

論文題目

細胞膜表面に存在する複合糖質糖鎖の発現調節機構に関する研究

指導教官 岩森正男助教授

昭和63年4月

東京大学大学院医学系研究科

第3種博士課程(医学)

第2基礎医学専攻(生化学)入学

左 一 八

①

論文題目

細胞膜表面に存在する複合糖質糖鎖  
の発現調節機構に関する研究

指導教官 岩森正男助教授

昭和63年4月  
東京大学大学院医学系研究科  
第3種博士課程（医学）  
第2基礎医学専攻（生化学） 入学

左 一八

## 目次

糖脂質の構造式	1
序論	2
第1章 アフリカツメガエル卵母細胞に存在する酸性糖脂質の単離 およびその構造決定	
1. 実験方法	
1-1. 動物	4
1-2. 試薬	4
1-3. 卵母細胞からの糖脂質の抽出、精製	5
1-4. 薄層クロマトグラフィー (TLC) による糖脂質の分析	6
1-5. 糖、脂肪酸および長鎖塩基組成の分析	
1-5-a. 糖脂質からの糖、脂肪酸の調製およびその分析	6
1-5-b. 糖脂質からの長鎖塩基の調製およびその分析	7
1-6. メチル化分析による単糖間の結合位の解析	8
1-7. 糖脂質の酵素分解	
1-7-a. ノイラミニダーゼ ( <i>Arthrobacter ureafaciens</i> 由来) による分解	9
1-7-b. $\beta$ -N-アセチルヘキソサミニダーゼ (jack bean由来) による分解	9



1-8. 酵素免疫測定法 (TLC-イムノステイニング) による	
糖脂質の基本構造の推定	9
1-9. 高速原子衝撃質量分析法 (Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry; FAB-MS) による糖脂質の構造解析	10
2. 結果	
2-1. 酸性糖脂質のHPTLCパターン	12
2-2. A-6ガングリオシドの糖組成の分析	13
2-3. A-6ガングリオシドのメチル化分析による	
単糖間の結合様式の解析	13
2-4. A-6ガングリオシドのセラミド組成の分析	14
2-5. A-6ガングリオシドの基本骨格のTLC-イムノステイニング	
による決定	15
2-6. A-6ガングリオシドの非還元末端の糖鎖構造の	
TLC-イムノステイニングによる決定	16
2-7. A-6ガングリオシドのFAB-MSによる構造解析	17
2-8. A-6ガングリオシドの構造	18
2-9. 卵母細胞中の酸性糖脂質の構造およびその存在比	18
3. 考察	21

## 第2章 アフリカツメガエル卵母細胞に内在する糖脂質糖鎖の 生合成系路の解析

### 1. 実験方法

1-1.動物	2 3
1-2.試薬	2 3
1-3.卵母細胞からの酵素原液の調製	2 4
1-4.シアル酸転移酵素の活性測定およびその諸性質の解析	
1-4-a.最適タンパク質濃度の検討	2 4
1-4-b.最適反応時間の検討	2 5
1-4-c.最適pHの検討	2 5
1-4-d.金属イオン要求性の検討	2 5
1-4-e.界面活性剤の種類およびその濃度の検討	2 6
1-4-f.反応速度論的解析	2 6
1-4-g.シアル酸転移酵素の活性測定	2 6
1-5.N-アセチルガラクトサミン転移酵素の活性測定	2 7
1-6.ガラクトース転移酵素の活性測定	2 7
1-7.反応生成物の定量と同定	2 8

## 2.結果

### 2-1.アフリカツメガエル卵母細胞中のシアル酸転移酵素の

#### 諸性質の解析

2-1-a.最適タンパク質濃度の検討	2 9
2-1-b.最適反応時間の検討	2 9
2-1-c.最適pHの検討	3 0
2-1-d.金属イオン要求性の検討	3 1
2-1-e.界面活性剤の種類およびその濃度の検討	3 2
2-1-f.反応速度論的解析	3 3
2-2.アフリカツメガエル卵母細胞中の糖転移酵素活性の測定	3 5

2-3. 酵素反応生成物の同定	3 6
3. 考察	3 9
第3章 アフリカツメガエル受精卵の初期発生における糖脂質糖鎖の変化	
1. 実験方法	
1-1. 動物	4 2
1-2. 試薬	4 2
1-3. 成熟卵細胞の採取	4 2
1-4. 人工受精	4 3
1-5. 各発生段階での受精卵のサンプリング	4 4
1-6. 糖脂質の抽出、分離	4 4
1-7. 薄層クロマトグラフィー (TLC) による糖脂質の分析	4 5
2. 結果	
2-1. 受精卵の初期発生における酸性糖脂質の変化	4 6
2-2. 受精卵の初期発生における中性糖脂質の変化	4 6
3. 考察	5 1
総括	5 4
参考文献	5 6
謝辞	5 9



## 糖脂質の構造式

本実験に関わる糖脂質(1-3)および長鎖塩基(4)の構造式を以下に示した。

### 1. ガングリオシド

GM 3	NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-1Cer
GD 3	NeuAc $\alpha$ 2-8NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-1Cer
GM 2	GalNAc $\beta$ 1-4Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-1Cer $\begin{array}{c} 3 \\ \text{NeuAc}\alpha 2 \end{array}$
GM 1 a (GM 1)	Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\beta$ 1-4Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-1Cer $\begin{array}{c} 3 \\ \text{NeuAc}\alpha 2 \end{array}$
GM 1 b	NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\beta$ 1-4Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-1Cer
GalNAc-GM 1 a	GalNAc $\beta$ 1-4Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\beta$ 1-4Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-1Cer $\begin{array}{c} 3 \\ \text{NeuAc}\alpha 2 \end{array}$
GalNAc-GM 1 b	GalNAc $\beta$ 1-4Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\beta$ 1-4Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-1Cer $\begin{array}{c} 3 \\ \text{NeuAc}\alpha 2 \end{array}$

### 2. 硫酸化糖脂質

スルファチド	HSO <sub>3</sub> -3Gal $\beta$ 1-1Cer
--------	---------------------------------------

### 3. 中性糖脂質

CMH (ガラクトシルセラミド)	Gal $\beta$ 1-1Cer
CDH (ラクトシルセラミド)	Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-1Cer
アシアロGM 2	GalNAc $\beta$ 1-4Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-1Cer
アシアロGM 1	Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\beta$ 1-4Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-1Cer
GalNAc-GA 1	GalNAc $\beta$ 1-4Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\beta$ 1-4Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-1Cer

### 4. 長鎖塩基

d18:1 スフィンゴシン	CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>12</sub> -CH=CH(OH)-CH(NH <sub>2</sub> )-CH <sub>2</sub> -OH
フィトスフィンゴシン	CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>12</sub> -CH <sub>2</sub> -CH(OH)-CH(OH)-CH(NH <sub>2</sub> )-CH <sub>2</sub> -OH
(t18:0 スフィンゴシン)	

略号: Cer, ceramide; Glc, glucose; Gal, galactose; GalNAc, N-acetylgalactosamine;

NeuAc, N-acetylneuraminic acid

ガングリオシドの記号はSvennerholmの命名法に基づいて示した [1]。

硫酸化糖脂質および中性糖脂質は通称名を示した。

## 序論

複合糖質の一つである糖脂質は、疎水性の炭化水素鎖を細胞表層の脂質二重膜に埋め込み、親水性の糖鎖を外に突き出した形で存在しており、その糖鎖構造の違いから200種を超える分子種が知られている。これら細胞表層に出現する糖脂質は、細胞周期、分化、癌化に伴い量的、質的に大きく変化するだけでなく、癌抗原、分化抗原として、またある種の毒素、ウイルスのレセプターとして重要な機能を持つことが明らかにされている[2-5]。近年、分子生物学的手法を用いた解析により、糖鎖を介した細胞間の接着、認識機構が見いだされた[6]。さらに糖脂質依存性蛋白質リン酸化酵素の存在が報告される[7, 8]など、これら糖脂質が生理活性を併せ持つ生物学的に重要な分子として細胞活動に積極的に関与しているとの認識が高まっている。

一般に糖脂質をはじめとする複合糖質糖鎖は、糖供与体から単糖を受容体である糖、蛋白質、脂質に転移する糖転移酵素と呼ばれる酵素の基質特異性に依存し、合成された糖鎖が次に単糖を転移する酵素の基質となることを繰り返して完成される[9, 10]。糖転移酵素は主に細胞内の小胞体やゴルジ体の膜に強く結合して存在していることから、界面活性剤存在下で初めて可溶化される。一度可溶化された糖転移酵素は極めて不安定であること、さらに微量にしか存在しないことなどからこの酵素の完全精製は極めて困難である。このため通常のクローニングの手法を用いることが出来ず、遺伝子の構造解析を含めた発現調節機構については現在明らかになっていない。また糖転移酵素をはじめとする糖鎖発現に関与する遺伝子発現系も確立していない。

遺伝子発現系の一つであるアフリカツメガエル(*Xenopus laevis*)の卵母細胞へmRNAをマイクロインジェクションするというin vivoの翻訳系は、



(1) mRNA翻訳における種特異性がないこと、(2) 蛋白質合成における修飾 (グリコシレーション、リン酸化、シグナルペプチドの切断等) が卵母細胞内で行われること、(3) mRNAの翻訳が効率良く長時間にわたって行なわれることなどの優れた特徴を有し、遺伝子の活性を知る最適な材料として現在広く用いられている [11-13]。

本研究では、このように優れた特長を持つアフリカツメガエルの卵母細胞を糖鎖発現に関与する遺伝子、特に糖転移酵素遺伝子の発現系として取り上げた。糖脂質糖鎖は遺伝子の一次産物である糖転移酵素によって生合成される二次代謝産物である。卵母細胞を発現系として用いるためには、導入される外来糖転移酵素遺伝子にとって基質ともなるこの細胞中の糖脂質の構成および構造解析、さらに糖脂質糖鎖の合成に関わる一群の糖転移酵素の酵素学的性質を明らかにすることが不可欠である。そこで以下の点について解析、検討を行ないこの翻訳系の有用性を考察した。さらに発生にともない卵母細胞に内在している糖脂質糖鎖がどのように発現調節されているのかを併せて検討した。

(1) アフリカツメガエルの卵母細胞の糖脂質、特に酸性糖脂質についてその分離、精製を行ないHPTLC、酵素分解、酵素免疫測定法、化学分析および質量分析等により卵母細胞の主要な酸性糖脂質の構造を詳細に決定した。

(2) 卵母細胞に内在している糖脂質合成に関わる糖転移酵素 (シアル酸転移酵素、ガラクトース転移酵素、N-アセチルガラクトサミン転移酵素) の活性および諸性質 (基質特異性、最適pH、金属要求性、界面活性剤効果、 $K_m$ 値等) を詳細に調べ、この細胞中の糖脂質糖鎖の生合成経路を明らかにした。

(3) ホルモン投与により成熟した卵母細胞および受精後の細胞の各発段階における糖脂質 (酸性および中性糖脂質) の変化を調べた。

## 第1章 アフリカツメガエル卵母細胞に存在する酸性糖脂質の単離およびその構造決定

### 1. 実験方法

#### 1-1. 動物

アフリカツメガエル(*Xenopus laevis*) (体重30-40 g、メス) は日本生物材料センター株式会社 (東京) より購入した。

#### 1-2. 試薬

糖脂質の分離にはDEAE-Sephadex A-25 (Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Sweden), Florisil (100-200 メッシュ、和光純薬工業株式会社、大阪), Iatrobeads (6RS8060, 株式会社ヤトロン、東京) を用いた。糖脂質の検出、同定には実験目的に応じて、シリカゲル薄層プレート

(HPTLC, silica gel 60, E. Merck Co., Darmstadt, Germany) およびポリグラムシリカゲルプレート (MACHEREY-NAGEL, Germany) を使用した。糖脂質の酵素分解には、ノイラミニダーゼ[EC 3.2.1.18]

(*Arthrobacter ureafaciens* 由来、ナカライテスク株式会社、京都) および $\beta$ -N-アセチルヘキソサミニダーゼ (jack bean 由来、生化学工業株式会社、東京) を用いた。酵素免疫測定法には、ウサギ抗アシアロGM1抗血清 (生化学工業)、パーオキシダーゼラベル抗ウサギイムノグロブリン、パーオキシダーゼラベル抗マウスイムノグロブリン (Organon Teknika N. V. - Cappel Products, U.S.A.) を使用した。マウス抗GM2モノクローナル抗



体 (YHD-06) は山崎誠彦氏 (コニカ) より分与された [14]。その他の試薬は市販の特級のものをを用いた。

### 1-3. 卵母細胞からの糖脂質の抽出、精製

ホルモン処理を行っていないメスのアフリカツメガエルの卵巣から未成熟な卵母細胞を分離した。得られた卵母細胞160 gに1.5 のアセトンを加えてホモジナイズした。-20℃で一昼夜放置した後、ろ過して残さを風乾した。残さに1.5 のクロロホルム/メタノール/水 (1:1:0.1, v/v/v) および1.4 のクロロホルム/メタノール (1:1, v/v) を順次加えて総脂質を連続抽出した。抽出液を合わせた後、溶媒を減圧留去した。得られた総脂質画分を200 mlのクロロホルム/メタノール/水 (30:60:8, v/v/v) に溶解した後、DEAE-Sephadex A-25カラム (ベッド容積200 ml、酢酸型) にかけた。カラムを3 のクロロホルム/メタノール/水 (30:60:8, v/v/v) および1.5 のメタノールで連続して洗浄した後、酸性糖脂質を3 の0.05 M酢酸アンモニウム/メタノール (モノシアロガングリオシド画分)、3 の0.15 M酢酸アンモニウム/メタノール (ジシアロガングリオシド画分) および3 の0.45 M酢酸アンモニウム/メタノール (ポリシアロガングリオシド画分) で連続して溶出した [15]。得られた各溶出画分を濃縮、透析後、乾燥した。モノシアロガングリオシド画分についてはアセチル化を行ない、Saitoらの方法に基づいてフロリジルカラム (ベッド容積100 ml) を通すことによりリン脂質その他の挟雑物を除いた [16]。モノシアロガングリオシド画分およびジシアロガングリオシド画分をそれぞれクロロホルム/メタノール/水 (50:47:3, v/v/v)、(55:45:2, v/v/v) に溶解した後、同じ溶媒で平衡化したイアトロビー



ズカラム (2.0 cm x 22 cm) にかけた。モノシアロガングリオシド画分はクロロホルム/メタノール/水 (50:47:3, v/v/v) から (30:67:3, v/v/v) への直線濃度勾配系 (総溶出液量500 ml, 2 ml/試験管に分取) により各成分を溶出した。ジシアロガングリオシド画分についてはクロロホルム/メタノール/水 (55:45:2, v/v/v) から (10:90:2, v/v/v) への直線濃度勾配系 (総溶出液量500 ml, 2 ml/試験管に分取) により各成分を溶出した。分取した各試験管より一定量をHPTLCにスポットし、溶出パターンをモニターした。モノシアロガングリオシド画分から得られた各酸性糖脂質はさらにRadial-PAK<sup>TM</sup>カートリッジカラム (8NVS1, 4  $\mu$ m, 8 mm x 10 cm, Waters, Massachusetts, U.S.A.) を装着したHPLC (TRI ROTAR-VI HPLC System、日本分光工業株式会社、東京) を使用して、クロロホルム/メタノール/0.5 M酢酸ナトリウム (50:45:5, v/v/v) の溶媒系で精製を行なった。

#### 1-4. 薄層クロマトグラフィー (TLC) による糖脂質の分析

TLCの展開溶媒系にはクロロホルム/メタノール/0.5 %CaCl<sub>2</sub> (55:45:10, v/v/v) を用いた。糖脂質の検出はオルシノール-硫酸試薬で行なった [17]。TLC上での糖脂質の定量は、TLCデンシトメーター (CS-9000、島津製作所、京都) を使用してAndoらの方法にしたがって行なった [18]。

#### 1-5. 糖、脂肪酸および長鎖塩基組成の分析

##### 1-5-a. 糖脂質からの糖、脂肪酸の調製およびその分析

単離した糖脂質の構成糖の分析はSweeleyらの方法 [19] に基づいてGLC(Gas-Liquid Chromatography)を、脂肪酸の分析はNoharaらの方法

[20] に基づいてGLCおよびGC-MS(Gas Chromatography-Mass Spectrometry)を利用して行なった。

50  $\mu\text{g}$ の単離した糖脂質を0.5 N HCl/メタノール中で80℃で18時間メタノリシスした。メチル化脂肪酸をn-ヘキサンで抽出した後、メタノール層を窒素気流下で蒸発乾固させた。乾固物に0.5 mlのメタノール/無水酢酸(3:1, v/v)を加えて溶解させ、適当量の炭酸銀を加えた後、80℃で1時間加温した。炭酸銀をろ過により除き、ろ液を窒素気流下で蒸発乾固させた後、減圧下で無水酢酸を完全に除いた。これに15  $\mu\text{l}$ のTMS化試薬(TRI-SIL Z, PIERCE, IL, U.S.A.)を加え、超音波処理した後、40℃で数分間加温した。TMS化糖の分析は、2% OV-101 Chromosorb WAW カラム(2.5 mm x 1.5 m)を装着したGC-7Aガスクロマトグラフィー(島津製作所)を用いて150℃から270℃まで昇温(3℃/min)をかけて行なった。メチル化脂肪酸の分析については、n-ヘキサン層を窒素気流下で蒸発乾固させた後、少量のクロロホルムに溶解してCBP-1キャピラリーカラム(0.53 mm x 25 m, 島津製作所)を装着したJMS HX-110(日本電子、東京)を用いて150℃から250℃まで昇温(2℃/min)をかけて行なった。質量分析計は、イオン加速電圧10 kV、イオン化電流100  $\mu\text{A}$ および電子エネルギー70eVで作動させた。

#### 1-5-b. 糖脂質からの長鎖塩基の調製およびその分析

長鎖塩基の分析は、GC-MSを利用して行なった。

単離した糖脂質からの長鎖塩基の調製は、Sweeleyらの方法に従って行なった[21]。TMS化長鎖塩基の分析は、DB-5キャピラリーカラム(0.25



mm x 30 m, J & W Scientific, CA, U.S.A.) を装着したTSQ 70 (Finnigan MAT) を用いて60℃から250℃までの昇温 (30℃/min)、その後300℃までの昇温 (5℃/min) をかけて行なった。質量分析計はエミッション電流200  $\mu$ Aおよび電子エネルギー70eVで作動させた。長鎖塩基の同定は、Karlssonらによって報告された結果 [22] を参考にして行なった。

#### 1-6. メチル化分析による単糖間の結合位の解析

単離した糖脂質200  $\mu$ gに0.2 mlの無水ジメチルスルホキシド (DMSO) を加えて室温で30分搅拌した後、0.2 mlのメチルスルフィニルカルバニオン (6.6 mlのDMSOに0.66 gの水素化カリウムを窒素気流中、室温で30分間反応させて得た。) を加え室温で2時間搅拌した。続いて氷冷下、0.3 mlの無水ヨウ化メチルをすばやく加えた後、遮光して室温で1時間搅拌した。2 mlのクロロホルムと同量の水を加えてよく搅拌した。低速遠心して水層を除き、クロロホルム層を数回水で洗浄した。窒素気流下で蒸発乾固した後、生成した完全メチル化糖脂質を調製用TLCにより精製した。完全メチル化糖脂質からの部分メチル化アルジトールアセテートの調製は、Yangらの方法にしたがって行なった [23]。中性糖由来の部分メチル化アルジトールアセテートの分析は、2 % OV-225カラム (2.5 mm x 1.5 m) を用いて160℃から240℃まで昇温 (4℃/min) をかけて行なった。アミノ糖由来の部分メチル化アルジトールアセテートの分析は、2 % OV-101カラム (2.5 mm x 1.0 m) を用いて170℃の定温で行なった。分析装置はGC-MS (QP-1000、島津製作所) を使用し、ピークの同定は、ウシ脳由来GM1aガングリオシドから調製した部分メチル化アルジトールアセテ



トおよびBjörndalら [24]、Taiら [25] により報告された結果を参考に  
して行なった。

#### 1-7. 糖脂質の酵素分解

##### 1-7-a. ノイラミニダーゼ (*Arthrobacter ureafaciens* 由来) による分解

単離した糖脂質 3 nmol に対して 0.1 Unit の酵素を加えて、150  $\mu$ g のタウロ  
デオキシコール酸ナトリウムを含んだ 0.01 M リン酸バッファー (pH 7.3)  
中で 37℃、16 時間反応させた (反応液量 120  $\mu$ l)。反応終了後、逆相カラ  
ムで脱シアル化糖脂質を精製して TLC による分析を行なった (1-7-b に  
についても同様にして分析を行なった)。

なお、連続して  $\beta$ -N-アセチルヘキソサミニダーゼによる分解を行なう場  
合には、単離した糖脂質 30 nmol に対して 0.45 Unit の酵素を加えて、タウ  
ロデオキシコール酸ナトリウムを入れずに 37℃、18 時間反応させた (反  
応液量 450  $\mu$ l)。

##### 1-7-b. $\beta$ -N-アセチルヘキソサミニダーゼ (jack bean 由来) による分解

単離した糖脂質 5 nmol に対して 1.0 Unit の酵素を加えて、225  $\mu$ g のタウロ  
デオキシコール酸ナトリウムを含んだ 0.05 M クエン酸バッファー (pH  
5.0) 中で 37℃、44 時間反応させた (反応液量 130  $\mu$ l)。

#### 1-8. 酵素免疫測定法 (TLC-イムノステイニング) による糖脂質の基本構造の推定

TLC-イムノステイニングは、Magnani [26] ら、Higashi ら [27] の方法  
に若干の変更を加えて行なった。

糖脂質をプラスチックTLCプレート (POLYGRAM SIL G) にスポットした後、クロロホルム/メタノール/0.5 %CaCl<sub>2</sub> (55:45:10, v/v/v) で展開した。TLCプレートを風乾した後、抗体のプレートへの非特異的吸着を防ぐためにA溶液<sup>注1</sup>中に室温で1時間浸した。続いてB溶液<sup>注2</sup>で200倍に希釈した1次抗体 (ウサギ抗アシアロGM1抗血清あるいはマウス抗GM2モノクローナル抗体, YHD-06) の液中で室温にて2時間振とうした。プレートを0.1 %Tween 20/PBSで数回洗浄した後、B溶液で適当に希釈した2次抗体 (抗ウサギイムノグロブリンは200倍、抗マウスイムノグロブリンは500倍) の液中で室温にて2時間振とうした。最後にPBSで数回洗浄した後、発色試薬<sup>注3</sup>を加えて染色した。

注1: PBS (150 mM 塩化ナトリウム含有10 mMリン酸バッファー (pH 7.4) ) に1 %ウシ血清アルブミンおよび1 %ポリビニールピロリドン<sup>注3</sup>を溶解した液。

注2: PBSに3 %ポリビニールピロリドン<sup>注3</sup>を溶解した液。

注3: 200 mM塩化ナトリウム含有50 mMトリスバッファー (pH 7.4) に0.6 mg/ml 4-クロロ-1-ナフトールおよび0.01 %過酸化水素を溶解した液。

#### 1-9. 高速原子衝撃質量分析法 (Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry; FAB-MS) による糖脂質の構造解析

糖脂質のFAB-MSはJMS-DX304質量分析計およびJMA-DA5000データシステム (日本電子) を用いて行なった。糖脂質をターゲット上でマトリックスであるトリエタノールアミンとよく混合した後、イオン加速電圧3.0 kV、キセノンビーム6.0 keVで測定した。糖脂質の非還元末端側からの配

列の決定は、Eggeらによって報告された結果 [28] を参照した。



## 2. 結果

### 2-1. 酸性糖脂質のHPTLCパターン

アフリカツメガエル卵母細胞より分離した各々の糖脂質をHPTLCにより分析した(図1)。10種類の酸性糖脂質が検出され、Rf値の大きいものから順にA-1からA-10とした。酸性糖脂質中の最大成分であるA-1(図1、レーン4)はFAB-MS分析により硫酸化糖脂質であるスルファチドと決定した。ガングリオシドの最大成分であるA-6はTLC上でGD3ガングリオシドとほぼ同じRf値を示した(図1、レーン7)。

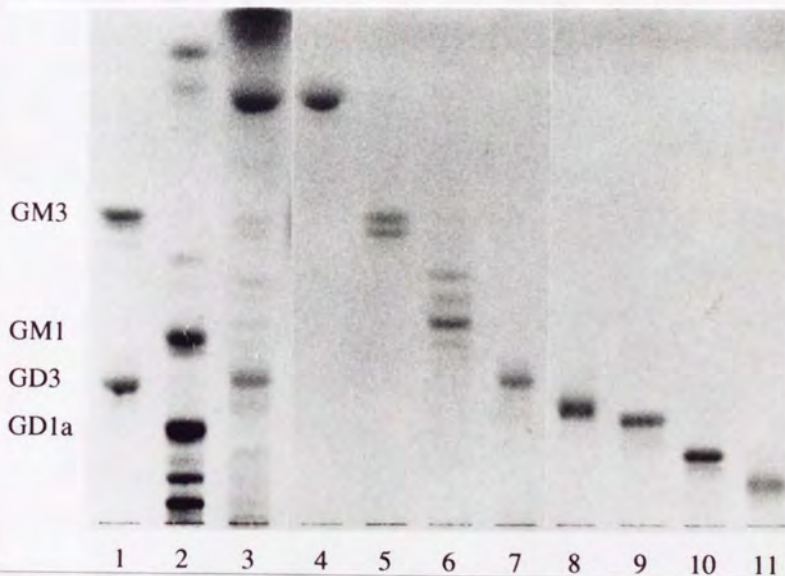


図1. アフリカツメガエル卵母細胞から分離した酸性糖脂質のHPTLCパターン

1: GM3, GD3、2: ウシ脳総ガングリオシド画分、3: 卵母細胞酸性糖脂質画分、4: A-1、5: A-2、6: A-3, A-4, A-5、7: A-6 (GalNAc-GM1b)、8: A-7、9: A-8、10: A-9、11: A-10 展開溶媒: クロロホルム/メタノール/0.5% CaCl<sub>2</sub> (55:45:10, v/v/v) オルシノール-硫酸発色

## 2-2. A-6ガングリオシドの糖組成の分析

A-6ガングリオシドの構成糖の分析結果を表1に示した。これよりA-6ガングリオシドは、グルコース、ガラクトース、N-アセチルガラクトサミンおよびN-アセチルノイラミン酸を1:2:2:1の割合で持つということが明らかになった。

表1. A-6ガングリオシドの糖組成

構成糖	モル比
グルコース	1.00
ガラクトース	2.00
N-アセチルガラクトサミン	2.06
N-アセチルノイラミン酸	1.07

数値はグルコースに対するモル比で示した。

## 2-3. A-6ガングリオシドのメチル化分析による単糖間の結合様式の解析

A-6ガングリオシドのメチル化

分析による結果を表2に示した。

A-6ガングリオシドから得られた

部分メチル化アルジトール

アセテートは、1,4,5-トリ-O-

アセチル-2,3,6-トリ-O-メチル

グルシトール、1,3,5-トリ-O-

アセチル-4,6-ジ-O-メチル-2-N-

メチルアセチルガラクトサミニトール、1,5-ジ-O-アセチル-3,4,6-トリ-

表2. A-6ガングリオシドのメチル化分析

アルジトール アセテート	メチル基の 結合位
グルシトール	2,3,6
ガラクトチトール	2,3,6
	2,6
N-アセチル ガラクトサミニトール	2,3,4,6
	2,4,6

O-メチル-2-N-メチルアセチルガラクトサミニトール、1,3,4,5,-テトラ-O-アセチル-2,6-ジ-O-メチルガラクトチトールおよび1,4,5,-トリ-O-アセチル-2,3,6-トリ-O-メチルガラクトチトールであると同定された。1,5,-ジ-O-アセチル-3,4,6-トリ-O-メチル-2-N-メチルアセチルガラクトサミニトールが検出されたことから、A-6ガングリオシドの非還元末端の糖はN-アセチルガラクトサミンであることが明らかとなった。さらに1,3,4,5,-テトラ-O-アセチル-2,6-ジ-O-メチルガラクトチトールが検出されたことから、A-6ガングリオシドの糖部分の構造は直鎖ではなく、その分子中に2個含まれているうちの一方のガラクトースの所で分枝していると推定された。

#### 2-4. A-6ガングリオシドのセラミド組成の分析

糖脂質のセラミド部

分は脂肪酸とスフィ

ングシンと呼ばれる

長鎖塩基で構成され

ている。表3にA-6ガ

ングリオシドの脂肪

酸組成を示した。主

な脂肪酸の分子種は

16:0、h22:0、

h24:0およびh24:1

であり、全脂肪酸量

のおよそ50%が $\alpha$ -

表3. A-6ガングリオシドの脂肪酸組成

脂肪酸 <sup>a</sup>	%	脂肪酸 <sup>a</sup>	%
14:0	2.0	22:0	4.8
16:0	11.0	h22:0	14.1
16:1	2.4	23:0	2.4
18:0	4.9	h23:0	2.5
18:1	3.3	24:0	5.6
20:0	3.4	h24:0	15.2
		24:1	9.3
		h24:1	19.2

<sup>a</sup> 最初の数字と後の数字はそれぞれ炭素数と二重結合の数を示している。hは $\alpha$ -ヒドロキシ脂肪酸を示している。

ヒドロキシ脂肪酸であるという特徴を有していた。長鎖塩基については、



GC-MSによりd18:1スフィンゴシンとフィトスフィンゴシン (t18:0スフィンゴシン) の2種類が同定された。

## 2-5. A-6ガングリオシドの基本骨格のTLC-イムノステイニングによる決定

A-6ガングリオシドの基本構造を決めるために、その酵素分解産物に対して抗アジアロGM1抗体を使ってTLC-イムノステイニングを行なった(図2)。A-6ガングリオシドのノイラミニダーゼによる分解産物はHPTLC上でアシ

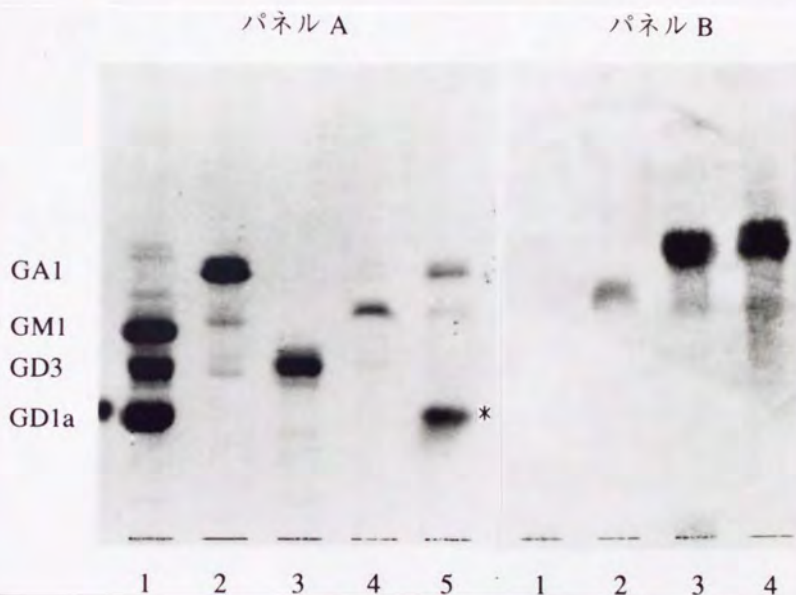


図2. A-6ガングリオシド酵素分解産物のTLC-イムノステイニング  
 パネルA; オルシノール-硫酸発色、1: GM1, GD3, GD1a、2: ア  
 シアロGM1、3: A-6ガングリオシド、4: ノイラミニダーゼ  
 (*A. ureafaciens*)分解産物、5:  $\beta$ -N-アセチルヘキソサミニダーゼ  
 (jack bean)分解産物、パネルB; 抗アジアロGM1抗体によるイムノ  
 ステイニング、1: A-6ガングリオシド、2: ノイラミニダーゼ分解  
 産物、3:  $\beta$ -N-アセチルヘキソサミニダーゼ分解産物、4:  
 アシアロGM1、\*: タウロデオキシコール酸ナトリウム

アロGM1とGM1ガングリオシドの間に展開された（パネルA、レーン4）。さらにこれを $\beta$ -N-アセチルヘキソサミニダーゼにより分解した産物は、アシアロGM1と同じ位置に展開された（パネルA、レーン5）。これら2つの分解産物のTLC-イムノステイニングでは、前者は弱くそして後者は強く染色された（パネルB、レーン2、3）。以上のことからA-6ガングリオシドは基本骨格として、Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\beta$ 1-4Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-1ceramideを持つことが明らかとなった。

## 2-6. A-6ガングリオシドの非還元末端の糖鎖構造のTLC-イムノステイニングによる決定

A-6ガングリオシドに対して抗GM2モノクローナル抗体、YHD-06を用いてTLC-イムノステイニングを行なった。YHD-06抗体はGalNAc $\beta$ 1-4 (NeuAc $\alpha$ 2-3)Gal $\beta$ 1-RおよびGalNAc $\beta$ 1-4(NeuGc $\alpha$ 2-3)Gal $\beta$ 1-RというGM2ガングリオシドの非還元末端の糖鎖構造にのみ特異的に反応する抗体である [14]。図3からも明らかなようにA-6ガングリオシドはこの抗体によって強く染色された。このことからA-6ガングリオシドはGalNAc $\beta$ 1-4(NeuAc $\alpha$ 2-3)Gal $\beta$ 1-Rという糖鎖構造を非還元末端に持つことがわかった。



図3. 抗GM2抗体によるイムノステイニング レーン1: GM2、2: A-6

## 2-7. A-6ガングリオシドのFAB-MSによる構造解析

図4にA-6ガングリオシドの(−)イオンFAB-MSのスペクトルを示した。フラグメントイオンとして検出された質量数662、824、986および1189はHexNAc-Hex-Hex-ceramideの構造に対応していた。さらに質量数673、876および1036はそれぞれHexNAc-Hex(NeuAc)-、HexNAc-Hex(NeuAc)-HexNAc-およびHexNAc-Hex(NeuAc)-HexNAc-Hex-という非還元末端の糖鎖構造に対応していることがわかった。以上からA-6ガングリオシドはHexNAc-Hex(NeuAc)-HexNAc-Hex-Hex-ceramideという構造を持つことが明らかになった。分子イオンを示す質量数として主として1845と1863が検出された。これはそれぞれ脂肪酸と長鎖塩基の組み合わせとしてh24:1/d18:1スフィンゴシンおよびh24:1/フィトスフィンゴシンからなるセラミドを持つ2つの分子種が主に対応していた。

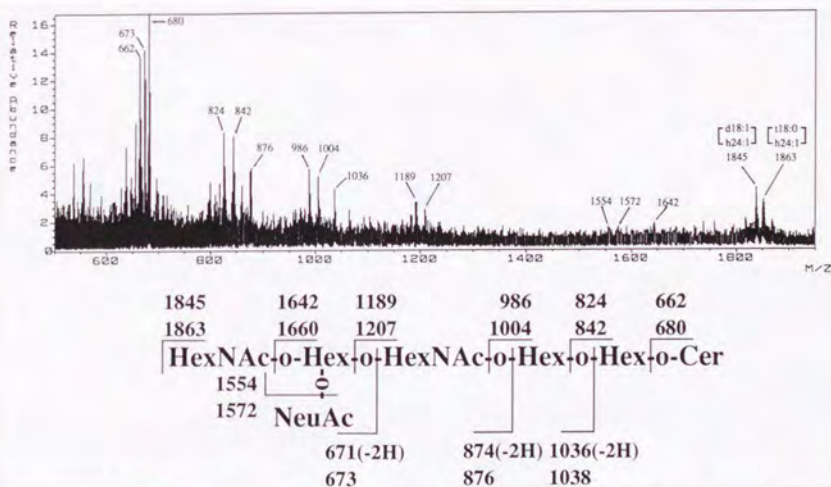


図4. A-6ガングリオシドの(−)イオンFAB-MSスペクトル

主な分子イオン：質量数1845および1863



## 2-8. A-6ガングリオシドの構造

最終的に完全決定されたA-6ガングリオシドの構造式を図5に示した。

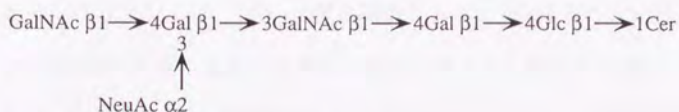


図5. A-6ガングリオシドの構造式

セラミド；長鎖塩基：d18:1スフィンゴシン、フィトスフィンゴシン

主な脂肪酸：16:0, h22:0, h24:0, h24:1

このガングリオシドは基本骨格としてアシアロGM1と同じ糖鎖構造を持ち、末端のガラクトースにN-アセチルガラクトサミンとN-アセチルノイラミン酸がそれぞれ1分子ずつβ1-4およびα2-3結合したGalNAc-GM1b (IV<sup>4</sup>GalNAcIV<sup>3</sup>NeuAcGg<sub>4</sub>Cer) であった。またセラミド部分の構造は、長鎖塩基として主にd18:1スフィンゴシンおよびフィトスフィンゴシン、脂肪酸についてはおよそ50%がα-ヒドロキシ脂肪酸から構成されていることが明らかになった。

## 2-9. 卵母細胞中の酸性糖脂質の構造およびその存在比

表4に卵母細胞中に検出された10種類の酸性糖脂質およびその存在比を示した。最大成分は硫酸化糖脂質のスルファチドであり、全酸性糖脂質の85.7%を占めていた。ガングリオシドについては、Iwamoriらの方法[29]にしたがって行なったDEAE-Sepharose CL-6Bカラムからの溶出結果より、6種類のモノシアロガングリオシドおよび3種類のジシアロガングリオシドが検出された(図6)。しかし、シアル酸を分子内に3個以上持つポリシ

アロガングリオシドは検出されなかった。ガングリオシドの最大成分はGalNAc-GM1bであり、全酸性糖脂質の5.8 %を占めていた。最終的にこのガングリオシドは、160 gの卵母細胞から0.35 mg得ることが出来た。これら2種類の主要な成分のほかに、既知のガングリオシド (GM3、GM2、GM1aおよびGD1a) が検出されたがGD3ガングリオシドは検出されなかった。

表4. アフリカツメガエル卵母細胞中の  
酸性糖脂質組成

シンボル	糖脂質	モル比 (%)
A-1	スルファチド	85.7
A-2	GM3	4.1
A-3	GM2	1.1
A-4	未同定	<0.1
A-5	GM1a	0.6
A-6	GalNAc-GM1b	5.8
A-7	未同定	2.1
A-8	GD1a	<0.1
A-9	未同定	0.6
A-10	未同定	<0.1

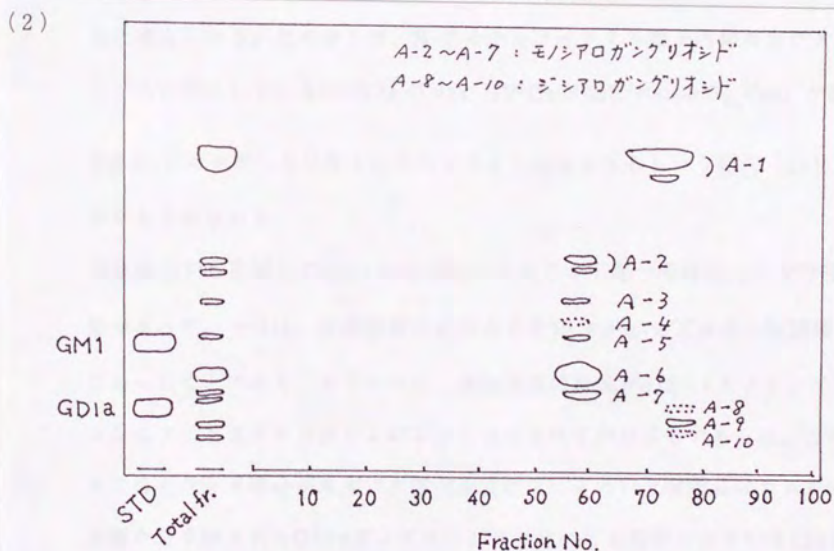
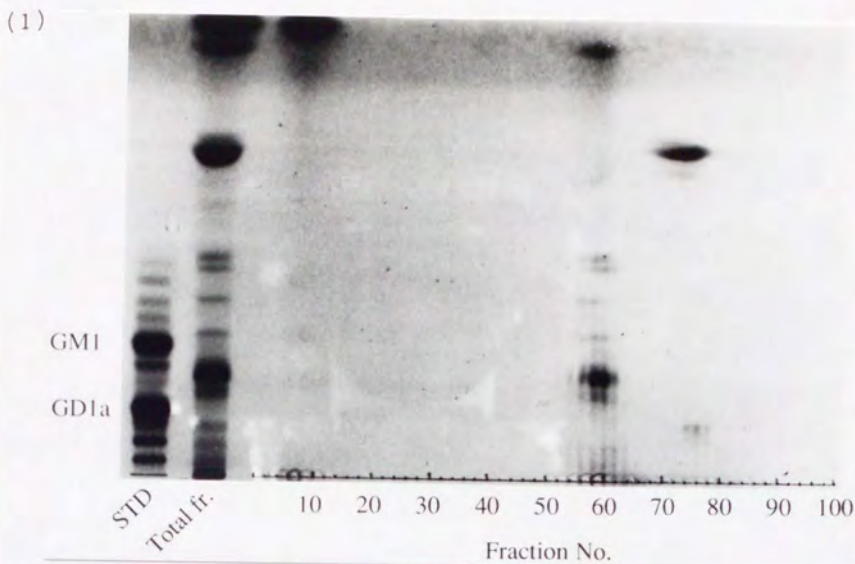


図6. DEAE-Sepharose CL-6Bカラムからの酸性糖脂質の溶出

(1) HPTLCによる溶出パターン

(2) (1) の模式図



### 3. 考察

卵母細胞中の主要なガングリオシドであることが明らかになったGalNAc-GM1bはTay-Sachs病の脳に微量に存在することが報告されている [30] が、推定構造であったことから今回が初めての完全な構造式の報告となった [31]。今回単離したGalNAc-GM1bはjack bean 由来の $\beta$ -N-アセチルヘキソサミニダーゼにより全く水解されなかった。この現象はTay-Sachs病の脳に存在していたGalNAc-GM1bにも認められている [30]。しかし *Arthrobacter ureafaciens* 由来のノイラミニダーゼでシアル酸をはずした分解産物は $\beta$ -N-アセチルヘキソサミニダーゼにより水解された。これは非還元末端側のガラクトースに結合しているN-アセチルノイラミン酸が末端N-アセチルヘキソサミンの酵素による水解を立体的に障害しているものと考えられる。この考えは、N-アセチルノイラミン酸が内側のガラクトースに結合しているGalNAc-GM1a ( $\text{IV}^4\text{GalNAcII}^3\text{NeuAcGg}_4\text{Cer}$ ) が直接 $\beta$ -N-アセチルヘキソサミニダーゼにより水解されるという報告 [32] からも支持される。

卵母細胞から単離したGalNAc-GM1bにはセラミド部分の構造に二つの特徴があった。一つは、全脂肪酸含量のおよそ50%が $\alpha$ -ヒドロキシ脂肪酸であったことであり、もう一つは、長鎖塩基の組成がd18:1スフィンゴシンとフィトスフィンゴシンによって占められていたことであった。このようにセラミド部分が高度に水酸化を受けているという糖脂質はカエルの肝臓から単離されたGD1aガングリオシドについても報告されている [20]。卵母細胞中の糖脂質の分析は未だ行なわれたことがなく、今回得られた結果は、今後発生、分化などにおける複合糖質糖鎖の発現制御および発現さ



## 第2章 アフリカツメガエル卵母細胞に内在する糖脂質糖鎖の 生合成経路の解析

### 1. 実験方法

#### 1-1. 動物

アフリカツメガエル(*Xenopus laevis*) (体重30-40 g、メス) は日本生物材料センター株式会社 (東京) より購入した。

#### 1-2. 試薬

糖転移酵素活性測定用の基質として、ラクトシルセラミド (株式会社ヤトロン、東京)、アジアロGM2 (株式会社ホーネンコーポレーション、東京)、アジアロGM1 (和光純薬工業株式会社、大阪)、GM2 (BioCarb Chemicals, Sweden)、GM1a (株式会社ヤトロン)、GM3 (イヌ赤血球膜より精製)、GalNAc-GA1 (アフリカツメガエル卵母細胞より精製)、GM1b (ラット肝ゴルジ画分シアル酸転移酵素によりアジアロGM1にシアル酸を付加して合成) を用いた。糖供与体として、CMP-NeuAc (メクト株式会社、東京)、UDP-Gal, UDP-GalNAc (いずれもSIGMA CHEMICAL CO., U.S.A.)、CMP-[<sup>3</sup>H]-NeuAc, UDP-[<sup>3</sup>H]-Gal, UDP-[<sup>3</sup>H]-GalNAc (いずれもBIOTECHNOLOGY SYSTEMS, NEN Research Products, U.S.A.) を用いた。酵素反応生成物の同定には、シリカゲル薄層プレート (HPTLC, silica gel 60, E. Merck Co., Darmstadt, Germany) およびポリグラムシリカゲルプレート (MACHEREY-NAGEL, Germany)



を使用した。オートラジオグラフィーには、Diagnostic Film (X-OMAT<sup>TM</sup> AR) (EASTMAN KODAK COMPANY, U.S.A.) を用いた。その他の試薬は市販の特級のものをを使用した。

### 1-3. 卵母細胞からの酵素原液の調製

ホルモン処理を行っていないメスのアフリカツメガエルの卵巣から未成熟な卵母細胞を分離した。得られた卵母細胞8.0 gに72 mlのホモジナイズバッファー (0.25M Sucrose, 3mM Tris/HCl pH7.4, 0.1mM EDTA) を加えて、Potter-Elvehjem homogenizerを用いてホモジナイズした。これを5,000 x g (日立RPR-20-2ローター、6400 rpm) で10分間遠心した。上清をさらに200,000 x g (Beckman 60Tiローター、45000 rpm) で1時間遠心した。上清を除いた後、ペレットに0.4 mlのバッファーA (150mM Cacodylate/HCl pH6.5, 1mM 2-mercaptoethanol) を加えて十分に懸濁し、これを酵素原液とした。

### 1-4. シアル酸転移酵素の活性測定およびその諸性質の解析

シアル酸転移酵素の活性測定はPohlenzらの測定条件 [33] に若干の変更を加えて行なった。

#### 1-4-a. 最適タンパク質濃度の検討

1-3で調製した酵素原液をバッファーA (pH 6.5) で適当な濃度に希釈して反応液中の最終濃度が1.4-14 mg/mlになるように調製した。酵素反応は、150 mM Cacodylate/HCl (pH6.5) バッファー中、10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MnCl<sub>2</sub>, 1 mM 2-mercaptoethanol、0.4 % Triton CF-54存在下、基質に3.2 mM CMP-[<sup>3</sup>H]-NeuAc (4.2μCi/μmol) および0.3

mM アシアロGM1を用いて全反応液量50  $\mu$ lとして 37℃, 2時間行なった (濃度はすべて最終濃度を示した)。

#### 1-4-b. 最適反応時間の検討

1-3で調製した酵素原液をバッファーA (pH 6.5) で5倍に希釈して反応液中の最終濃度が5.6 mg/mlになるように調製した。反応時間は30-120分で行なった。その他の条件は、1-4-aと同じで行なった。

#### 1-4-c. 最適pHの検討

1-3で調製した酵素原液をpHの異なる各バッファーA (pH5.5-7.0) で5倍に希釈して反応液中の最終濃度が5.6 mg/mlになるように調製した。酵素反応は、150 mM Cacodylate/HCl (pH5.5-7.0)の各バッファー中で基質に0.3 mM アシアロGM1 あるいはCDHを用いて行なった。その他の条件は、1-4-aと同じで行なった。

#### 1-4-d. 金属イオン要求性の検討

1-3で調製した酵素原液をバッファーA (pH 6.5) で5倍に希釈して反応液中の最終濃度が5.6 mg/mlになるように調製した。酵素反応は、150 mM Cacodylate/HCl (pH6.5)中で10 mM の各種金属塩化物 ( $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ) あるいは同濃度のEDTA存在下、基質に0.3 mM アシアロGM1 あるいはCDHを用いて行なった。その他の条件は、1-4-aと同じで行なった。

#### 1-4-e. 界面活性剤の種類およびその濃度の検討

1-3で調製した酵素原液をバッファーA (pH 6.5) で5倍に希釈して反応液中の最終濃度が5.6 mg/mlになるように調製した。酵素反応は、150 mM Cacodylate/HCl (pH 6.5) 中で0-1.2 % の各種界面活性剤 (Triton X-100, Triton CF-54, Tween 80, Sodium taurodeoxycholate, Sodium dodecyl sulfate) 存在下、基質に0.3 mM アシアロGM1 あるいはCDHを用いて行なった。その他の条件は、1-4-aと同じで行なった。

#### 1-4-f. 反応速度論的解析

1-3で調製した酵素原液をバッファーA (pH 6.5) で5倍に希釈して反応液中の最終濃度が5.6 mg/mlになるように調製した。酵素反応は、150 mM Cacodylate/HCl (pH 6.5) 中で0.2 % Triton CF-54存在下、基質として0.03-0.3 mM の各濃度のアシアロGM1 および0.32-3.2 mM の各濃度のCMP- $^3\text{H}$ -NeuAc (4.2  $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$ )を用いて行なった。その他の条件は、1-4-aと同じで行なった。

#### 1-4-g. シアル酸転移酵素の活性測定

1-3で調製した酵素原液をバッファーA (pH 6.5) で5倍に希釈して反応液中の最終濃度が5.6 mg/mlになるように調製した。酵素反応は、150 mM Cacodylate/HCl (pH 6.5) 中で0.2 % Triton CF-54存在下、0.3 mMの各種基質 (アシアロGM1, CDH, GM3, GalNAc-GA1) を用いて行なった。その他の条件は、1-4-aと同じで行なった。



#### 1-5. N-アセチルガラクトサミン転移酵素の活性測定

N-アセチルガラクトサミン転移酵素の活性測定はSennらの測定条件[34]に若干の変更を加えて行なった。

1-3で調製した酵素原液をバッファーB (64 mM Cacodylate/HCl pH 7.0, 5 mM CDP-Choline) で4-5倍に希釈して反応液中の最終濃度が5.6 mg/mlになるように調製した。酵素反応は、64 mM Cacodylate/HCl (pH7.0)バッファー中、10 mM MnCl<sub>2</sub>、5 mM CDP-Choline、0.5 % Triton X-100存在下、基質に0.1 mM UDP-[<sup>3</sup>H]-GalNAc (60  $\mu$ Ci/ $\mu$ mol)および0.3 mMの各種基質 (アシアロGM1, CDH, GM3, GM1a) を用いて全反応液量50  $\mu$ lとして37℃, 2時間行なった (濃度はすべて最終濃度を示した)。

#### 1-6. ガラクトース転移酵素の活性測定

ガラクトース転移酵素の活性測定はWilkinsonらの測定条件 [35] に若干の変更を加えて行なった。

1-3で調製した酵素原液をバッファーC (150 mM Cacodylate/HCl pH 6.0) で4-5倍に希釈して反応液中の最終濃度が5.6 mg/mlになるように調製した。酵素反応は、150 mM Cacodylate/HCl (pH6.0)バッファー中、10 mM MnCl<sub>2</sub>、0.5 % Triton X-100存在下、基質に0.5 mM UDP-[<sup>3</sup>H]-Gal (5  $\mu$ Ci/ $\mu$ mol)および0.5 mMの各種基質 (アシアロGM2, GM2) を用いて全反応液量50  $\mu$ lとして37℃, 2時間行なった (濃度はすべて最終濃度を示した)。

#### 1-7. 反応生成物の定量と同定

反応時間終了後、反応液50  $\mu$ lに蒸留水450  $\mu$ lを加えて反応を止めた。この溶液をあらかじめ蒸留水3 ml、メタノール3 mlで活性化しておいたC18カラム (BOND ELUT, Size 3 ml, Varian Sample Preparation Products, U.S.A.) にアプライした。カラムを蒸留水30 mlで洗浄した後、クロロホルム/メタノール (2:1, v/v) 2 mlで生成物を溶出した。酵素活性の定量は、溶出液を蒸発乾固した後、シンチレーター (シンチゾール EX-H、株式会社同仁化学研究所、熊本) 2 mlを加えて液体シンチレーションカウンターを使用して行なった。生成物の同定は、溶出液を蒸発乾固、HPTLC上にスポットし、展開、風乾後、X線フィルムに感光させることおよびTLC-イムノステイニングにより行なった。

## 2. 結果

### 2-1. アフリカツメガエル卵母細胞中のシアル酸転移酵素の諸性質の解析

#### 2-1-a. 最適タンパク質量の検討

アッセイチューブ中の酵素タンパク質濃度を变化させた時にシアル酸転移酵素活性がどのように変動するかを図1に示した。基質に0.3 mMのアシアロGM1を用いた場合、タンパク質濃度としておよそ6.0 mg/mlまで活性はほぼ直線的に増加した。この結果より、これより後の実験は5.0-6.0 mg/mlの酵素蛋白質濃度で行なうこととした。

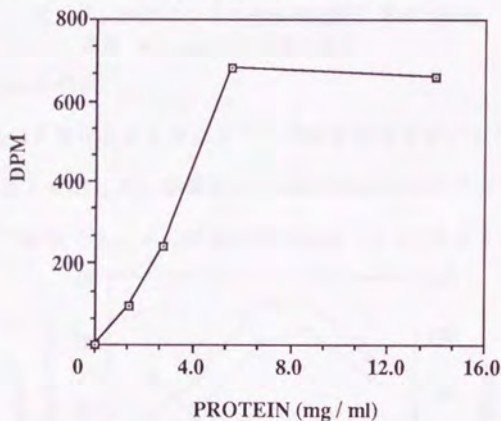


図1. 酵素タンパク質濃度のシアル酸転移酵素に及ぼす影響  
基質：0.3 mMアシアロGM1

#### 2-1-b. 最適反応時間の検討

酵素反応時間を変化させた時にシアル酸転移酵素活性がどのように変動するかを図2に示した。基質に0.3 mMのアシアロGM1を用いた場合、120分まで活性は上昇した。この結果より、これより後の実験は酵素反応を120分間行なうこととした。



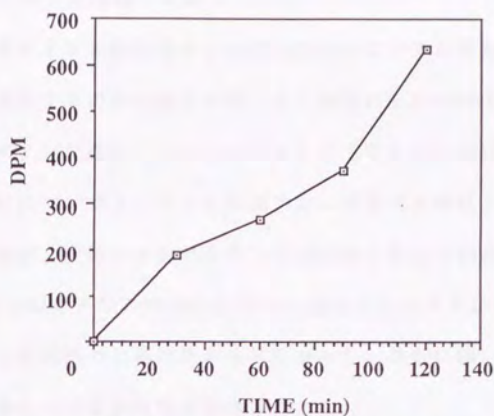


図2.反応時間のシアル酸転移酵素に及ぼす影響  
基質: 0.3 mM アシアロ GM 1

#### 2-1-c. 最適pHの検討

緩衝液のpHを変化させた時にシアル酸転移酵素活性がどのように変動するかを図3に示した。基質に0.3 mMのCDHおよびアシアロGM1のどちらを用いた場合でも、その酵素活性はpH6.5-6.7で最大を示した。

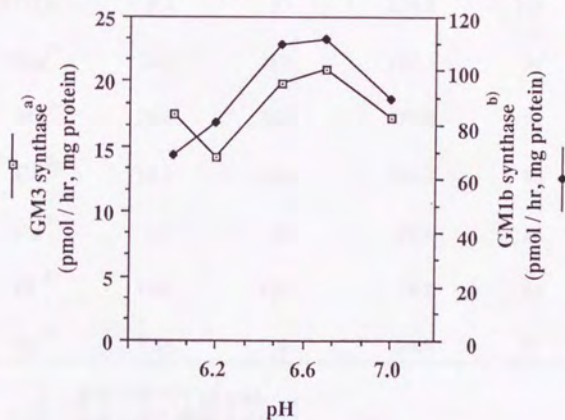


図3.シアル酸転移酵素の最適pH

a): 基質 0.3mM CDH

b): 基質 0.3mM アシアロ GM1

## 2-1-d. 金属イオン要求性の検討

種々の金属イオンを緩衝液中に添加した場合にシアル酸転移酵素活性がどのように変動するのかを表1に示した。基質に0.3 mMのCDHを用いた場合、金属イオンを添加していないコントロールに対して10 mMのマグネシウムあるいはマンガンイオンを添加すると活性は2倍以上に上昇した。また同濃度の銅、亜鉛イオンの存在下では活性は著しく阻害された。一方、基質に0.3 mMのアシアロGM1を用いた場合にはマグネシウムやマンガンイオンによる活性の上昇は認められなかった。さらに銅、亜鉛のほかに鉄イオンの存在下で酵素活性が阻害された。

表1. 金属イオンによるシアル酸転移酵素の活性化

METAL <sup>a)</sup>	GM3 synthase <sup>c)</sup>		GM1b synthase <sup>d)</sup>	
	pmol/hr, mg	%	pmol/hr, mg	%
Control <sup>b)</sup>	10.1	100	116.0	100
EDTA	9.4	93	124.8	108
Mg <sup>2+</sup>	21.5	213	109.1	94
Mn <sup>2+</sup>	24.6	243	111.8	96
Ca <sup>2+</sup>	12.1	120	114.2	98
Cu <sup>2+</sup>	3.3	32	21.1	18
Fe <sup>2+</sup>	10.3	102	74.2	64
Zn <sup>2+</sup>	N.D.	0	26.9	23

a): 濃度はすべて10 mM

b): 金属イオン濃度 0 mM

c): 基質濃度 0.3mM CDH

d): 基質濃度 0.3mM アシアロGM1

## 2-1-e. 界面活性剤の種類およびその濃度の検討

種々の界面活性剤によりシアル酸転移酵素活性がどのように変動するのかを表2に示した。どちらの基質を用いた場合においても、界面活性剤の非存在下では、活性は認められなかった。基質に0.3 mMのCDHを用いた場合、0.4%のTriton CF-54とTriton X-100では活性はほとんど変らなかった。一方、基質にアシアロGM1を用いた場合では、0.4%のTriton CF-54の活性はTriton X-100の活性のおよそ3倍であった。

どちらの基質においても活性の高かったTriton CF-54について反応液中でのその濃度を変化させて最適濃度を調べた(図4)。このグラフから0.2-0.4%の濃度で酵素活性が最大になることが明らかになった。

表2. 種々の界面活性剤によるシアル酸転移酵素の活性化

DETERGENT	GM3 synthase <sup>d</sup>		GM1b synthase <sup>e</sup>	
	pmol/hr, mg	%	pmol/hr, mg	%
Triton CF-54 <sup>a</sup>	14.3	100	113.6	100
Triton X-100 <sup>a</sup>	16.4	115	43.1	38
Tween 80 <sup>a</sup>	1.8	13	N.D.	0
TDC <sup>b,*1</sup>	N.D.	0	7.5	7
SDS <sup>b,*2</sup>	N.D.	0	5.5	5
control <sup>c</sup>	N.D.	0	N.D.	0

a: 界面活性剤濃度 0.4%

b: 界面活性剤濃度 0.01%

c: 界面活性剤濃度 0%

d: 基質濃度 0.3 mM CDH

e: 基質濃度 0.3 mM アシアロGM1

\*1, sodium taurodeoxy cholate

\*2, sodium dodesyl sulfate



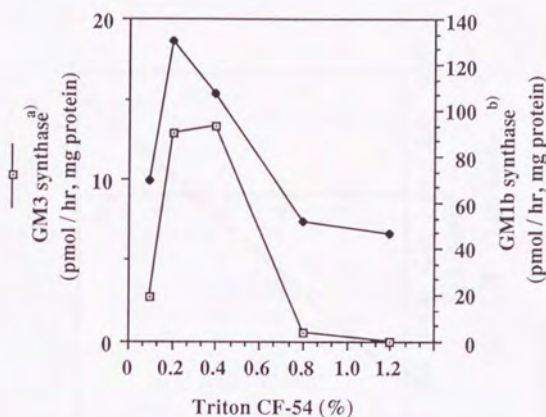


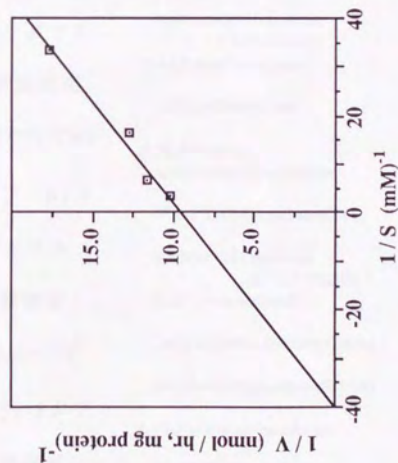
図4. Triton CF-54によるシアル酸転移酵素の活性化

a): 基質 0.3mM CDH

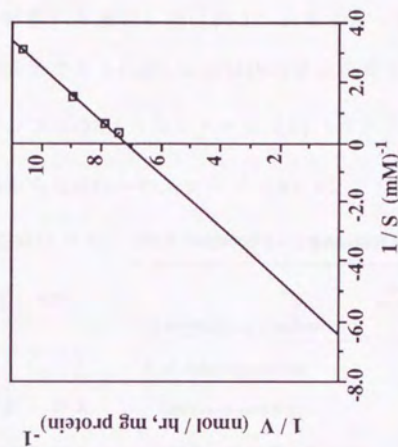
b): 基質 0.3mM アシアロGM1

#### 2-1-f. 反応速度論的解析

2-1-e.までに明らかにした最適なシアル酸転移酵素の活性発現の条件下で、アシアロGM1からGM1bを合成する $\alpha$ 2-3シアル酸転移酵素の反応速度論的解析を行なった。この酵素は糖受容体であるアシアロGM1と糖供与体であるCMP-NeuAcの2つを基質とする。そこでこの2つの基質について濃度を変えて反応を行ない、その結果を逆数プロットで示した(図5)。本酵素のアシアロGM1に対する $K_m$ 値は25.0 ( $\mu$ M)であり $V_{max}$ は105.2 (pmol/hr, mg protein)であった。一方、CMP-NeuAcに対する $K_m$ 値は157.1( $\mu$ M)であり $V_{max}$ は140.0 (pmol/hr, mg protein)であった。



(1) 基質：アシアロGM 1



(2) 基質：CMP-NeuAc

図5. シアル酸転移酵素の反応速度論的解析

## 2-2. アフリカツメガエル卵母細胞中の糖転移酵素活性の測定

アフリカツメガエル卵母細胞中の4種類の糖転移酵素活性 ( $\alpha$ 2-3,  $\alpha$ 2-8シアル酸転移酵素、 $\beta$ 1-4N-アセチルガラクトサミン転移酵素、 $\beta$ 1-3ガラクトース転移酵素) を測定した(表3)。第1章で明かにしたガングリオシド中の最大成分であるGalNAc-GM1bの合成経路と考えられるアシアロGM2からアシアロGM1へのステップ ( $\beta$ 1-3ガラクトース転移酵素)、アシアロGM1からGM1bへのステップ ( $\alpha$ 2-3シアル酸転移酵素)、GM1bからGalNAc-GM1bへの

ステップ ( $\beta$ 1-4N-アセチルガラクトサミン転移酵素) および神経系に特徴的なガングリオシドであるGM1aの合成経路であるGM3からGM2へのステップ ( $\beta$ 1-4N-アセチルガラクトサミン転移酵素)、GM2からGM1aへのステップ ( $\beta$ 1-3ガラクトース転移酵素) で酵素活性が高いことが明らかになった。

表3.卵母細胞中の種々の糖転移酵素活性

TRANSFERASE (substrate)	ACTIVITY (pmol/hr, mg protein)	
	average <sup>*</sup> ± 2 S.D.	
1. α2-3 sialyltransferase		
GM3 synthase(CDH)	30.2	4.0
GM1b synthase(アシアロGM1)	109.7	8.9
GalNAc-GM1b synthase (GalNAc-GA1 )	27.5	9.1
2. α2-8 sialyltransferase		
GD3 synthase(GM3)	15.6	3.2
3. β1-4 N-acetyl- galactosaminyltransferase		
アシアロGM2 synthase(CDH)	41.8	10.9
GalNAc-GA1 synthase (アシアロGM1)	10.1	1.9
GM2 synthase(GM3)	58.5	11.8
GalNAc-GM1a synthase(GM1a)	10.9	2.6
GalNAc-GM1b synthase(GM1b)	78.6	4.6
4. β1-3 galactosyltransferase		
アシアロGM1 synthase (アシアロGM2)	83.3	2.6
GM1a synthase(GM2)	106.2	2.7

\* : 数値は3回の測定の平均値



### 2-3. 酵素反応生成物の同定

卵母細胞中に存在する事が明らかになった2つの主要糖脂質合成経路に位置する主な糖転移酵素による各基質からの生成物をオートラジオグラフィによって同定した(図7)。パネル1から3にそれぞれアシアロGM2からアシアロGM1、GM1bを経てGalNAc-GM1bを合成する経路に位置する $\beta$ 1-3ガラクトース転移酵素、 $\alpha$ 2-3シアル酸転移酵素、 $\beta$ 1-4N-アセチルガラクトサミン転移酵素による生成物を示した。パネル1ではアシアロGM1が、パネル2ではGM1bが、パネル3ではGalNAc-GM1bがそれぞれ同定された。パネル4および5にはそれぞれGM3からGM2を経てGM1aを合成する経路に位置する $\beta$ 1-4N-アセチルガラクトサミン転移酵素、 $\beta$ 1-3ガラクトース転移酵素による生成物を示した。パネル4ではGM2が、パネル5ではGM1aがそれぞれ同定された。さらに $\alpha$ 2-3シアル酸転移酵素によってアシアロGM1から合成される生成物については、糖鎖の非還元末端構造のNeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-Rを特異的に認識して反応するM2590モノクローナル抗体[36]を用いたTLC-イムノステイニングによってGM1bである事を確認した(図8)。

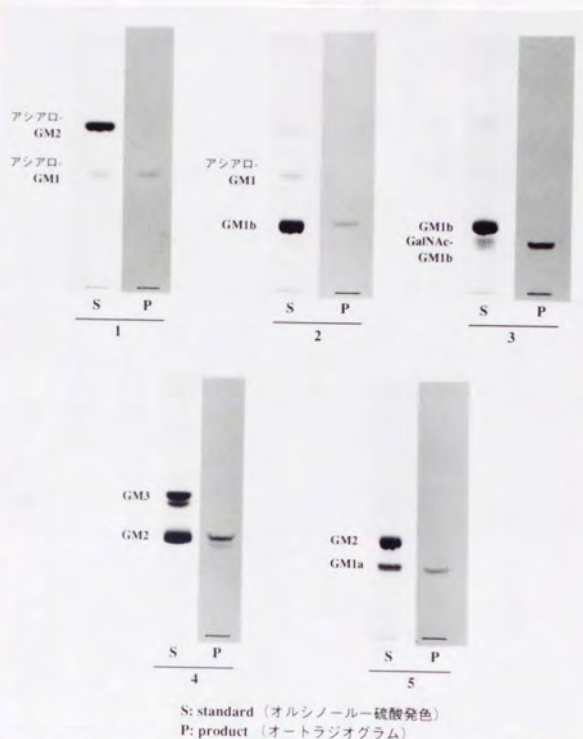


図7. オートラジオグラフィーによる酵素反応生成物の同定

- パネル1:  $\beta$ 1-3ガラクトース転移酵素 (基質, アシアロGM2)  
 パネル2:  $\alpha$ 2-3シアル酸転移酵素 (基質, アシアロGM1)  
 パネル3:  $\beta$ 1-4N-アセチルガラクトサミン転移酵素 (基質, GM1b)  
 パネル4:  $\beta$ 1-4N-アセチルガラクトサミン転移酵素 (基質, GM3)  
 パネル5:  $\beta$ 1-3ガラクトース転移酵素 (基質, GM2)

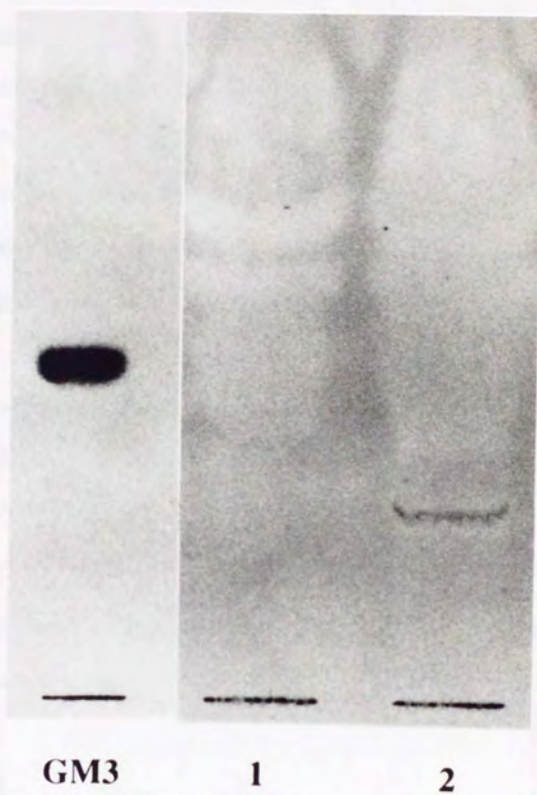


図8 .M2590抗体を用いたTLC-イムノステイニングによる  
 $\alpha$ 2-3シアル酸転移酵素反応生成物の同定

レーン1：基質なし

レーン2：基質、アシアロGM1 (0.3 mM)

TLC-イムノステイニングは第1章1-8項の方法に  
準じて行なった。



### 3. 考察

今回、アフリカツメガエル卵母細胞中の糖脂質合成に関わる糖転移酵素の諸性質および主要糖脂質合成経路を初めて明らかにした。

卵母細胞中の糖転移酵素活性は、200,000 x g超遠心後のペレットに回収されることおよび界面活性剤存在下ではじめて活性が生じることなどから今までに報告のあった種々の組織由来の糖転移酵素 [9] と同様に膜結合性であることが明らかになった。

卵母細胞中の糖転移酵素の中でも特に $\alpha$ 2-3シアル酸転移酵素についてその諸性質の解析を行なった。この酵素は基質にアシアロGM1を用いたとき、5.0-6.0mg/mlのタンパク質濃度、pH6.5-6.7のバッファー中、0.2-0.4% Triton CF-54存在下で37℃、2時間反応させたとき最大活性を示した。またこの酵素の基質であるアシアロGM1とCMP-NeuAcに対する $K_m$ 値は、それぞれ25.0  $\mu$ M、157.1  $\mu$ Mと求められた。CMP-NeuAcに対するアフィニティーは、最もよく研究をされているラット肝臓ゴルジ装置に存在する $\alpha$ 2-3シアル酸転移酵素よりも10倍以上高かったが、糖受容体である糖脂質に対するアフィニティーはほぼ同程度であった。さらに二価イオンを要求しない点、非イオン性界面活性剤でよく活性化される点、弱酸性領域に至適pHを持つ点など類似点が多く認められた [37]。これらのことは、発生学的に異なる位置にある動物種においても酵素学的に類似している糖転移酵素すなわち糖脂質合成経路を持つことを示唆するものと考えられる。図6に明らかになったアフリカツメガエル卵母細胞中の主要糖脂質合成経路を示した。卵母細胞中の主要ガングリオシドであるGalNAc-GM1bはCDHからアシアロGM2、アシアロGM1、GM1bを経て最終的に合成され

ると考えられる。この合成経路は、自然界では非常に稀なガングリオシドであるGM1bを中間体とするという点で非常にユニークなものであった。一方、アジアロGM1からGalNAc-GA1を経て最終的にGalNAc-GM1bを合成する経路の酵素活性も検出されたが、その活性は主要経路と推定される活性のそれぞれ4分の1、8分の1であったことから、この経路によるGalNAc-GM1bの合成は非常に僅かなものであると考えられる。

GD3ガングリオシドを合成する酵素 ( $\alpha$ 2-8シアル酸転移酵素) 活性が非常に弱いながらも測定された。第1章での結果から、このガングリオシドはその存在が検出されなかったが、これは微量に合成されたGD3ガングリオシドが速やかに分解あるいはさらに糖鎖が伸長されるためではないかと考えられる。

図中に(1)および(3)で示した $\alpha$ 2-3シアル酸転移酵素は金属の要求性および界面活性剤による活性化の違いなどから異なる種類の酵素であると考えられる。これら2種類の $\alpha$ 2-3シアル酸転移酵素は、ラット肝臓ゴルジ装置のシアル酸転移酵素の基質競合試験の結果から推定されているシアリルトランスフェラーゼI (SAT-I) およびシアリルトランスフェラーゼIV (SAT-IV) に相当するものと考えられる [33]。

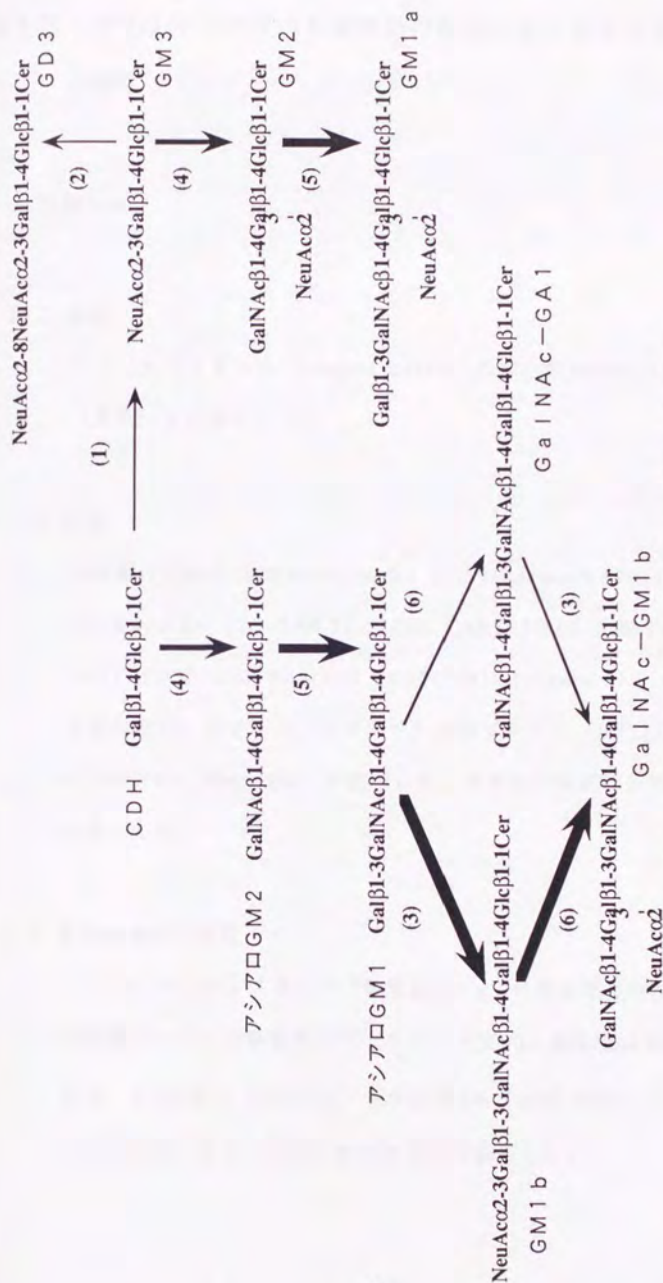


図6. アフリカツメガエル卵母細胞中の主要糖脂質の推定合成経路  
 (1)  $\alpha$ 2-3 シアル酸転移酵素 (4)  $\beta$ 1-4 N-アセチルガラクトサミン転移酵素  
 (2)  $\alpha$ 2-8 シアル酸転移酵素 (5)  $\beta$ 1-3 ガラクトース転移酵素  
 (3)  $\alpha$ 2-3 シアル酸転移酵素 (6)  $\beta$ 1-4 N-アセチルガラクトサミン転移酵素  
 太い矢印は、酵素活性が高いことを示す。



### 第3章 アフリカツメガエル受精卵の初期発生における糖脂質糖鎖の変化

#### 1. 実験方法

##### 1-1. 動物

アフリカツメガエル(*Xenopus laevis*)は日本生物材料センター株式会社(東京)より購入した。

##### 1-2. 試薬

糖脂質の分離にはDEAE-Sephadex A-25 (Pharmacia Fine Chemicals AB, Sweden)、SEP-PAK FLORISIL CARTRIDGE, SEP-PAK SILICA CARTRIDGE, SEP-PAK C18 CARTRIDGE (Waters, U.S.A.)を用いた。糖脂質の検出、同定には、シリカゲル薄層プレート (HPTLC, silica gel 60, E. Merck Co., Germany) を使用した。その他の試薬は市販の特級のものを使用した。

##### 1-3. 成熟卵細胞の採取

メスのアフリカツメガエル(体重30-40 g)の脊側尾部の皮下に胎盤性性腺刺激ホルモン(動物専用ゴナトロピン3000、帝国臓器製薬株式会社、東京)を300単位(300単位/300  $\mu$ l 0.6% NaCl)注射した。10-15時間後、カエルが産み落とした卵を成熟卵として採取した。

#### 1-4. 人工受精

採取した成熟卵（約1000-1500個／100 mmシャーレ）をドベエル生理食塩水<sup>注1</sup>（x 1/2溶液）中に浸した。

オスのツメガエルから精巢（1対）を摘出し、ドベエル生理食塩水（x 1溶液）でよく洗った後、ハサミで細かく刻んだ。これに1 mlのドベエル生理食塩水（x 1溶液）を加えてよく懸濁した。

卵の入ったシャーレからドベエル生理食塩水（x 1/2溶液）を除き、精子の懸濁液を3、4滴滴下した（この時を受精後0時間とした）。10分間室温に放置した後、シャーレに適当量のドベエル生理食塩水（x 1/2溶液）を加えて21℃で30分間培養した。受精が完了した卵は動物極側を上にして反転するのでこれを目安にして受精率を求めた。次に受精卵を2.5%チオグリコール酸ナトリウム溶液（pH 9.0）で数分間処理することによりゼリー層を除去した。チオグリコール酸ナトリウムをスタインバーグ溶液<sup>注2</sup>で洗い流した後、この溶液が入った容器（直径約300 mm）に移して21℃で培養した。

注1： 110mM NaCl

1.3mM KCl

0.44mM CaCl<sub>2</sub>    NaHCO<sub>3</sub>でpH 7.2に調整 ---- (x1溶液)

(x1/2溶液) は (x1溶液) をH<sub>2</sub>Oで2倍に希釈した溶液

注2： 3mM Hepes/NaOH buffer (pH 7.2)

3.4g NaCl, 0.05g KCl, 0.08g Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0.205g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O

#### 1-5. 各発生段階での受精卵のサンプリング

受精後、1.5時間（ステージ2；2細胞期）、3.5時間（ステージ6 1/2；桑実胚期）、6.5時間（ステージ8 1/2；胞胚期）にそれぞれ卵を300-400個サンプリングした。

注：各発生段階のステージは、文献[38]を参考にした。

#### 1-6. 糖脂質の抽出、分離

成熟卵および各発生段階で得られた卵を凍結乾燥した。乾燥重量としておよそ0.3-0.4gの卵に対して10倍量のアセトンを加えてホモジナイズした後、-20℃で2時間放置した。低速遠心した後、上清を除き、残さに20倍容量のクロロホルム／メタノール／水（1：1：0.1, v/v/v）を加えて40℃で1時間攪拌して総脂質を抽出した。低速遠心した後、上清を1次抽出液とした。残さにさらに20倍容量のクロロホルム／メタノール（1：1, v/v）を加えて40℃で1時間攪拌、抽出した。低速遠心した後、この上清を2次抽出液とした。1次および2次抽出液を合わせて総抽出液とし、これを蒸発乾固した。10 mlのクロロホルム／メタノール／水（30：60：8, v/v/v）に溶解した後、DEAE-Sephadex A-25カラム（ベッド容積1 ml）による分離を行なった。試料をカラムにアプライした後、20 mlのクロロホルム／メタノール／水（30：60：8, v/v/v）、10 mlのメタノールで連続してカラムを洗浄した。洗浄液を合わせてこれを中性糖脂質画分とした。次に20 mlの0.15 N 酢酸アンモニウム／メタノールでカラムから酸性糖脂質を溶出した[15]。それぞれの糖脂質画分を蒸発乾固させた後、中性糖脂質画分については、アセチル化を行ない、Saitoらの方法に基づいてフロリジルカラム(SEP-PAK FLORISIL CARTRIDGE)を通すことによりリン



脂質その他の挟雑物を除いた [16]。酸性および中性糖脂質画分はどちらも SEP-PAK C18 CARTRIDGE を用いて脱塩した後、さらに SEP-PAK SILICA CARTRIDGE を通すことにより精製を行なった。最終的に得られた各画分を 30-40  $\mu$ l のクロロホルム／メタノール (1:1, v/v) に溶解して分析用の試料とした。

#### 1-7. 薄層クロマトグラフィー (TLC) による糖脂質の分析

TLC の展開溶媒系には (A) クロロホルム／メタノール／0.5 %  $\text{CaCl}_2$  (55:45:10, v/v/v)、(B) クロロホルム／メタノール／水 (60:35:8, v/v/v) を用いた。酸性糖脂質画分の展開は (A) で、中性糖脂質画分の展開は (B) で行なった。糖脂質の検出はオルシノールー硫酸試薬を用いた [17]。TLC 上での糖脂質の定量は、TLC デンシトメーター (CS-9000、島津製作所、京都) を使用して Ando らの方法にしたがって行なった [18]。

## 2. 結果

### 2-1. 受精卵の初期発生における酸性糖脂質の変化

受精卵の初期発生における主な酸性糖脂質の変化を図1および表1に示した。初期発生のすべてのステージにおいて最大成分はスルファチドであり、総酸性糖脂質量に対する割合は、ほぼ一定であった。総酸性糖脂質量に対する割合の変化はもっぱらガングリオシドに認められた。GM3およびGalNAc-GM1bは受精後にそれぞれ2-4倍に上昇し、それは胞胚期まで認められた。また、未同定のガングリオシドであるG-1は受精前では検出レベル以下であったが受精後新たに出現した。一方、GM1aは受精前および受精直後にはほぼ同レベルで検出されたが、桑実胚期以降は検出レベル以下に減少した。

### 2-2. 受精卵の初期発生における中性糖脂質の変化

受精卵の初期発生における主な中性糖脂質の変化を図2および表2に示した。初期発生のすべてのステージにおいて最大成分はCMHであり、総中性糖脂質量に対する割合は、桑実胚期まで緩やかに上昇した。これに対してアシアロGM1、N-1およびN-2（いずれも未同定）は同時期まで緩やかに減少した。

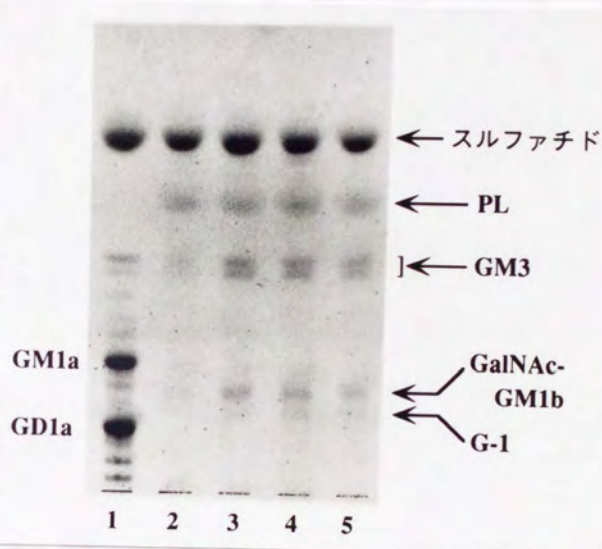


図1.酸性糖脂質のHPTLCパターン

レーン1：スタンダード糖脂質  
 レーン2：ステージ0（未受精卵）  
 レーン3：ステージ2（2細胞期）  
 レーン4：ステージ6 1/2（桑実胚期）  
 レーン5：ステージ8 1/2（胞胚期）

PL, リン脂質

展開：(A) 溶媒系



表1. 初期発生における主な酸性糖脂質の変化

ステージ	スルファチド	GM3	GM1	GalNAc-GM1b	G-1*	総量
0 (未受精卵)	36.3±3.9 (96.5)	0.91±0.05 (2.4)	0.08±0.04 (0.2)	0.22±0.04 (0.6)	Trace	37.6±3.95 (100)
2 (2細胞期)	49.5±4.3 (91.3)	3.00±0.26 (5.5)	0.10±0.01 (0.2)	1.18±0.19 (2.2)	0.38±0.18 (0.7)	54.2±4.92 (100)
6 1/2 (桑実胚期)	41.8±5.5 (91.1)	2.59±0.22 (5.6)	Trace	1.19±0.05 (2.6)	0.25±0.06 (0.5)	45.8±5.86 (100)
8 1/2 (胚前期)	42.0±8.0 (92.7)	2.28±0.31 (5.0)	Trace	0.85±0.19 (1.9)	0.17±0.01 (0.4)	45.3±8.49 (100)

数値は3回の実験の平均±2 S. D. (pmol/mg dry weight)で示した。

()内の数値は各ステージの総酸性糖脂質量に対する個々の糖脂質のモル%を示した。

Traceは0.05(pmol/mg dry weight)以下を示す。

\*: 未同定のガングリオシド

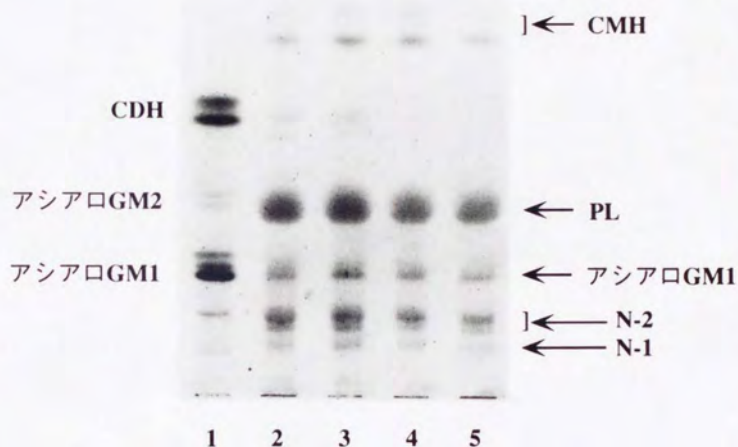


図2.中性糖脂質のHPTLCパターン

レーン1：スタンダード糖脂質  
 レーン2：ステージ0（未受精卵）  
 レーン3：ステージ2（2細胞期）  
 レーン4：ステージ6 $\frac{1}{2}$ （桑実胚期）  
 レーン5：ステージ8 $\frac{1}{2}$ （胞胚期）

PL, リン脂質  
 展開：(B) 溶媒系

表2. 初期発生における主な中性糖脂質の変化

ステージ	CMH	アシアロGM1	N-2 *	N-1 *	総量
0 (未受精卵)	15.6±1.1 (56.5)	4.5±0.6 (16.3)	6.1±0.3 (22.1)	1.4±0.2 (5.1)	27.6±2.0 (100)
2 (2細胞期)	23.2±0.8 (65.0)	4.5±0.1 (12.6)	6.5±0.2 (18.2)	1.5±0.2 (4.2)	35.7±0.6 (100)
6 1/2 (桑実胚期)	20.9±0.5 (69.5)	3.6±0.3 (12.0)	4.6±0.1 (15.3)	1.0±0.2 (3.3)	30.1±0.5 (100)
8 1/2 (胞胚期)	15.7±0.4 (61.1)	3.7±0.1 (14.4)	5.1±0.1 (19.8)	1.2±0.1 (4.7)	25.7±0.5 (100)

数値は3回の実験の平均±2 S. D. (pmol/mg dry weight)で示した。  
 () 内の数値は各ステージの総中性糖脂質量に対する個々の糖脂質のモル%を示した。

Traceは0.5(pmol/mg dry weight)以下を示す。

\*: 未同定の中性糖脂質



### 3. 考察

アフリカツメガエルの卵は、発生を始めると約20時間で神経胚、約30時間で尾芽胚そして約100時間でオタマジャクシとなる。一方、ヒトでは、受精卵は卵割を始めて5-6日後に着床し、さらに約17日経つと神経管が形成される。したがって、ヒトの卵における2-3週間分の変化をカエルにおいては0.5-1日で見る事が可能であり、初期発生を研究するのに非常に適している [39]。

アフリカツメガエル卵は受精後、ただちに卵割が始まり細胞数が急激に増加し、桑実胚（細胞数、数百）、胞胚（胚の内部上方に腔所が生ずる、細胞数、数千）を経てのう胚（細胞数、数万）となる。この時期には陥入が起こり、初めて3つの胚葉が形成され、このうち神経胚となる（細胞数、数十万、受精後約20時間） [39]。

受精直後の卵には新規のRNA合成はほとんどなく、卵割の進行には必要ではない。しかし、卵母細胞が成熟する時点で始まったタンパク質の合成は非常に活発になる。これは母性由来のリボソーム、mRNAおよびtRNAが動員されて起こることによる。このタンパク質合成の活性化の度合は、全タンパク質として数倍、ヒストン合成に限っては約50倍にも上る事が知られている。新規のRNA合成は、胞胚期までにすべてのRNAについて開始される。これに呼応して胚内部の母性RNAの量は急速に低下する [39]。

今回、初期発生における糖脂質の分析には、RNA合成が発生過程で最も低下する一方でタンパク質合成が活性化されている受精直後の2細胞期、新規mRNAの合成が開始される桑実胚期およびすべてのRNAの新規合成が開始されている胞胚期についてそれぞれ行なった。

図1に主な酸性および中性糖脂質の割合の発生過程における変化をグラフに示した。受精直後に特徴的な変化として、構造未知のガングリオシド (G-1) が微量に出現することおよび2種類のガングリオシド (GM3およびGalNAc-GM1b) の存在量が2-4倍に上昇することが挙げられる。また、桑実胚期には、GM1aガングリオシドが減少する。糖脂質糖鎖の変化は、この分子の合成に関与する特異的な糖転移酵素と、分解に関与する特異的なグリコシダーゼの活性レベルの変化によってもたらされる [8,40]。今回、GalNAc-GM1bの存在量が受精直後に約4倍に上昇したのは、このガングリオシドの主要合成経路の中間に位置する中性糖脂質であるアシアロGM1が減少していることから、アシアロGM1からGM1bを合成する $\alpha$ 2-3シアル酸転移酵素の活性上昇によるものと考えられる (第2章、図6参照)。

アフリカツメガエル受精卵の初期発生における糖脂質糖鎖の変化についての報告は未だされたことがなく、今回の実験によって初めてその変化が明らかになった。

今後は、受精直後および桑実胚期において出現あるいは消失する糖脂質について、その構造を明かにするとともに変化の認められた糖脂質の合成あるいは分解に関与する一連の酵素活性を調べることにより、糖脂質糖鎖が発生にともないどのように発現制御されているかを解明する糸口になるものと考えられる。

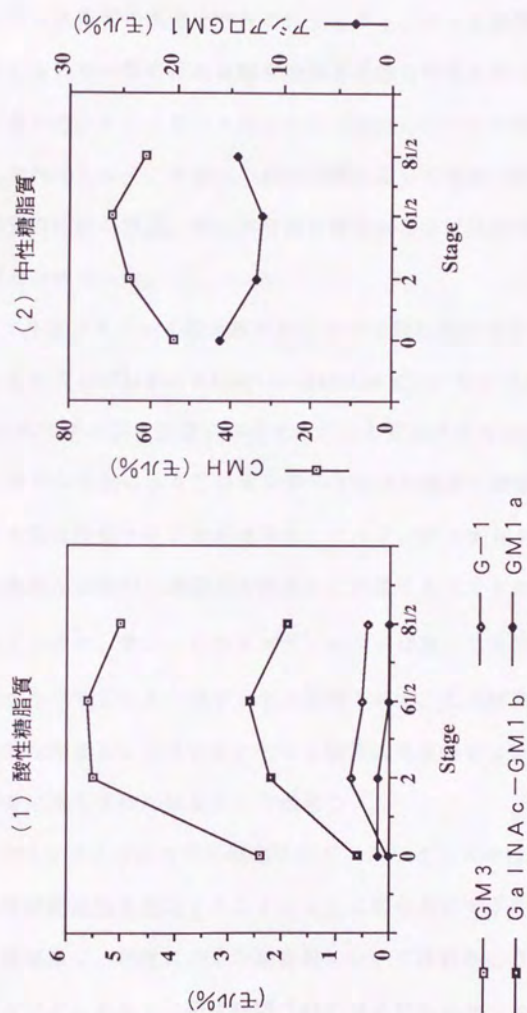


図3. 発生過程における糖脂質の割合の変化



## 総括

糖鎖発現に関与する遺伝子特に糖脂質糖鎖を合成する糖転移酵素遺伝子の発現系としてアフリカツメガエル卵母細胞を用いるためにはこの細胞中に内在している糖脂質の構造を明らかにすること、さらに糖脂質糖鎖合成に関わる酵素すなわち一群の糖転移酵素の酵素学的な性質を明らかにすることが不可欠であった。アフリカツメガエル卵母細胞についての糖脂質に関する報告は全くされておらず、今回の一連の実験によって初めて卵母細胞中の主な酸性糖脂質の詳細な構造、糖転移酵素の諸性質および糖脂質糖鎖の主要合成経路が明らかになった。

アフリカツメガエル卵母細胞に存在する酸性糖脂質の中で主要ガングリオシドであることがわかったGalNAc-GM1bはヒトの脂質代謝異常症であるTay-Sachs病患者の脳に微量に存在することが推定されていたものであった[30]。今回の実験によりこのガングリオシドの構造を機器分析を用いた一連の方法で完全決定することが出来た。このガングリオシドはGM2ガングリオシドの非還元末端の三糖構造を特異的に認識するモノクローナル抗体と交差反応をすること、また、このガングリオシドは脱シアル酸しない限り $\beta$ -N-アセチルヘキソサミニダーゼでは全く水解されず、この酵素に対してシアル酸が立体的な障害となっていることなど抗原抗体反応および酵素反応についての重要な知見も併せて得ることが出来た。

アフリカツメガエル卵母細胞中のガングリオシドの主要合成経路を4種類の糖転移酵素活性を測定することによって明らかにできた。アフリカツメガエル卵母細胞は、非常に多くの動物種において神経系に特徴的に認められる一連のガングリオシドの合成経路[41] および自然界では非常に希であるGM1bを経由してGalNAc-GM1bを合成するというユニークな合成系路の2つ

を持つことがわかった。また、シアル酸転移酵素については、酵素活性測定に最適な諸条件を決定し、その条件下での酵素反応速度論的解析も併せて行なうことが出来た。

これらの知見は、アフリカツメガエル卵母細胞を遺伝子発現系として用いて、糖脂質糖鎖に関与する遺伝子の発現を実際に行なう際の重要な知見であり、これによりこの細胞が糖転移酵素遺伝子の発現系として有用である可能性を示したといえる。今後は、現在既にクローニングされている数種類の糖転移酵素遺伝子を卵母細胞にマイクロインジェクションすることにより、目的の酵素活性の測定およびその酵素によって合成される糖脂質の同定を行なうことによりこの細胞を実際に利用可能な発現系にしたいと考えている。

さらに糖脂質糖鎖の発現調節についても重要な知見を得ることが出来た。アフリカツメガエルの受精卵の発生にともない糖脂質の特徴的な変化が観察された。その変化は、大きく分けて受精直後（受精1-2時間後）と桑実胚以降に認められた。受精直後の変化であるGalNAc-GM1b量の増加は、今回明らかにしたこのガングリオシドの主要合成経路の中間体であるアシアロGM1からGM1bを合成する $\alpha$ 2-3シアル酸転移酵素の活性上昇による事が示唆された。このことから受精に伴って起こる種々の現象と糖転移酵素の活性化がなんらかのつながりを持つ、すなわち受精によってこの酵素を制御している因子に変化が起きたのではないかと考えられる。

以上、アフリカツメガエルの卵母細胞は単に糖転移酵素遺伝子の発現系として有用であるのみならず、糖脂質糖鎖の発現制御を知る上でも大きな価値のある材料であることが明らかとなった。



## 参考文献

1. Svennerholm, L. (1963) *J. Neurochem.* 10, 613-623
2. Hakomori, S. (1981) *Annu. Rev. Biochem.* 50, 733-764
3. Bird, J.M. & Kimber S.J. (1984) *Dev. Biol.* 104, 449-460
4. Feizi, T. (1985) *Nature* 314, 53-57
5. Livingston, B.D., De Robertis, E.M., & Paulson, J.C. (1990)  
*Glycobiology* 1, 39-44
6. Lowe, J.B., Stoolman, L.M., Nair, R.P., Larsen, R.D., Berhend, T.L., &  
Marks, R.M. (1990) *Cell* 63, 475-484
7. Hakomori, S. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 18713-18716
8. Tsuji, S., Yamashita, T., & Nagai, Y. (1988) *J. Biochem.* 104, 498-503
9. Fishman, P.H. & Brady, R.O. (1976) *Science* 194, 906-915
10. Paulson, J.C. & Colley, K.J. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 17615-17618
11. Gurdon, J.B., Lane, C.D., Woodland, H.R., & Marbaix, G. (1971)  
*Nature* 233, 177-182
12. Cavalieri, R.L., Havell, E.A., Vilcek, J., & Pestka, S. (1977)  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74, 3287-3291
13. Kindas-Mugge, I. (1979) *Trends Biochem. Sci.* 4, 135-137
14. Yamazaki, M., Sanai, Y., Iwamori, M., & Nagai, Y. (1987) *Proceedings  
of Japanese Conference on The Biochemistry of Lipids* 29, 25-28
15. Yu, R.K. & Ledeen, R.W. (1972) *J. Lipid Res.* 13, 680-686
16. Saito, T. & Hakomori, S. (1971) *J. Lipid Res.* 12, 257-259
17. Francois, C., Marshall, R.D., & Neuberger, A. (1962) *Biochem. J.*  
83, 335-341



18. Ando, S., Chang, N.-C., & Yu, R.K. (1978) *Anal. Biochem.* 89, 437-450
19. Sweeley, C.C. & Walker, B. (1964) *Anal. Chem.* 36, 1461-1466
20. Nohara-Uchida, K. & Ohashi, M. (1987) *J. Biochem.* 102, 923-932
21. Sweeley, C.C. & Moscatelli, E.A. (1959) *J. Lipid Res.* 1, 40-47
22. Karlsson, K.-A. (1965) *Acta. Chem. Scand.* 19, 2425-2427
23. Yang, H.-J. & Hakomori, S. (1971) *J. Biol. Chem.* 246, 1192-1200
24. Björndal, H., Hellerqvist, C.G., Lindberg, B., & Svensson, S. (1970) *Angew. Chem. Int. Edit.* 9, 610-619
25. Tai, T., Yamashita, K., & Kobata, A. (1975) *J. Biochem.* 78, 679-686
26. Magnani, J.L., Smith, D.F., & Ginsburg, V. (1980) *Anal. Biochem.* 109, 399-402
27. Higashi, H., Fukui, Y., Ueda, S., Kato, S., Hirabayashi, Y., Matsumoto, M., & Naiki, M. (1984) *J. Biochem.* 95, 1517-1520
28. Egge, H. & Peter-Katalinic, J. (1987) *Mass Spectrometry Rev.* 6, 331-393
29. Iwamori, M. & Nagai, Y. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* 528, 257-267
30. Itoh, T., Li, Y.-T., Li, S.-C., & Yu, R.K. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 165-169
31. Hidari, K., Itonori, S., Sanai, Y., Ohashi, M., Kasama, T., & Nagai, Y. (1991) *J. Biochem.* 110, 412-416
32. Iwamori, M. & Nagai, Y. (1978) *J. Biochem.* 84, 1601-1608
33. Pohlenz, G., Klein, D., Schwarzmann, G., Schmitz, D., & Sandhoff, K. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 7044-7048
34. Senn, H.-J., Cooper, C., Warnke, P.C., Wagner, M., & Decker, K. (1981) *Eur. J. Biochem.* 120, 59-67

35. Wilkinson, F.E., Morre, D.J., & Keenan, T.W. (1976) J. Lipid Res. 17, 146-153
36. Hirabayashi, Y., Hamaoka, A., Matsumoto, M., Matsubara, T., Tagawa, M., Wakabayashi, S., & Taniguchi, M. (1985) J. Biol. Chem. 260, 13328-13333
37. Richardson, C.L., Keenan, T.W., & Morre, D.J. (1977) Biochim. Biophys. Acta 488, 88-96
38. Nieuwkoop, P. & Faber, J. (1967) Normal Table of *Xenopus laevis* (2nd Edition)
39. 塩川光一郎 (1983) 医学のあゆみ 126, 34-52
40. Rademacher, T.W., Parekh, R.B., & Dwek, R.A. (1988) Annu. Rev. Biochem. 57, 785-838
41. 東京化学同人編 (1990) 新生化学実験講座 4 脂質 III 糖脂質

## 謝 辞

本研究にあたり、懇切なる御指導、御鞭撻を賜りました東京都臨床医学総合研究所 永井克孝所長（前東京大学医学部教授）に深く感謝致します。

また、終始、直接、懇切なる御指導を賜りました東京都臨床医学総合研究所 生命情報部門 佐内豊室長、小山内たか博士に甚大なる感謝の意を表します。

御指導、御協力頂きました東京大学医学部第二生化学 岩森正男助教授、理学部 塩川光一郎教授に深く感謝致します。化学分析に御協力頂きましたお茶の水女子大学生生活環境研究センター 大橋昌子教授、東京医科歯科大学 医学部 笠間健嗣博士に感謝致します。質量分析に御協力頂きました東京都老人総合研究所 安藤進部長、田中康一博士、今一夫博士に感謝致します。





