *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.*, 273, 76-86.
- (5) Ando, S. (1983) *Neurochem. Int.*, 5, 507-537.
- (6) Makita, A. and Taniguchi, N. (1985) in *Glycolipids* (Wiegandt, H., ed.) pp. 1-99, Elsevier, Amsterdam.
- (7) Matsubara, T. and Hayashi, A. (1986) *J. Biochem.*, 99, 1401-1408.
- (8) Hoshi, M. and Nagai, Y. (1975) *Biochim. Biophys. Acta*, 388, 152-162.
- (9) Kochetkov, N. K., Smirnova, G. P., and Chekareva, N. V. (1976) *Biochim. Biophys. Acta*, 424, 274-283.
- (10) Prokazova, N. V., Mikhailov, A. T., Kocharov, S. L., Malchenko, L. A., Zvezdina, N. D., Buzinkov, G., and Bergelson, L. D. (1981) *Eur. J. Biochem.*, 115, 671-677.
- (11) Kubo, H., Irie, A., Inagaki, F., and Hoshi, M. (1990) *J. Biochem.*, 108, 185-192.
- (12) Hakomori, S. (1981) *Annu. Rev. Biochem.*, 50, 733-764.
- (13) Holmes, E. H. and Hakomori, S. (1982) *J. Biol. Chem.*, 250, 7698-7703.
- (14) Bremer, E. G., Hakomori, S., Bowen-Pope, D. E., Raimes, E., and Ross, R. (1984) *J. Biol. Chem.*, 259, 6818-6825.
- (15) Bremer, E. G., Schlessinger, J., and Hakomori, S. (1986) *J. Biol. Chem.*, 261, 2434-2440.
- (16) Hanai, N., Npres, G. A., Macleod, C. T., Mendez, C. R. T., and Hakomori, S. (1988) *J. Biol. Chem.*, 10915-10921.
- (17) Nojiri, H., Takaku, F., Terui, Y., Miura, Y., and Saito, M. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 782-786.
- (18) Schwartzmann, P., Hoffmann-Bleihauer, J., Schubert, K., Sandhoff, D., and Marsh, D. (1983) *Biochemistry*, 22, 5041-5048.
- (19) Fontana, J. A., Colbert, D. A., and Dessereth, A. B. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 3863-3866.
- (20) Nojiri, H., Kitagawa, S., Nakamura, M., Kirito, K., Enomoto, Y., and Saito, M. (1988) *J. Biol. Chem.*, 263, 7443-7446.
- (21) Tsuji, S., Arita, M., and Nagai, Y. (1983) *J. Biochem.*, 94, 303-306.
- (22) Nakajima, J., Tsuji, S., and Nagai, Y. (1986) *Biochim. Biophys. Acta*, 876, 65-71.
- (23) Roisen, F. J., Bartfield, H., Nagele, R., and Yorke, G. (1981) *Science*, 214,

- (24) Skaper, S. D., Katoh-Semba, R., and Varon, S. (1985) *Dev. Brain Res.*, 23, 19-26.
- (25) Dreyfus, H., Ferret, B., Harth, S., Gorio, A., Freysz, L., and Massarelli, R. (1984) in *Ganglioside Structure, Function and Biomedical Potential* (Ledeen, R. W., Yu, E. K., Eapport, M. M., and Suzuku, K., eds.), pp. 513-524, Plenum Press, New York.
- (26) Skaper, S. D. and Varon, S. (1985) *Int. J. Dev. Neurosci.*, 3, 187-194.
- (27) Morgan, J. I. and Seifert, W. (1979) *J. Supramol. Struct.*, 19, 111-124.
- (28) Seifert, W. (1981) in *Gangliosides in Neurological and Neuromuscular Function, Development and Repair* (Rapport, M. M. and Gorio, A., eds.), pp. 99-117, Raven Press, New York.
- (29) Leon, A., Facci, L., Benvegún, D., and Toffano, G. (1982) *Dev. Neurosci.*, 5, 108-114.
- (30) Matta, S. G., Yorke, G., and Roisen, F. J. (1986) *Dev. Brain Res.*, 27, 243-252.
- (31) Tsuji, S., Yamashita, T., Tanaka, M., and Nagai, Y. (1988) *J. Neurochem.*, 50, 414-423.
- (32) Ferrari, G., Fabris, M., and Gorio, A. (1983) *Dev. Brain Res.*, 8, 215-221.
- (33) Tsuji, S., Nakajima, J., Sakaki, T., and Nagai, Y. (1985) *J. Biochem.*, 97, 969-972.
- (34) Doherty, P., Diekson, J. G., Flanigan, T. P., and Walsh, F. S. (1985) *J. Neurochem.*, 44, 1259-1265.
- (35) Robb, G. A. and Keynes, R. J. (1984) *Brain Res.*, 295, 368-371.
- (36) Massa, P. T. (1993) *J. Exp. Med.*, 178, 1357-1363.
- (37) Ledden, R., Yu, R. K., and Eng, L. F. (1973) *J. Neurochem.*, 21, 829-839.
- (38) Ueno, K., Ando, S., and Yu, R. K. (1978) *J. Lipid Res.*, 19, 863-871.
- (39) Sonnino, S., Ghidoni, R., Chigorno, V., Masserini, M., and Tettamanti, G. (1983) *Anal. Biochem.*, 128, 104-114.
- (40) Majumder, T. A. and Sarkan, P. K. (1988) *Indian J. Biochem. Biophys.*, 25, 193-196.
- (41) Yu, R. K., Macala, L. J., Taki, T., Weinfeld, H. M., and Yu, F. S. (1988) *J. Neurochem.*, 50, 1825-1829.
- (42) Levine, S. M., Seyfride, T. U., Yu, R. K., and Goldman, J. E. (1986) *Brain Res.*, 374, 260-269.
- (43) Rosner, H., Greis, C., and Henke-Fahle, S. (1988) *Dev. Brain Res.*, 42, 161-171.
- (44) Nishinaka, T., Iwata, D., Shimada, S., Kosaka, K., and Suzuku, Y. (1993) *Neurosci. Res.*, 17, 171-176.
- (45) Iwamoto, N., Suzuki, Y., Makino, Y., Haga, C., Kosaka, K., and Iizuka, R.

- (1990) *Brain Res.*, 522, 152-156.
- (46) Yamakawa, T. and Nagai, Y. (1978) *Trends Biochem. Sci.* 3, 128-131.
- (47) van Genderen, I. L., van Meer, G., Solt, J. W., Geuze, H. J., and Voorhout, W. F. (1991) *J. Cell Biol.*, 115, 1009-1019.
- (48) Higashi, H., Omori, A., and Yamagata, T. (1992) *J. Biol. chem.*, 267, 9831-9838.
- (49) Hilbush, B. S. and Levine, J. M. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 5616-5620.
- (50) Sakakibara, K., Momoi, T., Uchida, T., and Nagai, Y. (1981) *Nature*, 293, 76-79.
- (51) Steiner, P. M. and Roop, D. R. (1988) *Ann. Rev. Biochem.*, 57, 593-625.
- (52) Kniep, B., Cinek, T., Angelisova, P., and Horejsi, V. (1994) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 203, 1069-1075.
- (53) Herlyn, M. and Koprowski, H. (1988) *Ann. Rev. Immunol.*, 6, 283-308.
- (54) Cahan, L. D., Irie, R. F., Singh, R., Cassidenti, A., and Paulson, J. C. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 7629-7633.
- (55) Yamaguchi, H., Furukawa, K., Fortunato, S. R., Livingston, P. O., Lloyd, K. U., Oettgen, M. F., and Old, L. J. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 2416-2420.
- (56) Hirabayashi, S., Hamaoka, A., Matsumoto, M., Tagawa, M., Wakabayashi, S., and Taniguchi, M. (1985) *J. Biol. Chem.*, 260, 13328-13333.
- (57) Natoli, E. J., Livingston, P. O., Pukel, C. S., Lloyd, K. O., Wiegandt, H., Szalay, J., Oettgen, H. F., and Old, L. J. (1986) *Cancer Res.*, 46, 4116-4120.
- (58) Pukel, C. S., Lloyd, K. O., Travassos, L. R., Dippold, W. G., Oettgen, H. F., and Old, L. J. (1982) *J. Exp. Med.*, 155, 1133-1147.
- (59) Kawashima, I., Nakamura, O., and Tai, T. (1992) *Mol. Immunol.*, 29, 625-632.
- (60) Tai, T., Paulson, J. C., Cahan, L. D., and Irie, R. F. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80, 5392-5396.
- (61) Ozawa, H., Kotani, M., Kawashima, I., and Tai, T. (1992) *Biochim. Biophys. Acta*, 1123, 184-190.
- (62) Tai, T., Cahan, L. D., Paulson, J. C., Saxton, R. E., and Irie, R. F. (1984) *J. Natl. Cancer Inst.*, 73, 627-633.
- (63) Tai, T., Sze, L., Kawashima, I., Saxton, R. E., and Irie, R. F. (1987) *J. Biol. Chem.*, 256, 6803-6807.
- (64) Schriever, F. R. D., Dennis, G., and Riethmuller, G. (1988) *Cancer Res.*, 48, 2524-2530.
- (65) Miyake, M., Ito, M., Hitomi, S., Ikeda, S., Kurata, M., Hino, A., Miyake, N., and Kannagi, R. (1988) *Cancer Res.*, 48, 6154-6160.
- (66) Mahadik, S. P., Laev, H., and Rapport, M. M. (1986) *J. Neurochem.*

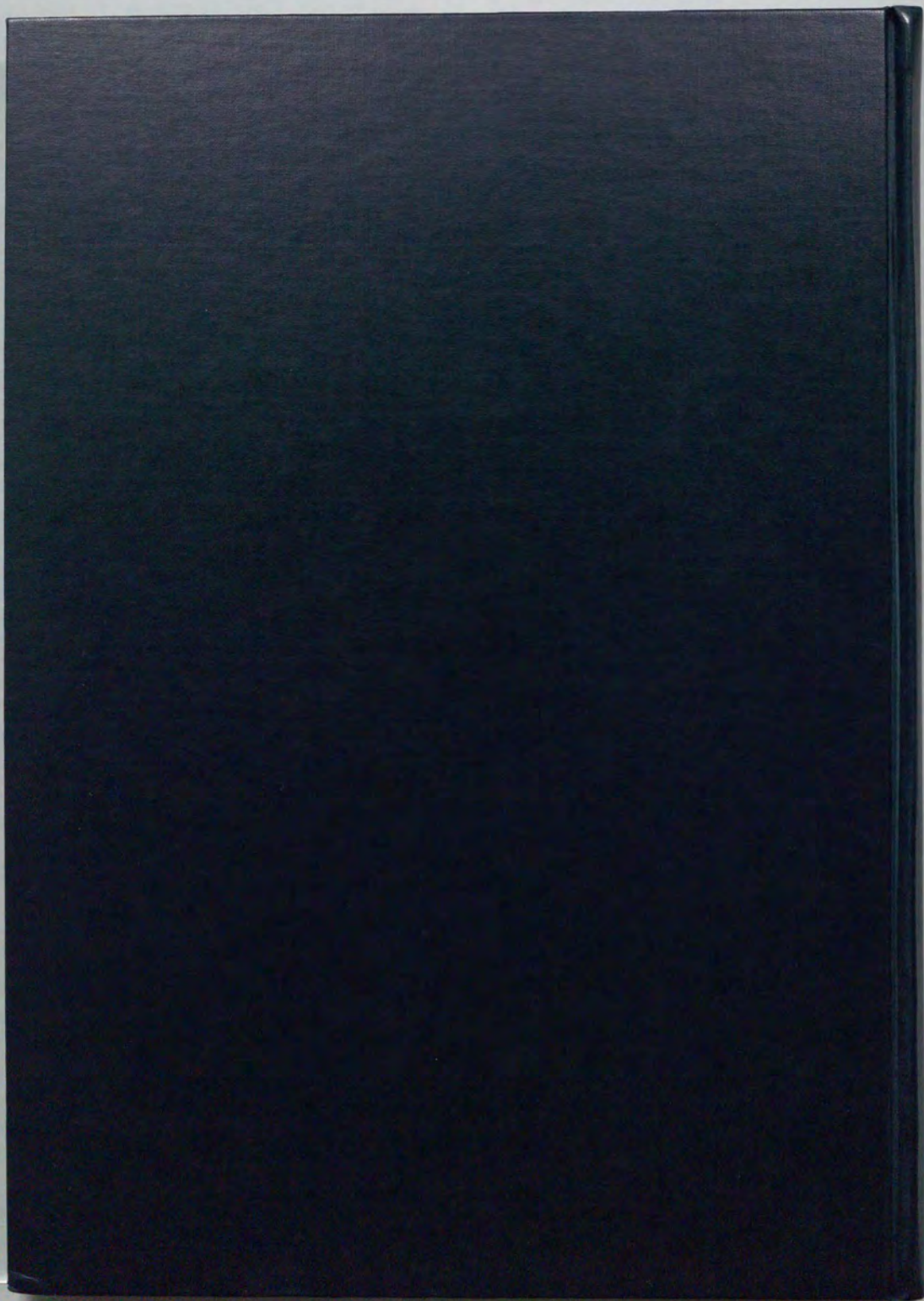


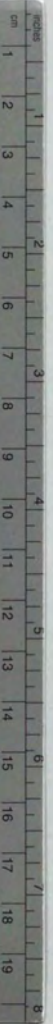
47,1172-1175.

- (67) Kracun, I., Rosner, H., Cosovic, C., and Stavljenic, A. (1984) *J. Neurochem.*, 43, 979-989.
- (68) Golzman, J. E., Hirano, M., Yu, R. K., and Seyfried, T. N. (1984) *J. Neurochem.*, 7, 179-192.
- (69) Gray, H. (1985) in *Anatomy of the human body* (Clemante, C. D., ed.), pp. 933-1148, Lea and Febiger, Philadelphia, USA.
- (70) Svennerholm, L. and Fredman, P. (1980) *Biochim. Biophys. Acta*, 617, 97-109.
- (71) Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 4350-4354.
- (72) Paxinos, G. and Watson, C. (1986) *The Rat Brain in stereotaxic coordinates*, 2nd ed., Academic press, INC San Diego, Boston, New York.
- (73) Kopsch, F. R. (1959) *Rauber-Kopsch Lehrbuch und Atlas der Anatomie des Menschen*, Georg Thieme.
- (74) Rexed, B. (1952) *J. Comp. Neurol.*, 96, 415-496.
- (75) Willinger, M. and Schechner, M. (1980) *Dev. Biol.*, 74, 101-117.
- (76) Ando, S., Chang, N. -C., and Yu, R. K. (1978) *Anal. Biochem.*, 89, 437-450.
- (77) De Baecque, C., Johnson, A. B., Naiki, M., Schwarting, G., and Marcus, D. M. (1976) *Brain Res.*, 114, 117-122.
- (78) Laev, H., Rapport, M. M., Mahadik, S. P. and Silverman, A. -J. (1978) *Brain Res.*, 157, 136-141.
- (79) Laev, H. and Mahadik, S. P. (1989) *Neurosci. Lett.*, 102, 7-14.
- (80) Graus, F., Cordon-Cardo, C., Houghton, A. N., Medamed, M. R., and Old, L. J. (1984) *Brain Res.*, 324, 190-194.
- (81) Nakamura, K., Suzuki, M., Inagaki, F., Yamakawa, T., and Suzuki, A. (1987) *J. Biochem.*, 101, 825-835.
- (82) Tiemyer, M., Swank-Hill, P., and Schnaar, R. L. (1990) *J. Bio. Chem.*, 265, 11990-11999.
- (83) Dahl, D. (1983) *Exp. Cell Res.*, 149, 397-408.
- (84) Huber, G. and Matus, A. (1984) *J. Cell. Biol.*, 98, 777-781.
- (85) Schmechel, D., Marangos, P. J., Bringhtman, M., and Gooduin, F. K. (1978) *Science*, 199, 313-315.
- (86) Sloviter, R. S. (1989) *J. Comp. Neurol.*, 280, 183-196.
- (87) Celio, M. R. (1990) *Neuroscience*, 35, 375-475.
- (88) Hakomori, S. (1981) *Annu. Rev. Biochem.*, 50, 733-764.
- (89) Hanai, N., Nores, G. A., Macleod, C., Torres-Mendez, C., and Hakomori, S. (1988) *J. Biol. Chem.*, 263, 10915-10921.
- (90) Hakomori, S. and Kannagi, R. (1983) *J. Natl. Cancer Inst.*, 7, 231-251.
- (91) Doherty, P., Ashton, S. V., Skaper, S. A., Leon, A., and Walsh, F. S. (1992) *J. Cell Biol.*, 117, 1093-1099.

- (92) Hakomori, S. (1989) *Adv. Cancer Res.*, 52, 257-331.
- (93) Katz, H. R. and Austin, K. F. (1986) *J. Immunol.*, 136, 3819-3824.
- (94) Symington, F. W., Murry, W. A., Bearman, S. I., and Hakomori, S. (1987) *J. Biol. Chem.*, 262, 11356-11363.
- (95) Shogomori, H., Chiba, K., Kubo, H., and Hoshi, M. (1993) *Zygote*, 1, 215-223.
- (96) Higashi, H. and Yamagata, T. (1992) *J. Biol. Chem.*, 267, 9839-9843.
- (97) Gillard, B., Thurmon, L. T., and Marcus, D. M. (1992) *Cell Motil. Cytoskel.*, 21, 255-271.
- (98) Sandohoff, K., Cozelmann, E., Kaback, M. M., and Suzuki, K. (1989) The GM2 gangliosidosis. In *The Metabolic Basis of Inherited Disease* (Scriver, C. R., Beaudet, A. L., Sly, W. S., and Valle, D., eds.), pp.1807-1839, McGraw Hill, New York.
- (99) Momoi, T., Ando, S., and Nagai, Y. (1976) *Biochim. Biophys. Acta*, 441, 488-497.
- (100) Geisler, N. and Weber. (1981) *FEBS Lett.*, 125, 253-256.
- (101) Inagaki, M., Nishi, Y., Nishizawa, K., Matuyama, M., and Sato, C. (1987) *Nature*, 328, 649-652.
- (102) Laemmli, U. K. (1970) *Nature*, 227, 680-685.
- (103) Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, T. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 4350-4354.
- (104) Hoffman, L. M. and Brooks, S. R. (1991) *Biochim. Biophys. Acta*, 1084, 94-100.
- (105) Martensson, E. (1966) *Biochim. Biophys. Acta*, 116, 296-308.
- (106) Sakuraba, H., Itoh, K., Kotani, M., Tai, T., Yamada, H., Kurosawa, K., Kuroki, Y., Suzuki, H., Utsunomiya, T., Inoue, H., and Suzuki, Y. (1993) *Brain and Development*, 15, 278-282.
- (107) Itoh, K., Kotani, M., Tai, T., Suzuki, H., Utsunomiya, T., Inoue, H., Yamada, H., Sakuraba, H., and Suzuki, Y. (1993) *Clin. Genet.*, 44, 302-306.
- (108) Gillard, B., Heath, J. P., Thurmon, L. T., and Marcus, D. M. (1991) *Exp. Cell Res.*, 192, 433-444.
- (109) Gillard, B., Thurmon, L. T., and Marcus, D. M. (1993) *Glycobiology*, 3, 57-67.
- (110) Seiner, P. M. and Roop, D. R. (1988) *Annu. Rev. Biochem.*, 57, 593-625.
- (111) Perreau, J., Liliembacum, A., Vasseur, M., and Paulin, D. (1988) *Gene*, 62, 7-16.
- (112) Hermann, H., Foquet, and Franke, W. W. (1989) *Development*, 105, 279-298.
- (113) Boyle, J. A. and Ernst, S. (1989) *Dev. Biol.*, 134, 72-84.
- (114) Lehto, V. P., Virtanen, I., and Kurki, P. (1978) *Nature*, 272, 175-177.

- (115) Small, J. V. and Celis, J. E. (1978) *J. Cell Sci.*, 31, 393-409.
- (116) Kohler, G. and Milstein, C. (1975) *Nature*, 256, 495-497.
- (117) Ozawa, H., Kawashima, I., and Tai, T. (1992) *Arch. Biochem. Biophys.*, 294, 427-433.
- (118) Varki, A. (1993) *Glycobiology*, 3, 97-130.
- (119) Spiegel, S. (1989) *J. Biol. Chem.*, 264, 16512-16517.
- (120) Hatton, M. E. and Mason, C. A. (1990) *Experientia*, 46, 907-916.
- (121) Gao, W. -Q. and Hatton, M. E. (1993) *Science*, 260, 367-369.
- (122) Lindner, J., Rathjen, F. G., Schachner, M. (1983) *Nature*, 305, 427-430.
- (123) Chuong, C. -M., Crossin, K. L., and Edelman, G. M. (1987) *J. Cell Biol.*, 104, 331-342.
- (124) Chuong, C. -M. (1990) *Experientia*, 46, 892-899.
- (125) Nishiki, T., Kamata, Y., Nemoto, Y., Omori, A., Ito, T., Takahashi, M., and Kozaki, S. (1994) *J. Biol. Chem.*, 269, 10498-10503.
- (126) Klymkowsky, M. W., Bachant, J. B., and Domingo, A. (1989) *Cell Motil. Cytoskel.*, 14, 309-331.
- (127) Stoolman, L. M. (1989) *Cell*, 56, 907-910.
- (128) Springer, T. A. (1990) *Nature*, 364, 425-434.





# Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM, Kodak



# Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM, Kodak

**A** 1 2 3 4 5 6 **M** 8 9 10 11 12 13 14 15 **B** 17 18 19

