総 説

ガングリオシドの構造と機能の分析

脇 初 枝

東京都老人総合研究所生体膜部門 (〒173-0015 東京都板橋区栄町 35-2)

Analysis for the Structure and Function of Gangliosides

Hatsue WAKI

*Department of Membrane Biochemistry, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology
(35-2 Sakaecho, Itabashi-ku Tokyo 173-0015)*

Abstract : Isolation methods and analytical procedures for gangliosides have been continuously improved. Gangliosides from samples of small sizes such as plasma membrane fractions can be determined using these methods. Newly isolated gangliosides are often subjected to sophisticated measurements by mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectrometry. Localization of gangliosides among various tissue regions are determined by immunohistochemical methods using anti-ganglioside antibodies. Such improved analyses provide much information for the understanding of functions of gangliosides. Recent analytical methods and functional research in this field are reviewed.

Key words : Ganglioside, *O*-Acetylated ganglioside Sialic acid, HPLC, GC/MS

1 はじめに

ガングリオシド研究は、新たに発見された分子種の化学構造解析、神経系における分布、脳形成期における動態、癌組織のガングリオシドと病態、細胞の分化誘導効果などの情報が蓄積されてきた。それらの現象に関わるガングリオシドの機能を解明しようとする研究は、近年急速に進展しつつある。一方、従来の分析方法の改良や新しい分析手段の開発により、より詳細な情報が得られるようになってきた。ここでは、第一に最近のガングリオシド分析法を紹介し、第二に神経系での機能研究の一部にもふれてみたい。

2 ガングリオシドの構造

ガングリオシドは親水性の糖鎖部分と疎水性のセラミド部分からなり、多様な分子種が存在する。セラミド部分で細胞膜に固定されており、糖鎖は細胞表面に露出して生理機能を担っていると考えられている。

糖鎖部分は中性糖骨格に、酸性アミノ糖のシアル酸が結合していることが最大の特徴である。ガングリオシドは中性糖鎖の配列や結合様式によりガラ系、ヘマトシド系、ガングリオ系、ネオラクト系、グロボ系などに分類される。脊椎動物の神経系で圧倒的に多いのがガングリオ系である。Fig. 1 にガングリオ系ガングリオシドを

まとめた。シアル酸の結合様式により、A シリーズ、B シリーズ、C シリーズに分類されるが、A あるいは B シリーズと α シリーズのハイブリット型も存在する。ガングリオシドの呼び方には、IUPAC-IUB 命名法による名称と、Svennerholm の命名法¹⁾による通称名がある。通常、Svennerholm の命名法による通称名が使われる。Fig. 1 はこの通称名で表記した。G の後の M, D, T, Q は結合するシアル酸の数を示し、次の 1~4 の数字は中性糖骨格の構造を表す。最後の a, b, c, α は骨格糖鎖へのシアル酸の結合様式を表している。

3 ガングリオシドの分離と精製

新規なガングリオシドの構造を解析したり、ガングリオシドの機能を調べようとするとき、その純度が重要なポイントとなる。組織や細胞の脂質の大部分はリン脂質や単純脂質であって、ガングリオシドはきわめて微量成分である。ガングリオシドを効率的に抽出し、圧倒的に多量にある他の脂質成分から分離するために、ガングリオシドの調製法は改良されてきた。ガングリオシドを、総ガングリオシド画分として得ようとするのか、特定の分子種を単離しようとするのか、またどの程度の実験スケールなのかにより、有効な分離方法と精製方法は異なる。

Fig. 1 Gangliosides of ganglio series.

3・1 少量スケールでの総ガングリオシド調製

脳シナプトソームやシナプス膜など1匹の動物からは限られた量しか得られない試料、あるいは生物材料で少量しか入手できない試料では、微量のガングリオシドの調製や分析に特別な配慮が必要となる。ガングリオシド含量は脳組織でさえ湿重量の0.1~0.3%程度であるので、他の脂質成分を除くことが第一段階である。一般的に総脂質からガングリオシド画分を調製するには、Folchの二層分配法²⁾やイオン交換クロマトグラフィー^{3),4)}が用いられる。Folch法ではガングリオシドの大部分は水-メタノール層に分配されるが、糖鎖の短い分子種(GM1, GM2, GM3, GM4など)はかなりの部分が有機溶媒層に分配されてしまう。筆者は既存の方法で、少量組織(タンパク質量1~数10 mg程度の脳組織)のガングリオシドを調製しガングリオシド回収率を調べたところ、Folch法では75%であった。陰イオン交換樹脂によるガングリオシド調製法は、現在最も広く採用されている便利な方法である。しかし、少量組織のガングリオシド調製に適用した場合、回収率はDEAE-セファデクスで84%、DEAE-トヨパールで88%であった。筆者らが工夫したフェニルセファロースカラムクロマトグラフィー法は、総脂質中のガングリオシドの99%が回収され、少量組織のガングリオシドの

定量に有効であった⁵⁾。

組織からのガングリオシドの抽出は次のような方法が抽出効率が良い。組織を2倍量の冷水を加えてホモジナイズし、クロロホルム-メタノール(2:1)で総脂質を抽出する。抽出液にメタノールを加えてクロロホルムとメタノールの比率を1:1とし、遠心して上清を集める。この段階でガングリオシドの約95%が抽出される。残渣はクロロホルム-メタノール-水(1:2:0.8)で再抽出し、最初の抽出液と合わせる。総脂質画分はクロロホルム-メタノール(90:10)に溶解して、フェニルセファロース(Amersham Pharmacia Biotech)のカラムにかける。クロロホルム-メタノール(90:10)と(85:15)で単純脂質と大部分のリン脂質を除き、総ガングリオシド画分はクロロホルム-メタノール(1:1)とメタノールで溶出される。総ガングリオシド量はこの段階の試料をガスクロマトグラフィー-質量分析法(GC/MS)で測定する。総ガングリオシド画分をトヨパールHW-40のカラムで精製して薄層クロマトグラフィーに適用する。トヨパールHW-40の段階でのガングリオシド回収率は95%である⁵⁾。

3・2 大量スケールでの総ガングリオシド画分の調製

大量の組織からガングリオシドを調製しようとする場合は、如何に効率よく試料を処理できるかが問題とな

る。大量処理の場合は、総ガングリオシ画分の変離や特定の分子種の単離が目的であるので、厳密な定量性は要求されない。

3・2・1 ガングリオシドの抽出

組織をクロロホルム-メタノール (2:1) 中でホモジナイズし、総脂質を抽出するのが一般的である。中尾ら⁶⁾は大量のウシ脳(20 頭分)の処理に熱メタノール法を用いた。ウシ脳は約 1 cm 角に切って凍結乾燥後、ミキサーにかけて粉末にする。これにメタノールを加え、60℃に加熱して 30 分間放置後、速やかに吸引ろ過する。このろ液を-10℃で一晩放置し、沈殿した粗ガングリオシド画分を集める。この抽出法は、非常に大量の組織を処理するのに有効である。

3・2・2 酸性脂質の分離

現在、総脂質から酸性脂質を分離する手段として、陰イオン交換クロマトグラフィーが広く使われている。ガングリオシドの大量分離の目的には、DEAE-セファデックス A-25³⁾や Q-セファロース⁷⁾が交換容量が高いので適している。陰イオン交換クロマトグラフィーでは、クロロホルム-メタノール-水 (30:60:8) で中性脂質を溶出後、クロロホルム-メタノール-0.8 M 酢酸ナトリウム水溶液 (30:60:8) で酸性脂質を溶出する。酸性糖脂質画分を得るには、混在する酸性グリセロリン脂質(ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトールなど)を弱アルカリ水解で分解後、透析して脱塩するのが一般的な方法である。しかし、アルカリに不安定なガングリオシド(*O*-アセチルガングリオシドやガングリオシドラクトン)を分離する場合には弱アルカリ水解はできないので、イアトロビーズなどケイ酸カラムでリン脂質を分離する。ガングリオシドを個々の分子種にまで分離しようとする時には、塩濃度勾配溶出法による陰イオンカラムクロマトグラフィーの過程で、リン脂質を除くことができる(次項 3・2・3)。

3・2・3 ガングリオシド分子種相互の分離

総ガングリオシドを陰イオン交換カラムにかけ、塩濃度勾配法で溶出すると、シアル酸結合数の少ないガングリオシドから順に溶出される。DEAE-トヨパールはガングリオシドの分離能がよいので、この目的には適している⁴⁾。

シアル酸の数によって分画されたガングリオシドは、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)にかけ、糖鎖部分と脂質部分の比率によって決まる分子の極性の差を利用して、個々のガングリオシド分子種を分離する。単独の分子種にまで精製するには、何度かの HPLC が必要となる。イオン対試薬あるいは塩類を含む溶出溶媒系を用いると、テーリングが少なくシャープな分離が得られる⁸⁾。Fig. 2 にイオン対試薬(tetramethylammonium chloride)を用いた HPLC のガングリオシド溶出

Fig. 2 HPLC of gangliosides.

Gangliosides were separated using a solvent system of acetonitrile/2-propanol/50 mM tetramethylammonium chloride. Peaks 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 and 8 are GM1, GD1a, GD1b, GT1b, GQ1b, GQ1c, GP1c and GH, respectively.

パターンを示した。一方、塩を含まない溶媒系は、HPLC 後脱塩操作が必要ないので、*O*-アセチルガングリオシドなどの化学的に不安定なガングリオシドの分離に有効である^{9),10)}。

4 ガングリオシド分子種の分析

ガングリオシド分子種の分析には薄層クロマトグラフィー(TLC)が用いられる。薄層プレートとしては、HPTLC プレート(E. Merck)がシャープな分離が得られ再現性もよい。ガングリオシド全般をみるには、クロロホルム-メタノール-0.2% 塩化カルシウム水溶液(50:50:11)やアセトニトリル-イソプロパノール-50 mM 塩化カリウム(10:67:23)が、分離もよくバンドもシャープである。後者の溶媒系は、テトラシアロ以上のポリシアロガングリオシドの分離が特によい¹¹⁾。最近、滝らにより開発された TLC Blotting 法については、本特集「TLC Blotting を用いた複合脂質の微量分析」を参照していただきたい。

4・1 ガングリオシド組成の分析

ガングリオシド画分の分子種の組成比を知るには、デンストメーターで、TLC プレート上のバンドの濃度を測定するのが簡便である¹²⁾。ガングリオシドはシアル酸に特異的なレゾルシノール塩酸試薬で発色させる¹³⁾。20 cm 巾の薄層プレートを使えば、30 試料程度を同時定量することができる。通常、展開は 10 cm で充分である。同一プレート上にのせた既知量の標準ガングリオシド混合物から作成した検量線を使い、ガングリオシド量をシアル酸量として求める。ガングリオシドの移動度によって検量線の傾きが異なるので、試料のガングリオシド組成を考慮して、標準ガングリオシド混合物を用意する。この方法は、微量試料に適用でき、精度よい測定ができる。

4・2 *O*-アセチルガングリオシドの検出

O-アセチルガングリオシドはシアル酸の水酸基がアセチル化されたものである。哺乳類の胎児脳^{14),15)}やメラノーマ¹⁶⁾、神経芽細胞腫¹⁷⁾、乳癌¹⁸⁾などの腫瘍組織に発現することが報告されている。脳では、神経突起が伸展して、シナプス形成するまでのマスキングの役割が考えられる。癌細胞に発現する *O*-アセチルガングリオシドは転移に関わっているのではないかと考えられる。

O-アセチルガングリオシドは免疫化学的方法、質量分析、プロトン NMR によっても検出される。しかし、その検索法の第一のものは *O*-アセチル基のアルカリ不安定性を利用したもので、Sonnino ら¹⁹⁾が 2 次元 TLC を工夫した。この方法では 1 次元、2 次元とも同一の溶媒系で展開するが、1 次元展開後に薄層プレートをアンモニア蒸気に曝して、脱 *O*-アセチル化する。アルカリに安定なガングリオシドは 1, 2 次元とも同じ移動度なのでプレートの 45 度の対角線上に検出される。*O*-アセチルガングリオシドは脱 *O*-アセチル化の結果、2 次元方向での移動度が小さくなり、対角線から 1 次元側にはずれて検出される (Fig. 3)。ガングリオシドのラクトン体も似た挙動をするので注意が必要である。

5 ガングリオシドの免疫化学的分析

ガングリオシドに対する抗体は、ガングリオシド分子種の特異的検出や機能解析に有用なプローブである。

5・1 免疫組織染色

間接蛍光抗体法で組織染色することによって、組織中のガングリオシド抗原の発現や分布を知ることができる。組織から切り出した切片は、最初抗ガングリオシド抗体 (1 次抗体) と反応させる。組織切片は、次に蛍光色素 (フルオレセインイソチオシアネート (FITC) やローダミンなど) 標識した 2 次抗体と反応させることによって染色される。

Tai ら^{20)~22)}は、彼らの作製した一連の抗ガングリ

Fig. 3 Detection of *O*-acetylated gangliosides by two-dimensional TLC.

Total gangliosides of growth cone membranes of rat brain were developed with chloroform/methanol/0.2%CaCl₂ (50:40:10) in the first and second directions. Before the second development, the TLC plate was exposed to ammonium vapor for 5h.

オシド抗体を、ラット脳組織の免疫組織染色に利用した。彼らは、大脳皮質、海馬、小脳皮質を染色して、ガングリオシド分子種 (GM1, GD1a, GD1b, GT1b, GQ1b) の分布を調べ、GD1a, GT1b, GQ1b がシナプス形成領域 (ニューロピル) に分布していることを示した。これは筆者らが脳シナプス膜からガングリオシドを抽出して得たデータと一致する結果である⁵⁾。

Irie ら²³⁾は、抗 Chol-1 α 抗体を用いて、ガングリオシド Chol-1 α のラット脳内分布を調べ、Chol-1 α 陽性領域は、コリンアセチル転移酵素 (ChAT) に陽性であることを示した。Chol-1 α (GQ1b α , GT1a α) はコリン性ニューロンに特異的に発現し、最近その化学構造が明らかにされたガングリオシドであり^{24),25)}、ChAT はコリン性ニューロンのマーカーである。

これらの免疫組織染色の結果は、脳機能とガングリオシドの役割を解き明かしていく手がかりとして意義がある。

5・2 TLC-免疫染色法

総ガングリオシド画分を TLC で分離し、薄層プレート上で特異抗体と反応させることにより、特定の分子種や糖鎖構造の高感度検出ができる。

ガングリオシドを HPTLC プレートで分離し、プレートはポリイソブチルメタクリレートでコーティング

する。プレート上のガングリオシドは抗ガングリオシド抗体(1次抗体)と反応させる。次にペルオキシダーゼ標識2次抗体と反応させる。バンドの検出には、ECL Western blotting detection reagent(Amersham)あるいはコニカイムノステイン HRP-1000(コニカ)が高感度でよい。前者の場合は化学発光をX線フィルムに記録する。後者はナフトール誘導体試薬であり、バンドは青色に染まる。感度は4-クロロ-1-ナフトール試薬より1桁程度高い。

筆者らは、TLC-免疫染色法を用いて、ヒト乳癌組織に特異的に発現する3つのガングリオシドを検出した¹⁸⁾。このうち2種のO-アセチルガングリオシド(O-アセチル-GD3とO-アセチル-GT3)は、TLCの移動度だけでは判定できず、TLC-免疫染色によって発現がわかった。3つめのN-グリコシル-GM3の場合は、TLCパターンからその存在が予想され、免疫染色によってN-グリコシルノイラミン酸をもつガングリオシドであることが確認された。

6 シアル酸の分析

ガングリオシドの生理機能における、シアル酸の担う役割は大きい。シアル酸といわれるものはノイラミン酸のN-アシル誘導体の総称であり、N-アセチルノイラミ

ン酸(Neu5Ac)とN-グリコシルノイラミン酸(Neu5Gc)に大別される(Fig. 4)。Neu5AcとNeu5GcのO-アセチル誘導体を含めると、天然には30種以上のシアル酸が存在する。ガングリオシドは棘皮動物以上に存在するが、そのシアル酸の大部分はNeu5Acである。

Neu5Gcの存在量は動物種によって異なる。ヒトとニワトリの正常組織にはNeu5Gcは見られないが、ヒト大腸癌²⁶⁾、胃癌²⁷⁾、乳癌¹⁸⁾などにNeu5Gcをもつガングリオシドが発現している。

6.1 シアル酸分子種の構成比の定量

ガングリオシドのシアル酸分子種は、ガスクロマトグラフィーで定量できる。YuとLedeenは²⁸⁾、ガングリオシドを弱酸水解してシアル酸を遊離し、トリメチルシリル誘導体としてNeu5AcとNeu5Gcを分離した。しかし、共存する妨害物質が多い場合はシアル酸誘導体のピーク検出が困難になる。充分量のガングリオシドがある場合には、試料を精製してシアル酸誘導体を調製すればよい。

試料が微量で精製が難しい場合は、ガスクロマトグラフィー-質量分析法(GC/MS)により精度のよい測定ができる¹⁸⁾。ガングリオシドを2M酢酸で水解してシアル酸を遊離する。凍結乾燥で酢酸を除く。試料に既知量の内部標準物質(phenyl- α -N-acetylglucosamine)を加え、トリメチルシリル化してGC/MSに導入し、特定イオンモニタリング法(selected ion monitoring)で測定する。この方法は、O-アセチルシアル酸を損なうことなく、かつNeu5AcおよびNeu5Gcとの同時定量ができる。ガスクロマトグラフィーには、OV-1やOV-17など非極性カラムを用いる。

7 ガングリオシドの構造解析

ガングリオシドの構造解析には、分子をそのまま機器分析にける方法と、化学的、生化学的な処理を加えて分析する方法がある。前者は質量分析や核磁気共鳴による方法である。後者には、メチル化分析や糖分解酵素による糖鎖の分析と、セラミドを構成するスフィンゴシン塩基と脂肪酸の分析がある。新規なガングリオシドでは糖鎖の解析が重要となる。

7.1 質量分析

質量分析によって、ガングリオシドの分子量と、糖鎖構造の全体像(ヘキササミン、N-アセチルヘキササミン、シアル酸の配列順序)を知ることができる。現在、ガングリオシドの構造解析に広く用いられているのはFAB/MSである。ガングリオシドの場合、負イオンモード測定の方が、疑似分子イオン(M-H)⁻や開裂イオンの検出が容易である。マトリックスにはトリエタノールアミンなどが用いられ、数 μ g程度のガングリオシドで測定可能である。糖鎖に由来する開裂イオンの帰

Fig. 4 Structures of sialic acids.

A: N-acetylneuraminic acid(Neu5Ac), B: 9-O-acetyl-N-acetylneuraminic acid (Neu5, 9Ac), C: N-glycolylneuraminic acid (Neu5Gc).

属により単糖の配列順序が推定される^{9),10)}。

最近, Karas ら²⁹⁾によって考案された MALDI/TOF/MS (matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry) が, ガングリオシドにも応用されるようになった³⁰⁾。この方法ではレーザーで試料をイオン化し, 飛行時間型質量分析計で測定する。テトラシアロ以上の分子量の大きいガングリオシドの測定も可能と思われるが, 現段階ではまだ発展途上の分析法であり, 今後, 基礎的データの積み重ねが必要と考えられる。

7・2 核磁気共鳴 (NMR)

NMR の測定には数百 μg 程度の試料が必要であるが, 非破壊分析であるので, 測定後試料の回収ができる利点がある。1次元 NMR からは, 糖の結合様式 (アノマー配置) の情報が得られる。近年, 2次元 NMR が急速に進歩して, 糖の配列順序や結合様式も決定できるようになり, ガングリオシドの構造解析において多くの情報を提供する手段となってきた。

7・3 生化学的方法による糖鎖配列分析

糖分解酵素を利用することでガングリオシドの糖鎖情報が得られる。ノイラミニダーゼ, ガラクトシダーゼ, ヘキシサミニダーゼなど糖分解酵素は酵素源によって, 加水分解の特異性が異なる。この特異性を利用して, 糖鎖を非還元末端から順次切断し, 加水分解物を TLC で調べることで結合順序とアノマー配位を決めることができる³¹⁾。

7・4 セラミドの分析

セラミドはスフィンゴシン塩基に脂肪酸が酸アミド結合したものである。スフィンゴシンと脂肪酸の分析には GLC が用いられる。脂肪酸の分析は, ガングリオシドを 5% HCl/メタノールで分解し, 常法にしたがって脂肪酸メチルエステルを分析すればよい。スフィンゴシンは, *n*-ヘキサンで脂肪酸メチルエステルを抽出後のメタノール層を用いて分析する。メタノール層はメタノール-無水酢酸に再溶解して中和後, トリメチルシリル化して GLC にかける。神経系のスフィンゴシンとしては, 直鎖ジヒドロキシモノエン型の d 18:1 と d 20:1 で 70% 以上を占める。脂肪酸はステアリン酸 (C 18:0) が最も多いが, エイコサン酸 (20:0), テトラコセン酸 (24:1) も含まれる。

8 ガングリオシドの機能研究

ガングリオシドは細胞膜の酵素, 受容体, イオンチャンネル, 細胞接着分子などの機能調節因子であることが示唆されている。この項では, 神経系におけるガングリオシドの機能研究にふれてみたい。

8・1 神経成長因子受容体の調節

神経成長因子 (nerve growth factor : NGF) の突起

伸展活性がガングリオシド GM1 により促進され, GM1 非存在下では十分な活性が得られないことから, このガングリオシドが NGF の神経栄養活性に関与していると考えられた。NGF はニューロンの突起伸展や生存に関わっている神経栄養因子である。NGF の高親和性受容体 TrkA は細胞質内にチロシンキナーゼドメインをもち, 細胞内への情報伝達に関わっている。Mutou ら³²⁾は, NGF と GM1 の存在下で培養した PC 12 細胞の無細胞標品と抗 TrkA 抗体の免疫沈降を行い, GM1 を TrkA タンパク質と結合した状態で得た。特定のガングリオシド分子種が特定の機能タンパクの調節因子としてとらえられたことは, ガングリオシドの機能研究のうえで意義あることと考えられる。

8・2 シナプス形成

Ito と Yamagata³³⁾は, *Rhodococcus* species の培養上清に, ガングリオシドの機能解析に有用なエンドグルコセラミダーゼ (EGC) をみいだした。EGC はスフィンゴ糖脂質に特異的で, 糖鎖とセラミド間のグルコシド結合を切断する。Muramoto ら³⁴⁾は, この酵素を利用して, ガングリオシドが脳シナプス形成に関わっていることを示した。ラット胎児脳の大脳皮質培養細胞にカルシウム蛍光指示薬 Fura-2 を取り込ませ, 細胞内カルシウムイオン濃度をモニターすると, シナプス形成後は多数のニューロンの同期発火がみられる。ところが, EGC を添加して培養した細胞群では, 同期発火が著しく低下する。EGC 処理群にガングリオシドを添加して調べると, GQ1b によって同期発火が回復したことから, このガングリオシドのシナプス形成における役割が示唆された。

細胞表面の糖脂質糖鎖を EGC で切ることによって, 細胞膜にはセラミドが残される。最近, セラミドの生理作用が注目されており, EGC を機能研究に利用する場合は, この点も考慮して実験を進めることが大切であろう。

8・3 海馬の長期増強

大脳海馬は記憶や学習に深く関与する部位であり, 現在, 記憶, 学習のメカニズムとして, 長期増強 (long-term potentiation : LTP) 現象が注目されている。LTP は, 神経線維への高頻度刺激によりシナプスの伝達効率が長期にわたって増大する現象である。海馬から作製したスライスに刺激電極と記録電極をさし, 高頻度刺激による電位変化を記録することによって, LTP を測定することができる。Wieraszko と Seifert³⁵⁾は, ラット海馬スライスを使った実験で, LTP に対するガングリオシドの効果を調べた。彼らは, 海馬スライスをノイラミニダーゼ処理して, ポリシアログガングリオシドを減少させ, モノシアログガングリオシド GM1 を増加させると, より大きな LTP が得られること, メディウム

中に GM1 を添加することによっても LTP の促進がみられることを報告している。加藤らのグループと筆者らのグループは、モルモットの海馬スライスを GM1 あるいは GQ1b を添加したメディウムでインキュベートすると、通常では LTP の誘導されない弱い刺激によっても LTP が誘導されることをみいだした³⁶⁾。LTP に対するガングリオシドの調節効果については、神経伝達物質の放出促進、 Na^+ , K^+ -ATPase, アデニルシクラーゼなどの膜酵素調節、プロテインキナーゼ C やエクトプロテインキナーゼなどのリン酸化酵素に対する効果などがあげられているが、作用機作の解明にはさらに研究を進めることが必要である。

謝 辞

本稿をご校閲いただいた東京都老人総合研究所安藤進副所長に深謝いたします。

(受付：1998年6月10日，受理：1998年6月22日)

文 献

- 1) L. Svennerholm, *J. Neurochem.*, **10**, 613 (1963).
- 2) J. Folch, M.B. Lees, G.H.S. Stanly, *J. Biol. Chem.*, **226**, 497 (1957).
- 3) R.W. Ledeen, R.K. Yu, L.F. Eng, *J. Neurochem.*, **21**, 829 (1973).
- 4) S. Ando, H. Waki, K. Kon, Y. Kishimoto, "Up-to-date chromatography of gangliosides" (edited by H. Rahman), Springer-Verlag Berlin Heidelberg (1987), p. 167.
- 5) H. Waki, K. Kon, Y. Tanaka, S. Ando, *Anal. Biochem.*, **222**, 156 (1994).
- 6) 中尾 徹, 平林義雄, ガングリオシド研究法 I (鈴木康夫・安藤進編), 学会出版センター, P. 31.
- 7) Y. Hirabayashi, T. Nakao, M. Matsumoto, *J. Chromatogr.*, **445**, 377 (1988).
- 8) S. Ando, H. Waki, K. Kon, *J. Chromatogr.*, **408**, 285 (1987).
- 9) H. Waki, A. Murata, K. Kon, K. Maruyama, S. Kimura, S. Ando, *J. Biochem.*, **113**, 502 (1993).
- 10) H. Waki, A. Masuzawa, K. Kon, S. Ando, *J. Biochem.*, **114**, 459 (1993).
- 11) S. Ando, H. Waki, K. Kon, *J. Chromatogr.*, **405**, 125 (1987).
- 12) S. Ando, N.-C. Chang, R.K. Yu, *Anal. Biochem.*, **89**, 437 (1978).
- 13) L. Svennerholm, *Biochem. Biophys. Acta*, **24**, 604 (1957).
- 14) Y. Hirabayashi, M. Hirota, Y. Suzuki, M. Matsumoto, K. Obata, S. Ando, *Neurosci. Lett.*, **106**, 193 (1989).
- 15) M. Igarashi, H. Waki, S. Saito, Y. Komiya, S. Ando, *Dev. Brain Res.*, **78**, 17 (1994).
- 16) D.A. Cheresch, A.P. Varki, N.M. Varki, W.B. Stallcup, J. Levine, R.A. Reisfeld, *J. Biol. Chem.*, **259**, 7453 (1984).
- 17) J.N. Ye, N.-K. V. Cheung, *Int. J. Cancer*, **50**, 197 (1992).
- 18) G. Marquina, H. Waki, L.E. Fernandez, K. Kon, A. Carr, O. Valiente, R. Perez, S. Ando, *Cancer Res.*, **56**, 5165 (1996).
- 19) S. Sonnino, R. Ghidoni, V. Masserini, G. Tettamanti, *Anal. Biochem.*, **128**, 104 (1983).
- 20) M. Kotani, H. Ozawa, I. Kawashima, S. Ando, T. Tai, *Biochem. Biophys. Acta*, **1117**, 97 (1992).
- 21) H. Ozawa, M. Kotani, I. Kawashima, T. Tai, *Biochem. Biophys. Acta*, **1123**, 184 (1992).
- 22) M. Kotani, I. Kawashima, H. Ozawa, T. Terashima, T. Tai, *Glycobiology*, **3**, 137 (1993).
- 23) F. Irie, T. Hashikawa, T. Tai, Y. Seyama, Y. Hirabayashi, *Brain Res.*, **665**, 161 (1994).
- 24) S. Ando, Y. Hirabayashi, K. Kon, F. Inagaki, S. Tate, V.P. Whittaker, *J. Biochem.*, **111**, 287 (1992).
- 25) Y. Hirabayashi, T. Nakao, F. Irie, V.P. Whittaker, K. Kon, S. Ando, *J. Biol. Chem.*, **267**, 12973 (1992).
- 26) H. Higashi, Y. Hirabayashi, Y. Fukui, M. Naiki, M. Matsumoto, S. Ueda, S. Kato, *Cancer Res.*, **45**, 3796 (1985).
- 27) T.M. Kloppel, D.J. Morré, *J. Natl. Cancer Inst.*, **64**, 1401 (1980).
- 28) R.K. Yu, R.W. Ledeen, *J. Lipid Res.*, **11**, 506 (1970).
- 29) M. Karas, F. Hillenkamp, *Anal. Biochem.*, **60**, 2299 (1988).
- 30) E. Sugiyama, A. Hara, K. Uemura, T. Taketomi, *Glycobiology*, **7**, 719 (1997).
- 31) 岩森正男, ガングリオシド研究法 I, (鈴木康夫・安藤進編), 学会出版センター, p. 177.
- 32) T. Mutou, A. Tokuda, T. Miyadai, M. Hamaguchi, N. Fujiki, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 5087 (1995).
- 33) M. Ito, T. Yamagata, *J. Biol. Chem.*, **264**, 9510 (1989).
- 34) K. Muramoto, M. Kawahara, K. Kobayashi, M. Ito, T. Yamagata, Y. Kuroda, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **202**, 398 (1994).
- 35) A. Wieraszko, W. Seifert, *Brain Res.*, **354**, 159 (1985).
- 36) H. Furuse, H. Waki, Kaneko, S. Fujii, M. Miura, H. Sasaki, K. Ito, H. Kato, S. Ando, *Exp. Brain Res.* (1998, in press), "Effect of mono- and tetrasialogangliosides, GM1 and GQ1b, on long-term potentiation in the CA1 hippocampal neurons of the guinea pig".

[総説]

異なった濃度の高度不飽和脂質に対する
リパーゼの基質特異性分析

小 杉 佳 次

生命工学工業技術研究所分子生物部 (〒305-8566 つくば市東 1-1)

微生物リパーゼ、膵臓リパーゼ及び膵臓リパーゼとアミノ酸配列の似た相同タンパクの界面活性化、基質特異性及び帽子のように被う短い螺旋構造の lid 領域等の機能について、結晶構造解析結果を参考にして説明した。トリアシルグリセリンの *sn*-1, *sn*-2 及び *sn*-3 に作用するリパーゼの位置特異性について述べると共に、脂肪酸特異性を決定する方法について検討した。異なった物理状態にある脂質を、*Rizomucor miehei* リパーゼがどのように認識するかを解析するために、1 mM 及び 100 mM の脂肪酸あるいはエステルを基質として、エステル合成あるいは分解を行った。脂肪酸特異性分析は、可溶性酵素及び固定化酵素の初速度及び特異性定数（みかけの最大速度/ミカエリス定数）を比較した。グルタルアルデヒドを用いて陰イオン交換樹脂、あるいは、カルボジイミドを用いて陽イオン交換樹脂に固定化したものの、1 mM の基質に対する活性がより高かった。しかし、上記のような二価性反応試薬の活性化は 100 mM の基質に対する活性には観察されなかった。1 mM の基質で界面活性化は起こらないので二価性反応試薬により *R. miehei* の lid 領域の塩基性アミノ酸が修飾され活性化されたが、100 mM の基質では界面活性化が起こっているので二価性反応試薬により活性化されなかったと考えた。上記のような比較には加水分解反応の分析は酵素の初速度が有効であったが、エステル化反応の分析は特異性定数が有効であった。

(連絡者：小杉佳次) Vol. 47, No. 10, 000 (1998)

[総説]

ガングリオシドの構造と機能の分析

脇 初 枝

東京都老人総合研究所生体膜部門 (〒173-0015 東京都板橋区栄町 35-2)

微量ガングリオシド調製法の開発により、脳シナプス膜や少量癌組織のガングリオシドの定量的分析ができるようになった。質量分析法や核磁気共鳴の進歩は、これらの機器分析を、新しく発見されたガングリオシドの構造解析に不可欠のものとした。抗ガングリオシド抗体をプローブとする免疫化学的手法は、特異的で感度の高いガングリオシド検出を可能にし、ガングリオシドの脳内分布をみたり、癌組織に特異的に発現するガングリオシドを検出するのに有用な手段である。これらの分析手段を駆使して得られた情報は、ガングリオシドの機能研究に提供され、ガングリオシドの機能調節因子としての役割の解明が進展しつつある。

(連絡者：脇 初枝) Vol. 47, No. 10, 000 (1998)