

氏 名（本籍）	は せ がわ たか ふみ 長 谷 川 隆 文
学 位 の 種 類	博 士 （ 医 学 ）
学 位 記 番 号	医 博 第 1 6 0 5 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 1 2 年 3 月 2 3 日
学 位 授 与 の 条 件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研 究 科 専 攻	東 北 大 学 大 学 院 医 学 系 研 究 科 （ 博 士 課 程 ） 内 科 学 系 専 攻
学 位 論 文 題 目	Identification of a Novel Mouse Ganglioside Sialidase Expressed in Neuro2a Cell Differentiation. （マウスガングリオシドシアリダーゼ遺伝子のクローニングおよび Neuro2a 細胞分化時におけるその発現上昇）
	（ 主 査 ）
論 文 審 査 委 員	教 授 糸 山 泰 人 教 授 柴 原 茂 樹 教 授 田 村 眞 理

## 論文内容要旨

神経組織に豊富に含まれるガングリオシドは、神経突起形成、シナプス伝達、細胞接着、神経細胞死等に重要な役割を演じている。本研究ではガングリオシド分解酵素であるシアリダーゼに着目し、マウスガングリオシドシアリダーゼの cDNA クローニング及びその酵素学的特性の検討を行った。さらに神経細胞分化過程における同酵素の役割を明らかにすべく、マウス神経芽腫細胞 Neuro2a の神経突起伸長過程における同遺伝子の発現変化の観察、ならびにシアリダーゼ安定発現株を用いた神経突起形成への影響を検討した。

既にクローニングされているウシ形質膜性、ラット細胞質性及びヒトリソソーム性シアリダーゼの一次構造間において高い相同性を示す領域についてデジェネレートプライマーを作成し、マウス脳 cDNA を鋳型として PCR を実施した。得られた 396bpPCR 産物の塩基配列を元にプライマーを作成し、RACE 法により cDNA の完全長を得た。cDNA のサイズは 3339bp で計 418 個のアミノ酸をコードしており、シアリダーゼのコンセンサス配列である Asp-box を 3 個、YRIP モチーフを 1 個含んでいた。アミノ酸レベルでのホモロジー検索では、ヒト形質膜性シアリダーゼと 67.8% と最も高い相同性が確認され、一次構造から推測される分子量は約 47kDa であった。ノザンプロット解析では 3.4kb の単一バンドが検出され、心筋に強い発現がみられた他、脳、脾臓、肝臓、肺、腎臓、精巣等にも有意な発現が認められた。マウス脳を用いた In situ ハイブリダイゼーションでは、大脳皮質第 2 層、小脳顆粒細胞層等に有意な mRNA の分布が確認された。

次に、同遺伝子がガングリオシド水解活性をコードしていることを確認すべく、翻訳領域の全長を真核細胞用発現ベクター pME18S に組み込んで、COS-1 細胞に一過性発現を行った。陽性トランスフェクタントではコントロール細胞に比し、ガングリオシド水解活性は約 2500 倍に上昇した。ガングリオシドに対する同酵素の至適 pH は 4.4 付近にみられ、ガングリオシド GD3、GM3、GD1a が良い基質となり、GM2 やシアリルラクトースに対しても弱い触媒活性を有することが確認された。GD1a 及びシアリルラクトースに対する Km 値はそれぞれ  $57 \mu\text{M}$ 、 $584 \mu\text{M}$  であり、本酵素はガングリオシドに対して優先的に働くことが確認された。

さらに、神経細胞の神経突起伸長過程における同酵素の機能的役割を検討する目的で、5-bromodeoxyuridine (0.25mM) によって分化誘導させたマウス神経芽腫細胞 Neuro2a についてシアリダーゼの発現を観察した。ガングリオシドシアリダーゼ活性の測定を行い、競合的 PCR 法によってシアリダーゼ遺伝子発現量を定量したところ、神経突起を有する細胞の割合が増加し、ニューロンへの分化マーカーであるアセチルコリンエステラーゼ活性が増加するに従って、酵素活性 (day4-5 で day0 の 11-12 倍) ・転写活性 (day4-5 で day0 の 20-21 倍) とも

に有意な上昇が認められた。続いて Neuro2a 細胞のガングリオシドシアリダーゼ遺伝子安定発現株を 3 系統取得し、前述と同様の条件下で BrdU による神経突起伸長効果を観察したところ、シアリダーゼ遺伝子導入株では野生型株およびコントロールベクター導入株と比べ、より早い時期に神経突起形成が認められ、この傾向は発現しているシアリダーゼ遺伝子量とほぼ相関していることがわかった。以上の実験結果は、ガングリオシドシアリダーゼは哺乳動物の中枢神経系に広範に発現しており、神経細胞分化過程において神経突起伸長を促進する重要な因子の一つとして作用している可能性が高いことを示している。

## 審査結果の要旨

神経組織に豊富に含まれるガングリオシドは、神経突起形成、シナプス伝達、細胞接着、神経細胞死に重要な役割を演じている。本研究ではガングリオシド分解酵素であるマウスガングリオシドシアリダーゼの cDNA クローニング及びその酵素学的特性および神経突起伸長やその形成への影響を検討した。

ラット及びヒトシアリダーゼにおいて高い相同性を示す領域のデジェネレートプライマーを作成し、マウス脳 cDNA を鋳型として PCR を実施した。3339bp で計 418 個のアミノ酸をコードしている cDNA を得た。心筋、脳、脾臓、肝臓等にも有意な発現が認められた。マウス脳を用いた *in situ* ハイブリダイゼーションでは、大脳皮質第 2 層、小脳皮質第 2 層、小脳顆粒細胞層等に mRNA の分布が確認された。同遺伝子を COS-1 細胞に一過性発現を行ったところコントロール細胞に比し、ガングリオシド水解活性は約 2500 倍に上昇した。ガングリオシドに対する同酵素の至適 pH は 4.4 付近にみられ、ガングリオシド GD3, GM3, GD1a が良い基質となり、GM2 やシアリルラクトースに対しても弱い触媒活性を有することが確認された。GD1a 及びシアリルラクトースに対する  $K_m$  値はそれぞれ  $57 \mu\text{M}$ ,  $584 \mu\text{M}$  であり、本酵素はガングリオシドに対して優先的に働くことが確認された。

さらに、神経細胞の神経突起伸展過程における同酵素の機能的役割を検討する目的で、5 bromodeoxyuridine ( $0.25\text{mM}$ ) によって分化誘導させたマウス神経芽腫細胞 Neuro2a についてシアリダーゼの発現を観察した。神経突起を有する細胞の割合が増加し、ニューロンへの分化マーカーであるアセチルコリンエステラーゼ活性が増加するに従って、酵素活性と転写活性ともに有意な上昇が認められた。続いて Neuro2a 細胞のガングリオシドシアリダーゼ遺伝子安定発現株を 3 系統取得し、前述と同様の条件下で BrdU による神経突起伸長効果を観察したところ、シアリダーゼ遺伝子導入株では野生型株およびコントロールベクター導入株と比べ、より早い時期に神経突起形成が認められた。

以上の実験結果は、ガングリオシドシアリダーゼは哺乳動物の中枢神経系に広範に発現しており、神経細胞分化過程において神経突起伸長を促進する重要な因子の一つとして作用している可能性が高いことを示しており、本研究は学位に値すると考える。