薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
118 (10) 431-446 (1998)

神経系における細胞接着分子とこれに特異的に発現する
糖鎖の分子生物学的研究

岡 昌吾

京都大学薬学部, 〒606-8501 京都市左京区吉田下阿達町

**Molecular Biological Approach to Functions of Telencephalin,
a Cell Adhesion Molecule and HNK-1 Carbohydrate Epitope,
Which Is Commonly Expressed on Cell Adhesion
Molecules in the Nervous System**

Shogo OKA

*Department of Biological Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Kyoto University, Shimoadachi, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan*

(Received July 6, 1998)

Cell surface carbohydrates modulate a variety of cellular functions, including recognition and adhesion. The HNK-1 carbohydrate epitope, which is recognized by the monoclonal antibody HNK-1, is specifically expressed on a series of cell adhesion molecules and also on some glycolipids in the nervous system over a wide range of species from insect to mammal. The HNK-1 epitope is spatially and temporally regulated during the development of the nervous system and associated with neural crest cell migration, neuron to glial cell adhesion, outgrowth of astrocytic processes and migration of cell body, as well as the preferential outgrowth of neurites from motor neurons. These observations together with the unusual chemical nature of the HNK-1 epitope, namely a non-reducing terminal 3-sulfoglucuronic acid residue, prompted us to study the biosynthesis of the HNK-1 epitope, in which a unique glucuronyltransferase(s) plays a key role. We found that the respective glucuronyltransferases are involved in the biosynthesis of the HNK-1 epitope on glycoproteins (GlcAT-P) and on glycolipids (GlcAT-L). Then, we isolated a novel glucuronyltransferase (GlcAT-P) specific for glycoprotein substrates and its cDNA from the rat brain. The primary structure deduced from the cDNA sequence predicted a type II transmembrane protein with 347 amino acids. Transfection of the GlcAT-P cDNA into COS-1 cells induced not only expression of the HNK-1 epitope on the cell surface but also marked morphological changes of the cells, suggesting that the HNK-1 epitope was associated with the cell-substratum interaction. The GlcAT-P cDNA obtained in this study will be a useful molecular tool to open the way for further steps in the elucidation of the biological function of the HNK-1 carbohydrate epitope in the development of the nervous system.

本総説は、平成10年度日本薬学会奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

Key words—HNK-1 carbohydrate epitope; cell adhesion molecule; glucuronyltransferase

はじめに

神経系の特徴は形態的にも機能的にも異なる多種多様な細胞が存在するにもかかわらず、それぞれの細胞が互いに相手を認識し、正確な神経回路を形成している点にある。このような正確な回路形成には様々な分子が関与していると考えられるが、そのなかでも細胞表面上に存在し、細胞相互の接着や認識に関与する分子がとりわけ重要な位置を占めていると考えられている。筆者はまず、このような細胞接着分子のうち終脳特異的に発現する分子 (telencephalin) の精製、生化学的性質の解析を中心に研究を進めた。その研究過程において本分子には、HNK-1糖鎖抗原と呼ばれる特徴的な糖鎖が発現していることが明らかとなった。そこで、神経回路形成を分子レベルで総合的に理解するためには、細胞接着現象をタンパク質の面からのみならず、それらに特異的に発現している糖鎖の面からも解析を行う必要があると考えた。近年、糖鎖は機能を持った分子として注目を集めており、タンパク質、核酸に次ぐ第3の“鎖”である糖鎖が、細胞-細胞間の相互作用、細胞-細胞外基質間の接着、あるいは細胞の増殖、分化といった生命機能の最も根本的な現象にきわめて重要な役割を持っていることが報告され始めている。これら糖鎖のなかでも単クローン抗体 HNK-1¹⁾によって認識される HNK-1糖鎖抗原は、N-アセチルラクトサミン構造に硫酸化されたグルクロン酸が結合しているという、きわめて特徴的な構造を持つ糖鎖 (Fig. 1) で、NCAM (neural cell adhesion molecule), MAG (myelin-associated glycoprotein), L1, telencephalin などの免疫グロブリンスーパーファミリーに属する細胞接着分子²⁻⁴⁾やある種の糖脂質, SGGL (sulfo-glucuronyl-glycolipid) に発現している。⁵⁾ 本糖鎖抗原は、神経系において時期特異的、領域特異的な発現様式を示すことから、^{6,7)} 神経回路網形成における細胞間相互作用への関与が示唆されている。事実、神経冠細胞の移動や運動神経細胞からの神経突起の伸展、神経細胞-グリア細胞間の接着といった現象に、この HNK-1糖鎖抗原が深く関与しているという報告がされている。^{8,9)} そこで、本抗原分子の細胞間相互作用における生物学的役割を分子レベルで明らかにすることを目的として、その生合成の調節酵素であるグルクロン酸転移酵素について研究を行った結果、ラット脳内に糖タンパク質及び糖脂質を基質とする2種の新規なグルクロン酸転移酵素が存在していることを見いだした。次に糖タンパク質に対するグルクロン酸転移酵素についてラット脳より均一にまで精製し、その部分

○ Glycolipids

Chou, D. K. H. et al (1986) J. Biol. Chem. **261**, 11717-11725

○ Glycoproteins

Voshol, H., et al (1996) J. Biol. Chem. **271**, 22957-22960

Fig. 1. Structure of HNK-1 Carbohydrate Epitopes

アミノ酸配列をもとに cDNA を単離することに成功した。以下これらの結果について詳述する。

1. 神経系における細胞接着分子に関する研究

哺乳動物の脳は初期の発生過程において5つの脳胞（終脳、間脳、中脳、後脳、髄脳）より形成されることが知られている。最も吻側側の終脳は、大脳皮質や海馬などを含む領域で、高等生物になるに従いその容積が増大する脳であり、学習、記憶などと深く関係のあることが知られている。ところがこのような領域は形態的な特徴によってのみ区別されていただけで、分子レベルでの区別は全くなされていなかった。1987年に森らは、ウサギ嗅球の膜画分を免疫源としウサギ終脳を特異的に認識する単クローン抗体 271A6 抗体を得ていた。¹⁰⁾ しかしこの抗体はウサギ以外の哺乳動物終脳を認識しなかったことなどから、抗原分子に対する解析がほとんどなされていなかった。

そこで筆者は 271A6 抗体の認識する抗原分子の生化学的性質について調べるために、まず 271A6 抗体を樹脂に結合させた抗体カラムを用いて、ウサギ終脳膜画分より抗原分子を均一にまで精製した。精製分子を還元条件下で SDS (sodium dodecyl sulfate)-PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis) によって解析した結果、125 kDa を示すタンパク質であることが明らかとなった (Fig. 2)。また N-グリカナゼ処理により N-結合型糖鎖を除去したところ、その分子量が 107 kDa に減少したことから、分子内に N-結合型糖鎖を持つことが明らかとなった。先にも述べたように 271A6 抗体がウサギ以外の動物に反応性を示さなかったことから、271A6 抗体の認識する抗原分子がウサギだけに特異的に発現する分子であるのか、又は種を越えて共通に存在する分子であるのか、あるいは抗原分子自身は脳全体に存在するにもかかわらず、終脳特異的に修飾されたもの（例えば糖鎖）を 271A6 抗体が認識しているのかが不明であった。そこで、精製物を免疫源としてポリクローナル抗体を作製し、種々の哺乳動物の脳を用いて免疫組織染色により解析した。その結果、本抗原分子はウサギのみならず哺乳動物一般に終脳特異的に存在するタンパク質分子であることが明らかとなった (Fig. 3)。¹¹⁾ そこで本分子を終脳 (telencephalon) 特異的タンパク質, telencephalin と名づけた。またこの抗体を用いて免疫電顕で解析した結果、本分子は神経細胞の軸索には発現せず、細胞体と樹状突起にのみに発現することが明らかとなった。¹²⁾ さらに精製したテレンセファリンの部分アミノ酸配列の情報をもとに、その cDNA クローニングに成功した。その結果、telencephalin は免疫グロブリンスーパーファミリーに属する細胞接着分子であることが明らかとなった。⁴⁾ 神経回路形成において神経細胞はその軸索が次の標的神経細胞

Fig. 2. SDS-PAGE of Purified Telencephalin

The purified telencephalin under reducing (+) and non-reducing conditions (-) was loaded on a 4–20% gradient polyacrylamide gel. Protein was stained with Coomassie brilliant blue R-250.

Fig. 3. Immunofluorescence Staining of a Horizontal Section of Adult Mouse Brain with Polyclonal Anti-telencephalin Antibody

Telencephalin is specifically expressed in telencephalic regions of adult mouse brain.

の樹状突起とシナプスを形成する。これまでに知られていた細胞接着分子は、そのほとんどすべてが軸索に存在していた。したがって、神経回路形成機構を考える上からも樹状突起に存在する細胞接着分子の発見は注目を集めている。さらに終脳は先にも述べたように学習や記憶等の脳の高次機能にかかわる領域であることから、終脳に特異的に発現する telencephalin と脳の高次機能との関係の解明が期待されている。

2. 細胞接着分子に特異的に発現する糖鎖に関する研究

NCAM は最も研究の進んでいる細胞接着分子の 1 つである。NCAM にはポリシアル酸と呼ばれる糖鎖が特異的に発現しており、このポリシアル酸が NCAM-NCAM のホモフィリックな結合を制御していることが知られていた。上記の研究を進める過程において、telencephalin にも HNK-1 糖鎖抗原と呼ばれる特殊な糖鎖が発現していることが明らかとなった。筆者は神経回路形成の機構を解明するには細胞接着分子のみならずこれに特異的に発現する糖鎖に関しても研究を進める必要性を強く感じた。事実、本糖鎖抗原は telencephalin だけでなく神経系に存在する細胞接着分子の多くに、共通して発現している¹³⁾ ことから細胞接着と本糖鎖抗原の関

係が注目を集めていた。また、HNK-1 糖鎖抗原は、神経回路形成期に高発現されることや、神経細胞の移動や接着、神経突起伸長に重要な働きを示すことなどが、HNK-1 抗体を用いた実験から示されていた。しかし、これらの実験だけでは神経系における HNK-1 糖鎖抗原の機能を完全に理解するためには不十分であると考えられた。そこで、本糖鎖抗原の機能を分子レベルで解明するためにその生合成酵素に着目して研究を進めた。

2-1. HNK-1 糖鎖抗原の生合成に関与するグルクロン酸転移酵素活性測定法の確立

HNK-1 糖鎖抗原は、糖タンパク質、糖脂質、いずれの場合も糖鎖の非還元末端に存在する Gal β 1-4GlcNAc, いわゆる *N*-アセチルラクトサミン構造に硫酸化グルクロン酸が結合した特徴的な構造を持つ。^{5, 14)} したがって、神経系には *N*-アセチルラクトサミン構造を認識してグルクロン酸を転移する、グルクロン酸転移酵素が存在することが予想された。そこで、HNK-1 糖鎖抗原の生合成に関与するグルクロン酸転移酵素を見だし、その性質を明らかにする目的で、糖鎖末端に *N*-アセチルラクトサミン構造を持つ、合成糖脂質、nLc-PA14(ネオラクト-テトラオース-フェニルアルキル誘導体)、及び糖タンパク質、ASOR(アシアロオロソムコイド)を糖受容体として用い、糖供与体としては UDP (uridine 5'-diphosphate)-[¹⁴C]-GlcA を用いて、糖タンパク質、及び糖脂質に対する新しいグルクロン酸転移活性測定法を確立した。酵素源としては HNK-1 糖鎖抗原が高発現していることの知られている、生後 14 日齢のラット脳の膜画分を 2%NP-40 (Nonidet P-40) で可溶化したものを用いた。

2-2. 糖脂質に対するグルクロン酸転移酵素の性質 まず、糖脂質に対するグルクロン酸転移酵素活性の pH 依存性について検討したところ、MES (2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid) 緩衝液や酢酸緩衝液において pH 4.0 から pH 4.5 で最も活性化されることが判明した。また、この至適 pH は用いる緩衝液の種類によっても変化し、カコジル酸緩衝液においては、pH 6.0 において最も活性化された。本酵素活性は EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) の添加により完全に消失することから、他の多くの糖転移酵素と同様に二価カチオンを活性発現に必要とすることが考えられた。そこで、種々の二価カチオンの本酵素活性に対する影響を検討したところ、Mn²⁺ イオンによって最も活性化されることが判明した。また本酵素は Zn²⁺ イオン、Mg²⁺ イオンによっても、Mn²⁺ イオンのそれぞれ 64%、16% の活性を示したが、Cu²⁺ イオン、Ca²⁺ イオン、Ba²⁺ イオンによっては、ほとんど活性化されなかった (Fig. 4)。さらに本酵素の活性化に必要な Mn²⁺ イオンの濃度を検討したところ、終濃度で 10 mM 付近で最も活性化され、それ以上の濃度では逆に阻害作用を受けることが判明した。つぎに、糖受容体 nLc-PA14, 糖供与体 UDP-GlcA の濃度を換えて活性を測定したところ、反応は両基質の濃度依存的に変動した。これを Lineweaver-Burk プロットにより解析したところ、本酵素の nLc-PA14, UDP-GlcA に対する *K_m* 値はそれぞ

Fig. 4. Effect of Divalent Cations on Rat Brain Glucuronyltransferase Specific for Glycolipids

The reaction mixture contained the following components in a final volume of 50 μ l; nLc-PA14, 7.5 nmol; UDP-[¹⁴C]-GlcA, 5 nmol (2.6×10^7 counts/min/ μ mol); NP-40 extract of rat brain, 150 μ g; MES buffer, pH 4.5, 10 μ mol; divalent cations (Mn²⁺, Zn²⁺, Mg²⁺, Cu²⁺, Ca²⁺, Ba²⁺), 0.5 μ mol; ATP, 0.5 μ mol. The mixture was incubated for 3 h at 37°C. The amount of [¹⁴C]-GlcA transferred to the acceptor was assayed.

Fig. 5. Dependence of Rat Brain Glucuronyltransferase Specific for Glycolipids on the Concentration of Donor and Acceptor Substrates

NP-40 extract of rat adult brain was used as enzyme source. Various concentrations of UDP- ^{14}C -GlcA (A) and nLc-PA14 (B) were added to the standard assay mixture, and assayed under standard conditions. The inset shows the data analyzed with Lineweaver-Burk's plot.

れ $400\mu\text{M}$, $200\mu\text{M}$ と算出された (Fig. 5).¹⁵⁾ HNK-1 糖鎖抗原は硫酸化グルクロン酸が *N*-アセチルラクトサミン構造に結合していることから、その生合成にかかわるグルクロン酸転移酵素は、糖受容体として *N*-アセチルラクトサミン構造を厳密に認識していることが考えられる。そこで、本酵素の糖受容体特異性を、nLc-PA14 の代わりに種々の糖脂質を用いることによって検討した。本酵素は生体内での基質である paragloboside に対しては、nLc-PA14 と同様によく反応したが、糖鎖末端の 2 糖が $\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}$ ではなく $\text{Gal}\beta 1-3\text{GlcNAc}$ である合成糖脂質、Lc-PA14 に対しては全く反応性を示さなかった。このことは、本酵素が糖鎖末端の *N*-アセチルラクトサミン構造を正確に認識し、グルクロン酸を転移していることを示している。さらに本酵素活性のラットにおける組織分布を検討したところ、本酵素活性は脳に特異的な発現がみられ、胸腺、脾臓、坐骨神経線維、肺には見いだせなかった (Fig. 6)。以上のように本酵素活性は糖受容体である nLc-PA14 の糖鎖の非還元末端にある *N*-アセチルラクトサミン構造を厳密に

認識すること、また HNK-1 糖鎖抗原の発現する脳に特異的に見いだされたことから、本酵素は糖脂質上の HNK-1 糖鎖抗原の生合成にかかわるグルクロン酸転移酵素であると考えられた。

2-3. 糖タンパク質に対するグルクロン酸転移酵素の性質

糖タンパク質に対するグルクロン酸転移活性の測定には、糖受容体としては、比較的手に入りやすく、糖含量が豊富で糖鎖末端に *N*-アセチラクトサミン構造を持つアシアロオロソムコイド (ASOR) を用いた。¹⁶⁾ ASOR に対するグルクロン酸転移活性は、用いる緩衝液の pH によって変動し、最大活性は、pH 6.5 の MES 緩衝液で得られた。また、本酵素は、二価カチオンを要求し、最大活性は終濃度 20 mM の Mn^{2+} イオンの添加により得られた。それ以外の二価カチオンでは、 Co^{2+} イオン、 Mg^{2+} イオンがそれぞれ Mn^{2+} イオンの 20%, 14% の活性を示したが、 Ca^{2+} イオン、 Ba^{2+} イオン、 Ni^{2+} イオン、 Cu^{2+} イオン、 Zn^{2+} イオンでは本酵素は活性化されなかった (Table 1)。ASOR、あるいは UDP-GlcA の濃度を変えることによって活性は両基質の濃度依存的に変化した。これを Lineweaver-Burk プロットし、ASOR, UDP-GlcA に対する K_m 値を求めたところ、それぞれ 1.9 μM , 22 μM であることが明らかとなった (Fig. 7)。¹⁷⁾ このように、糖タンパク質に対するグルクロン酸転移活性の酵素学的性質は、pH 依存性、両基質との親和性などにおいて、糖脂質に対する転移活性とは大きく異なっており、両活性が異なるグルクロン酸転移酵素によって触媒されていることを示しているように思われた。そこで、本酵素の基質特異性を阻害実験により検討した (Table 2) と、本酵素

Fig. 6. Tissue Distribution of Rat Brain Glucuronyltransferase Specific for Glycolipids

The homogenates of various tissues from adult rat were used as enzyme source (100–360 μg protein). UDP- $[^{14}C]$ -GlcA (5 nmol, 2.6×10^7 counts/min/ μmol) was added to the standard assay mixture. BR, brain; LI, liver; KI, kidney; TH, thymus; SP, spleen; SN, sciatic nerve fiber; LU, lung.

Table 1. Effect of Divalent Cations on the Rat Brain Glucuronyltransferase Specific for Glycoproteins

The glucuronyltransferase activity of rat brain NP-40 extract was assayed in the presence of various divalent cations (Mn^{2+} , Ca^{2+} , Ba^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} ; 20 mM). The glucuronyltransferase activity is expressed as the relative change compared to the value in the presence of Mn^{2+} as 100%.

Cation	% of activity
Mn^{2+}	100
Ca^{2+}	0.9
Ba^{2+}	0.5
Co^{2+}	19.3
Ni^{2+}	0
Cu^{2+}	1.6
Zn^{2+}	0
Mg^{2+}	13.5

Table 2. Acceptor Specificity of the Rat Brain Glucuronyltransferase Specific for Glycoproteins

The incorporation of $[^{14}C]$ -GlcA to ASOR was measured in the presence of various inhibitors. Data are the mean values of three determinations in a representative experiment.

Inhibitors (concentration)	Inhibition (%)
ASOR-GP (1.5 mg/ml)	89.6
AGOR-GP (1.5 mg/ml)	5.1
<i>N</i> -Acetyllactosamine (5 mM)	82.8
Lacto- <i>N</i> -biose (5 mM)	0.0
nLc-PA14 (5 mM)	23.7
Heparin (1.0 mg/ml)	88.9
Heparan sulfate (1.0 mg/ml)	35.6
Hyaluronic acid (1.0 mg/ml)	9.5
Chondroitin (1.0 mg/ml)	0.0

Fig. 7. Dependence of Rat Brain Glucuronyltransferase Specific for Glycoproteins on the Concentration of Donor and Acceptor Substrates

Different concentration of (A) UDP-[^{14}C]-GlcA; (B), ASOR were added to the standard assay mixture, and incubated for 3 h at 37°C. The inset shows the data analyzed with a Lineweaver-Burk's plot.

活性は ASOR のタンパク質部分を protease で分解してバラバラにした糖ペプチド, ASOR-GP (アシアロオロソムコイド-糖ペプチド) で大きく阻害されるのに対し, ASOR-GP からさらに末端ガラクトースを取り除いた AGOR-GP (アガラフトオロソムコイド-糖ペプチド) によっては, ほとんど阻害されなかった。また, 2 糖 *N*-アセチルラクトサミン (Gal β 1-4GlcNAc) によっても活性は大きく阻害されたのに対し, 2 糖ラクト *N*-ビオース (Gal β 1-3GlcNAc) によっては, 全く阻害されなかった。このことは, 本酵素が糖鎖末端の *N*-アセチルラクトサミン構造を正確に認識していることを示している。さらに本酵素は, 糖脂質性の糖受容体である nLc-PA14 によってもそれほど強い阻害を受けず, 糖脂質に対しては糖鎖末端に *N*-アセチルラクトサミン構造を持っていたとしても反応できないことが示唆された。また, 本酵素活性のラットの各組織における分布を検討したところ, Fig. 8 に示すように脳, 坐骨神経線維など神経系組織に特異的に見いだされ, 肝臓, 腎臓, 胸腺, 脾臓, 肺には見いだせなかった。以上のように本酵素

活性は糖供与体である ASOR の糖鎖の非還元末端にある *N*-アセチルラクトサミン構造を厳密に認識すること, また HNK-1 糖鎖抗原の発現する中枢及び末梢神経系に特異的に見いだされたことから本酵素は糖タンパク質上の HNK-1 糖鎖抗原の生合成にかかわるグルクロン酸転移酵素であると考えられた。

2-4. 糖脂質に対するグルクロン酸転移酵素と糖タンパク質に対する酵素の分離

糖脂質, 糖タンパク質を糖受容体とする両グルクロン酸転移活性測定法を用いた実験から, 糖脂質に対するグルクロン酸転移活性は, 糖受容体として脂質部分も強く認識し, 糖タンパク質に対する活性は, 糖脂質に対しては, 反応性を示さないことが示唆された。さらに, 両糖受容体に対するグルクロン酸転移活性は pH 依存性や, 二価カチオン要求性, さらに両基質との親和性

の指標となる K_m 値などの酵素学的性質において, 互いに異なる性質を示したことから, 両活性が異なるグルクロン酸転移酵素によって触媒されていると考えられた。そこで, 筆者は, これを証明するために, 両グルクロン酸転移酵素の分離を試みた。前述したように, 両グルクロン酸転移酵素の共通の糖供与体である UDP-GlcA に対する親和性は互いに異なり, 糖タンパク質に対する酵素の方が, より親和性が高いと考えられた。そこで, 両酵素の UDP-GlcA に対する親和性の違いを用いて分離を行うため, UDP-GlcA を Sepharose 6B に固定化した UDP-GlcA Sepharose 6B アフィニティークロマトグラフィーを行った。ラット脳の 2% NP-40 抽出物を, この UDP-GlcA-Sepharose 6B に通し, その非結合画分と, 1 M NaCl, 10 mM EDTA を含む緩衝液で溶出した溶出画分の両方を, 糖脂質, 糖タンパク質, 両方の活性測定法で検討したところ, 糖脂質に対する活性は, ほぼ素通り (97.4%) していたのに対し, 糖タンパク質に対する活性は主に溶出画分に回収 (62.5%) された (Fig. 9).¹⁷⁾ したがって, 糖脂質, 糖タンパク質に対するそれぞれのグルクロン酸転移酵素が, UDP-GlcA アフィニティークロマトグラフィー

Fig. 8. Distribution of the Rat Glucuronyltransferase Specific for Glycoproteins in 4-Week-Old-Rat Tissues

The glucuronyltransferase activity of NP-40 extract of various tissues was measured under standard conditions using ASOR as acceptor substrate. WB, whole brain; LI, liver; KI, kidney; SN, sciatic nerve fibers; TH, thymus; SP, spleen; LU, lung.

Fig. 9. Separation of Two Glucuronyltransferases by UDP-GlcA-Sepharose 6B Chromatography

NP-40 extract of rat brain was applied onto UDP-GlcA-Sepharose 6B column (1 ml). The glucuronyltransferase activity was measured using two different acceptors (ASOR and nLc-PA14) for the effluent and eluate fractions.

によって分離されたことから、ラット脳には HNK-1 糖鎖の生合成に関与するグルクロン酸転移酵素が少なくとも 2 種類存在することが示された。

2-5. 糖タンパク質性 HNK-1 糖鎖抗原の生合成に係わるグルクロン酸転移酵素の精製及びその性質 ラット脳内には HNK-1 糖鎖抗原の生合成に係わるグルクロン酸転移酵素として、糖タンパク質を糖受容体とするもの (GlcAT-P) と、糖脂質に対するもの (GlcAT-L) の 2 種類が存在していると考えられた。そこでまず、糖受容体、糖供与体との親和性が高く比較的精製しやすいと考えられる糖タンパク質を糖受容体とするグルクロン酸転移酵素 (GlcAT-P) に焦点を絞り、最も活性の高い生後 14 日齢のラット大脳から単離精製を試みた。精製は、Fig. 10 に示すような手順で行った。ラット大脳の膜画分を非イオン性界面活性剤である NP-40 で処理することによりグルクロン酸転移酵素を可溶化し (NP-40 抽出物)、CM-Sepharose CL-6B による陽イオン交換クロマトグラフィー、UDP-GlcA Sepharose 4B, ASOR Sepharose 4B, Dye matrix gel blue A によるアフィニティークロマトグラフィー、Mono Q による陰イオン交換クロマトグラフィー、Hitrap chelating による金属イオンキレートクロマトグラフィー、Hitrap heparin によるアフィニティークロマトグラフィーの手法を順次用いた。GlcAT-P は生後 14 日齢のラット (2400 匹) 前脳膜画分の 0.5% NP-40 抽出物を出発材料として、約 120 万倍に精製された。活性の最終的な回収率は約 4.0% であった。得られた精製酵素標品を還元条件下で SDS-PAGE で解析した結果を Fig. 11 に示す。約 45 kDa の位置にほぼ単一のバンドが検出さ

Fig. 10. Purification Procedure for GlcAT-P from Rat Brain

れることから、本酵素は、45 kDa の単一のポリペプチドから形成されていると考えられる。¹⁸⁾ また、精製酵素標品をゲルろ過カラムである Superose 12 カラムクロマトグラフィーにより解析したところ、グルクロン酸転移活性は、45 kDa の位置ではなく、その2倍量に相当する、約90 kDa の位置に溶出されたことから、本酵素は生体内で45 kDa のサブユニットの2量体として存在していると考えられた。

2-6. グルクロン酸転移酵素 cDNA の単離、及びその構造解析 ラット脳内から単離された糖タンパク質に対するグルクロン酸転移酵素 (GlcAT-P) は、その分子量、酵素学的性質から全く新規なグルクロン酸転移酵素であると思われる。しかし、生体内に極微量にしか含まれていないことから、本酵素のさらに詳細な酵素学的、タンパク質化学的性質を解明するのは非常に困難であると思われた。また、他のグルクロン酸転移酵素、あるいは糖転移酵素間との比較を行い、HNK-1 糖鎖抗原の生合成機構、生理的機能を明らかにするためにも本酵素 cDNA を単離し、その構造を明らかにする必要があると思われた。そこで、精製した酵素標品のタンパク質の部分アミノ酸配列を基に、本酵素 cDNA の単離、及びその構造解析を行った。

GlcAT-P の cDNA の単離は、精製酵素標品のアミノ酸配列を基に cDNA ライブラリーをスクリーニングすることにより行った。まず、精製酵素標品をトリプシン消化し、生じたペプチド断片についてそのアミノ酸配列を解析した。その結果、14 のペプチド断片について、そのアミノ酸配列が決定された。得られた14のペプチドのうち、3つのペプチド断片を選び、推測される塩基の縮重度が比較的少ない位置を選んで対応する縮重オリゴヌクレオチドを合成した。これらの縮重オリゴヌクレオチドをプライマーとして RT-PCR を行ったところ、大脳皮質、小脳から調製した mRNA にのみ検出され、肝臓には認められない410 bp の DNA フラグメントが増幅された。次にこの DNA フラグメントを用いて胎生18日のラット脳 cDNA ライブラリーをスクリーニングした。5×10⁵ 個のフェージをスクリーニングした結果、8個の独立した陽性クローンを得た。これらのクローンは、互いに重複する部分において、その塩基配列が完全に一致することから、同じ遺伝子に由来するものと考えられた。ところが、得られた8つのクローンは、いずれも翻訳領域を含む5'側領域を欠いており、これらクローンの解析だけでは全アミノ酸一次構造を推測することが不可能であった。そこで、RACE 法 (迅速 cDNA 増幅法, Rapid amplification of cDNA ends) を用いて、¹⁹⁾ 非翻訳領域を含む5'側領域の配列を単離した。その結果、5', 3' 側非翻訳領域を含む全長2090 bp の塩基配列が明らかとなった。²⁰⁾ Fig. 12 にその塩基配列と、それから推測されるアミノ酸配列を示す。翻訳開始のメチオニンは Kozak の法則²¹⁾ から推定した。つまりこの DNA は、塩基番号1のメチオニンから1041塩基に存在する終止コドンまでの347アミノ酸をコードしているものと考えられた。その予想分子量は

Fig. 11. SDS-PAGE of Rat GlcAT-P Obtained in the Last Step of the Purification

Eluate fractions of Hitrap Heparin 2nd. column chromatography were concentrated by Centricon-30 (Amicon) and electrophoresed under reducing conditions. Arrows indicated the positions of the following molecular mass standards: phosphorylase b (94 kDa), bovine serum albumin (67 kDa), ovalbumin (43 kDa), carbonic anhydrase (30 kDa), and soybean trypsin inhibitor (20.1 kDa).

Fig. 12. Nucleotide and Deduced Amino Acid Sequences of the GlcAT-P

The distribution of hydrophobic and hydrophilic regions were analyzed by the method of Hopp and Woods.²²⁾

39706 Daであり、分子内に3ヶ所のN型糖鎖付加領域を持つことを考えれば、精製酵素のSDS-PAGEより求めた分子量45 kDaに非常に近い値を示した。また、予想されるアミノ酸配列にはペプチドシーケンサーにより解析された14種、すべてのペプチドの配列が存在していることから、このcDNAは精製したGlcAT-Pをコードしているものと考えられた。

さらに、ハイドロパシー分析²²⁾の結果 (Fig. 13), アミノ酸番号20から37までの領域は、非常に疎水性が高く、膜貫通領域を形成していると考えられた。また、N末端には、シグナル配列と思われる疎水性に富んだ領域が見られないことから、GlcAT-Pは他の糖転移酵素と同様、N末端を細胞質側に向けたII型の膜貫通タンパク質であると考えられた。^{23, 24)} また、この膜貫通領域のすぐC末端側には、比較的プロリンアミノ酸が多く存在しており、特に図中両矢印で示した38番目のトリプトファンから109番目のプロリンまでの約70アミノ酸においては約15%のアミノ酸がプロリンであった。このようなプロリンに富む領域は、他のいくつかの糖転移酵素においても見つかっており、膜貫通領域と活性領域とを結ぶ、ネック領域を形成していると考えられている。^{25, 26)} 現在までに幾つかの糖転移酵素がクローニングされその構造が明らかにされている。そこで、本酵素と肝臓や嗅上皮に存在し解毒に関与するグルクロン酸転移酵素、あるいは他の糖転移酵素との相同性を検討したところ、有意な類似性は見いだせなかった。したがって、本酵素は全く新規な糖転移酵素遺伝子であることが明らかとなった。

次に、得られたcDNAを培養細胞に導入することにより発現されたタンパク質が、グルクロン酸転移活性を持っているかどうかについての確認を行った。まず、グルクロン酸転移活性の検出を行うため、活性領域を含むと考えられる75番目のアスパラギン酸から347番目のイソロイシンまでの領域をprotein Aと結合させた分泌性融合タンパク質をCOS-1細胞に発現させた。培養後の培養上清の糖タンパク質に対するグルクロン酸転移活性を測定したところ、ベクターのみを発現させた細胞の上清にはほとんど(0.7 mU/ml以下)検出されなかったのに対し、GlcAT-Pとprotein Aの融合タンパク質を発現させた細胞の培養上清には70 mU/ml以上の活

Fig. 14. Transient Expression of GlcAT-P cDNA in Lec2 Cells

The Lec2 cells were transfected with vector alone (A, B, C) or GlcAT-P cDNA (D, E, F) and stained with normal mouse IgM (A, D), M6749 (mouse IgM) (B, E), and HNK-1 (mouse IgM) (C, F). The cells were analyzed with FACS (fluorescence-activated cell sorter).

性が認められた。したがって、得られた GlcAT-P cDNA はグルクロン酸転移酵素をコードしていることが明らかとなった。また、この融合タンパク質を、SH 基と結合活性を示す *N*-ethylmaleimide で処理したところ、グルクロン酸転移活性は完全に消失したことから、317 番目のシステインがグルクロン酸転移活性に関与していることが示唆された。

つぎに、翻訳領域の全域を CHO 細胞の変異株である Lec 2 細胞に導入することにより、細胞表面糖鎖へのグルクロン酸の転移を検討した。この Lec 2 細胞は、シアル酸のゴルジ装置への輸送の変異のため、細胞表面にシアル酸を持たない細胞²⁷⁾で、強制導入した GlcAT-P と内在性のシアル酸転移酵素との競合が起こりにくいと思われる。GlcAT-P の強制導入による細胞表面糖鎖へのグルクロン酸の転移は、単クローン抗体 M6749 を用いた FACS 解析により行った。この M6749 抗体は、HNK-1 抗体と類似した抗原反応性を示すが、²⁸⁾ HNK-1 抗体は抗原との結合に硫酸基を必要とするのに対し、²⁹⁾ 硫酸基を持たないグルクロン酸にも結合活性を示す特色を持つ。Fig. 14 に示したように、cDNA を導入した細胞ではベクターのみを導入した細胞に比べ M6749 に対する反応性が著しく上昇しており、グルクロン酸が細胞表面糖鎖に転移されていることが示された。一方、HNK-1 抗体によっては細胞は染色されず、Lec 2 細胞においては、グルクロン酸化糖鎖に硫酸基を転移する硫酸基転移酵素が欠如しているのではないかと考えられた。

2-7. 培養細胞を用いた HNK-1 糖鎖抗原の機能的発現 前述したように、Lec 2 細胞においては本酵素 cDNA の導入によりグルクロン酸の転移された糖鎖が細胞表面に誘導される。この結果は、硫酸基転移酵素を持つ細胞を選ぶことにより、HNK-1 糖鎖抗原を誘導できることを示している。そこで種々の細胞に本酵素 cDNA を導入し、HNK-1 糖鎖抗原の誘導を検討した。腎臓由来の株化細胞である COS-1 細胞に本酵素 cDNA を導入し、蛍光抗体法で HNK-1 糖鎖抗原の発現を調べたところ、細胞表面が M6749 だけでなく HNK-1 抗体によっても染色された。²⁰⁾ この結果は、COS-1 細胞においては内在性の硫酸基転移酵素のはたらきによりグルクロン酸化糖鎖がさらに硫酸化され、最終的な HNK-1 糖鎖抗原として発現していることを示している。両抗体での反応性は、細胞をクロロホルム/メタノールで処理し、糖脂質成分を除いても変化せず、HNK-1 糖鎖抗原は糖タンパク質上に誘導されているものと考えられた。また、HNK-1 糖鎖抗原発現細胞では細胞の形態が著しく変化しており、長い枝分れした突起を持ち、さらに細かい多数の突起をこの長い突起上や細胞周辺にのばしていた。このような突起はシャーレにラミニンをコートしておくことにより著しく増強された。この結果は、細胞表面上の HNK-1 糖鎖抗原が細胞-基質間の相互作用に深く関与していることを直接証明したものであると考えられる。

おわりに

これまでの HNK-1 糖鎖抗原に関する実験は、HNK-1 抗体を用いて発現様式を観察することによりその機能を推定するか、あるいは、HNK-1 抗体を細胞培養系や生体内に注入しその機能阻害を示した実験が主であった。³⁰⁻³³⁾ 筆者らは、HNK-1 糖鎖抗原の神経系における機能を理解するためには、このような実験系では限界があり、分子生物学的、細胞工学的アプローチが必要であると考えた。そこで我々は、以上述べてきたように HNK-1 糖鎖抗原の生合成に着目し、実験を進めた。その結果、HNK-1 糖鎖の生合成の調節酵素であるグルクロン酸転移酵素が、糖タンパク質を受容体とするものと、糖脂質を受容体とするものが、それぞれ別々に存在することを明らかにした。糖タンパク質を受容体とするグルクロン酸転移酵素については既に cDNA クローニングに成功した。さらに糖脂質を受容体とするもう 1 つのグルクロン酸転移酵

素についても候補遺伝子の単離に成功している。さらに HNK-1 糖鎖抗原の最終段階を触媒する硫酸基転移酵素に関しても国外の研究者との共同研究によりその cDNA の単離に成功した。³⁴⁾ 今後、これら HNK-1 糖鎖抗原の生合成調節酵素遺伝子を用いることにより、分子レベル、細胞レベル、さらには動物レベルで人為的に HNK-1 糖鎖抗原の発現を自由に調節することにより、神経系における HNK-1 糖鎖抗原の生物学的機能に迫っていきたいと考えている。

謝辞 本研究は京都大学大学院薬学研究科川寄敏祐教授及び大阪バイオサイエンス研究所神経科学部門森 憲作副部長（現、理研脳科学総合研究所ニューロン機能研究グループディレクター）の指導のもとに行われたものであり、深謝致します。また共同研究を通じ、御協力いただいた大阪バイオサイエンス研究所神経科学部門渡辺恭良部長、吉原良浩研究員（現、大阪医科大学助教授）に深く感謝いたします。さらに本研究に精力的に取り組んで下さった寺山浩司博士（現、第一化学薬品研究所）をはじめとする京都大学薬学部生物化学教室（現、生体分子認識学）の皆様に厚く御礼申し上げます。

引用文献

- 1) Abo T., Balch C. M., *J. Immunol.*, **127**, 1024—1029 (1981).
- 2) McGarry R. C., Helfand S. L., Quarles R. H., Roder J. C., *Nature* (London), **306**, 376—378 (1983).
- 3) Kruse J., Mailhammer R., Wernecke H., Faissner A., Sommer I., Goridis C., Schachner M., *Nature* (London), **311**, 153—155 (1984).
- 4) Yoshihara Y., Oka S., Nemoto Y., Watanabe Y., Nagata S., Kagamiyama H., Mori K., *Neuron*, **12**, 541—553 (1994).
- 5) Chou D. K., Ilyas A. A., Evans J. E., Costello C., Quarles R. H., Jungalwala F. B., *J. Biol. Chem.*, **261**, 11717—11725 (1986).
- 6) Yoshihara Y., Oka S., Watanabe Y., Mori K., *J. Cell Biol.*, **115**, 731—744 (1991).
- 7) Jungalwala F. B., *Neurochem. Res.*, **19**, 945—957 (1994).
- 8) Bronner-Fraser M., *Dev. Biol.*, **123**, 321—331 (1987).
- 9) Künemund V., Jungalwala F. B., Fischer G., Chou D. K., Keilhauer G., Schachner M., *J. Cell Biol.*, **106**, 213—223 (1988).
- 10) Mori K., Fujita S. C., Watanabe Y., Obata K., Hayaishi O., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **84**, 3921—3925 (1987).
- 11) Oka S., Mori K., Watanabe Y., *Neurosci.*, **35**, 93—103 (1990).
- 12) Murakami F., Tada Y., Mori K., Oka S., Katsumaru H., *Neurosci. Res.*, **11**, 141—145 (1991).
- 13) Yoshihara Y., Oka S., Ikeda J., Mori K., *Neurosci. Res.*, **10**, 83—105 (1991).
- 14) Voshol H., van Zuylen C.W.E.M., Orberger G., Vliegthart J.F.G., Schachner M., *J. Biol. Chem.*, **271**, 22957—22960 (1996).
- 15) Kawashima C., Terayama K., Ii M., Oka S., Kawasaki T., *Glycoconj. J.*, **9**, 307—314 (1992).
- 16) Yoshida H., Matsumoto A., Mizuochi T., Kawasaki T., Kobata A., *J. Biol. Chem.*, **256**, 8476—8484 (1981).
- 17) Oka S., Terayama K., Kawashima C., Kawasaki T., *J. Biol. Chem.*, **267**, 22711—22714

- (1992).
- 18) Terayama K., Takashi S., Nakamura A., Matsumori K., Ohta S., Oka S., Sugita M., Kawasaki T., *J. Biol. Chem.*, (1998) in press.
 - 19) Frohman M. A., Dush M. K., Martin G. R., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **85**, 8998—9002 (1988).
 - 20) Terayama K., Oka S., Seiki T., Miki Y., Nakamura A., Kozutsumi Y., Takio K., Kawasaki T., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **94**, 6093—6098 (1997).
 - 21) Kozak M., *Nucl. Acid Res.*, **15**, 8125—8148 (1987).
 - 22) Hopp T. O., Woods K. R., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **78**, 3824—3828 (1981).
 - 23) Gillespie W., Kelm S., Paulson J., *J. Biol. Chem.*, **267**, 21004—21010 (1992).
 - 24) White T., Bennett E. P., Takio K., Sørensen T., Bonding N., Clausen H., *J. Biol. Chem.*, **270**, 24156—24165 (1995).
 - 25) Shaper N. L., Shaper J. H., Meuth J. L., Fox J. L., Chang H., Kirsch I. R., Hollis G. F., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **83**, 1573—1577 (1986).
 - 26) Nishikawa A., Ihara Y., Hatakeyama M., Kangawa K., Taniguchi N., *J. Biol. Chem.*, **267**, 18199—18204 (1992).
 - 27) Stanley P., Siminovitch L., *Somatic Cell Genet.*, **3**, 391—405 (1977).
 - 28) Obata K., Tanaka H., *Neurosci. Res.*, **6**, 131—142 (1988).
 - 29) Ilyas A. A., Chou D. K. H., Jungalwala F. B., Costello C., Quarles R. H., *J. Neurochem.*, **55**, 594—601 (1990).
 - 30) Kuratani S. C., *Dev. Biol.*, **144**, 215—219 (1991).
 - 31) Eisenman L. M., Hawkes R., *J. Comp. Neurol.*, **335**, 586—605 (1993).
 - 32) Keilhauer G., Faissner A., Schachner M., *Nature (London)*, **316**, 728—730 (1985).
 - 33) Martini R., Xin Y., Schmitz B., Schachner M., *Eur. J. Neurosci.*, **4**, 628—639 (1992).
 - 34) Bakker H., Friedmann I., Oka S., Kawasaki T., Nifant'ev N., Schachner M., Mantei N., *J. Biol. Chem.*, **272**, 29942—29946 (1997).