

学 位 論 文 題 名

N-linked neutral oligosaccharides in the
stratum corneum of normal and ichthyotic skin

(正常及び魚鱗癬皮膚の角層におけるN結合型中性オリゴ糖鎖)

学位論文内容の要旨

オリゴ糖鎖は、細胞間相互作用や細胞の分化の過程で重要な役割を担うことが知られる。ポリペプチドのアスパラギン残基へのN結合型オリゴ糖鎖の付加は、タンパクの翻訳後修飾のうち最も頻度の高いものであるが、皮膚の角層におけるN結合型オリゴ糖鎖は、まだ詳細に研究されていない。

N結合型オリゴ糖鎖は、マンノース、ガラクトース、N-アセチルグルコサミン、N-アセチルグルコサミン酸の組み合わせにより高度な多様性を持ち、糖タンパクの細胞内局在、細胞外分泌、分解などの調節を行うとされる。従来、腫瘍や膠原病などヒトの各種疾患において、N結合型オリゴ糖鎖構造の変化が存在することが報告されている。表皮におけるオリゴ糖鎖の重要性は、オリゴ糖鎖に結合するレクチンや抗体を用いて以前から研究が行われてきたが、レクチンや抗体は、糖タンパクあるいは糖脂質のオリゴ糖鎖中の2～3糖残基を認識するのみであり、オリゴ糖鎖の全体の構成を把握することは困難であった。そこで我々は、正常及び魚鱗癬皮膚の角層におけるN結合型オリゴ糖鎖の構造を、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いて解析を試みた。

正常コントロールとしては、良性皮膚腫瘍の摘出術を受けた患者3名の、手掌あるいは足蹠以外の正常皮膚を用いた。魚鱗癬患者は非水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症患者3名及び葉状魚鱗癬患者2名で、いずれも下腿の鱗屑を用いた。当研究は北海道大学の医の倫理委員会の承認を得、全ての被験者からは書面で説明を行い同意を受けた。

正常皮膚は60℃のPBSを用いて表皮と真皮に分離し、全ての検体は100mMの重炭酸アンモニウムを用いて変性した後にハサミで細かく刻んだ。クロロフォルムとメタノールを用いて脱脂を行った後、Trypsin及びChymotrypsin処理によりタンパクをポリペプチドレベルまで分解し、N-GlycosidaseFによりポリペプチドからオリゴ糖鎖を遊離させ、Pronaseによりポリペプチドをアミノ酸レベルまで分解した。Bio-Gel-P4カラムを用いて糖鎖とアミノ酸を分離し、糖鎖分画を2-aminopyridineを用いて標識(PA化)し、過剰の2-aminopyridineはSephadex G-15カラムを用いて除去した。以上のようにして作成したPAオリゴ糖は、0.01Nの塩酸を用いてシアル酸を遊離し、重炭酸アンモニウムで中和した。PAオリゴ糖をamide-silicaカラムを用いて精製した後、ODSカラムを用いて分析した。

魚鱗癬皮膚のN結合型オリゴ糖鎖は正常皮膚と比較して、複合型オリゴ糖鎖に相当する15.8分及び18.8分に溶出する分画が増加しており、26.9分に溶出する分画が減少していた。これらの分画は、各々

- a: Gal β 1,4GlcNAc β 1,2Man α 1,3(Gal β 1,4GlcNAc β 1,2Man α 1,6)Man β 1,4GlcNAc β 1,4GlcNAc,
 - b: Gal β 1,4GlcNAc β 1,2Man α 1,3(Man α 1,6)Man β 1,4GlcNAc β 1,4GlcNAc
 - c: Gal β 1,4GlcNAc β 1,2Man α 1,3(Gal β 1,4GlcNAc β 1,2Man α 1,6)Man β 1,4GlcNAc β 1,4(Fuc α 1,3)GlcNAc
- に相当すると考えた。

分画aは、ヒトの血漿中に存在する一般的なN結合型オリゴ糖鎖であり、分画bより糖転移酵素GnT-II活性により合成される。また分画cは、分画aより糖転移酵素Fut8活性により合成される。このため魚鱗癬皮膚では、GnT-II及びFut8活性が低下していると推測した。

魚鱗癬皮膚と正常皮膚との間には、複合型オリゴ糖鎖の構造に差異が見られたが、高マンノース型オリゴ糖鎖には変化がなかった。高マンノース型オリゴ糖鎖は、主に細胞質とデスモソームに分布することが知られており、この知見は、魚鱗癬皮膚においては、細胞質及び

デスモソームに存在する N 結合型オリゴ糖鎖よりも、細胞表面に分布する N 結合型オリゴ糖鎖の方がより障害されていることを意味すると考えた。

魚鱗癬皮膚における N 結合型オリゴ糖鎖構造の変化は、皮膚の角化における N 結合型オリゴ糖鎖の役割について示唆するものと考えた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 畠 山 鎮 次

副 査 教 授 岩 永 敏 彦

副 査 教 授 清 水 宏

学 位 論 文 題 名

N-linked neutral oligosaccharides in the stratum corneum of normal and ichthyotic skin

(正常及び魚鱗癬皮膚の角層におけるN結合型中性オリゴ糖鎖)

オリゴ糖鎖の付加は、タンパクの翻訳後修飾のうち最も頻度の高いものであるが、皮膚の角層におけるN結合型オリゴ糖鎖は、まだ詳細に研究されていない。

N結合型オリゴ糖鎖は、マンノース、ガラクトース、N-アセチルグルコサミン等の組み合わせにより高度な多様性を持ち、糖タンパクの機能に深く関与する。従来、腫瘍などヒトの各種疾患において、N結合型オリゴ糖鎖構造の変化が存在することが報告されている。表皮におけるオリゴ糖鎖の重要性は、オリゴ糖鎖に結合するレクチンや抗体を用いて以前から研究が行われてきたが、レクチンや抗体は、糖タンパクあるいは糖脂質のオリゴ糖鎖中の2～3糖残基を認識するのみであり、オリゴ糖鎖の全体の構成を把握することは困難であった。そこで申請者は、正常及び魚鱗癬皮膚の角層におけるN結合型オリゴ糖鎖の構造を、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による2次元マッピング法を用いて解析を試みた。

正常コントロールとしては、良性皮膚腫瘍の摘出術を受けた患者3名の、正常皮膚部分を用いた。魚鱗癬患者は非水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症患者3名及び葉状魚鱗癬患者2名で、いずれも下腿の鱗屑を用いた。検体は、糖タンパクを抽出した後、酵素反応によりN結合型オリゴ糖鎖を遊離させ精製し、糖鎖分画を2-aminopyridineを用いて蛍光標識 (PA化) し、ODSカラム及びAmideカラムの二種類のカラムを用いて分析し、両分析の結果から2次元マッピング法により構造を決定した。

魚鱗癬皮膚のN結合型オリゴ糖鎖は正常皮膚と比較して、以下のa、bの構造が増加し、cの構造が減少していた。

a: Gal β 1,4GlcNAc β 1,2Man α 1,3(Gal β 1,4GlcNAc β 1,2Man α 1,6)Man β 1,4GlcNAc β 1,4GlcNAc,

b: Gal β 1,4GlcNAc β 1,2Man α 1,3(Man α 1,6)Man β 1,4GlcNAc β 1,4GlcNAc

c: Gal β 1,4GlcNAc β 1,2Man α 1,3(Gal β 1,4GlcNAc β 1,2Man α 1,6)Man β 1,4GlcNAc β 1,4(Fuc α 1,3)GlcNAc

構造cは、ヒトの血漿中に存在する一般的なN結合型オリゴ糖鎖であり、構造bより糖転移酵素GnT-IIにより、また構造aより糖転移酵素FuT8により合成される。このため魚鱗癬皮膚では、GnT-II及びFuT8の発現あるいは活性が低下していると推測した。

魚鱗癬皮膚と正常皮膚との間には、N結合型オリゴ糖鎖の構造に差異が見られたが、水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症と葉状魚鱗癬との間には、明らかなオリゴ糖鎖構造の変化を認めなかった。魚鱗癬皮膚におけるN結合型オリゴ糖鎖構造の変化は、遺伝性角化性疾患の病態解明の一助となると考えた。

副査の岩永敏彦教授からは、魚鱗癬皮膚の角層と正常皮膚の表皮とを比較する事の妥当性について、ま

た従来皮膚科疾患において糖鎖構造解析を行なった例があるかどうかとの質問があり申請者は最初の質問に、マウスでは今回検出した糖鎖構造については角層と表皮の間で差がないというデータがあるので、ヒトにおいても同様と考えたこと、次の質問には本研究が皮膚疾患で糖鎖構造を解析した初めての例であることを回答した。副査の清水宏教授からは今回の結果を今後どのように発展させていくかという質問があり、申請者は今後酵素の発現解析などを行い、その詳しい機序を明らかにする必要があると考えると回答した。主査の畠山鎮次教授からは、他の疾患において今回の結果とは逆に、FuT 8 及び GnT-II の発現あるいは機能が上がった例はあるかという質問があったが、申請者は知り得る範囲ではそのような知見はなかったと回答した。

この論文は、皮膚疾患における N 結合型オリゴ糖鎖の構造変化を初めて明らかにした研究である点が高く評価され、今後、その詳細について明らかにしてゆくことが期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。