



## Structures of the carbohydrate moieties of secretory component purified from human milk

溝口, 明

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1984-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲0474

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1000474>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・(本籍) 溝 口 明 (山口県)  
 学位の種類 医 学 博 士  
 学位記番号 医博い第421号  
 学位授与の要件 学位規則第5条第1項該当  
 学位授与の日付 昭和59年3月31日  
 学位論文題目 Structures of the Carbohydrate Moieties of  
 Secretory Component Purified from Human Milk  
 (ヒト乳汁 Secretory Component の糖鎖構造)

審査委員 主査 教授 西 塚 泰 美  
 教授 溝 口 史 郎 教授 杉 山 武 敏

### 論文内容の要旨

#### 緒 言

ヒト Secretory Component (SC) は、粘膜上皮細胞で生産される分子量約 80000 の糖蛋白質で、 IgA との特異的結合により分泌型 IgA を形成する機能を有す。即ち SC は、上皮細胞の基底側細胞膜上で IgA と結合し、細胞内へ receptor mediated endocytosis によって取込まれ、分泌腺側へ輸送され IgA と共に分泌されるという特殊な作用様式を示す。SC の分子量の 20% 以上を占める糖部分に関しては、 IgA との特異結合のレセプターとしての可能性、分泌型 IgA の分解阻害蛋白としての可能性等が推測されていたが、その構造の詳細は不明であった。

私は、共同研究者の協力のもとに、ヒト乳汁より精製した SC の糖部分の構造を明らかにし得たので報告する。

#### 実験材量と方法

- (1) SC の精製 SC は、 Björk と Lindh の方法に従って、ヒト乳汁 2.6 ℥より 266mg が精製され、精製 SC の純度は、 SDS ゲル電気泳動法により単一バンドであること、および乳汁に含まれる他の蛋白に対する各種抗体と反応しないことによって検定された。
- (2) 糖部分の遊離と標識 SC の糖部分は、ヒドロゲン分解法によって蛋白部分より遊離せられ、 N- アセチル化後、 10% は  $\text{NaB}^{(3)\text{H}}_4$  により還元末端を標識され、 90% は  $\text{NaB}^{(2)\text{H}}_4$  により還元されメチル化分析に用いられた。
- (3) 糖鎖の分離精製と構造解析 標識糖鎖は、高圧ろ紙電気泳動によって中性糖鎖と酸性糖鎖に分

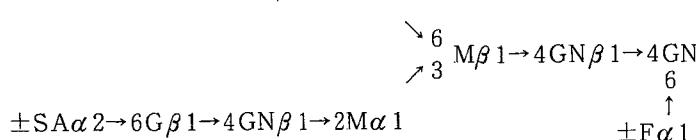
離せられ、次いで酸性糖鎖はシアリダーゼ処理によって中性糖鎖に変換された。これらの中性糖鎖は、さらにろ紙クロマトグラフィーによりほぼ単一構造になるまで精製された。このようにして精製された各画分は、Bio-Ge 1 P-4によるゲルろ過の溶出位置、およびそれらを基質特異性の異なるエキソグリコシダーゼで処理した後の溶出位置の変化の解析により、各糖鎖に於ける構成单糖の種類と配列順序が決定された。また構成单糖の結合様式は、箱守法でメチル化された各画分をガスクロマトグラフィー・マススペクトロメトリーで分析することにより決定された。

## 結果

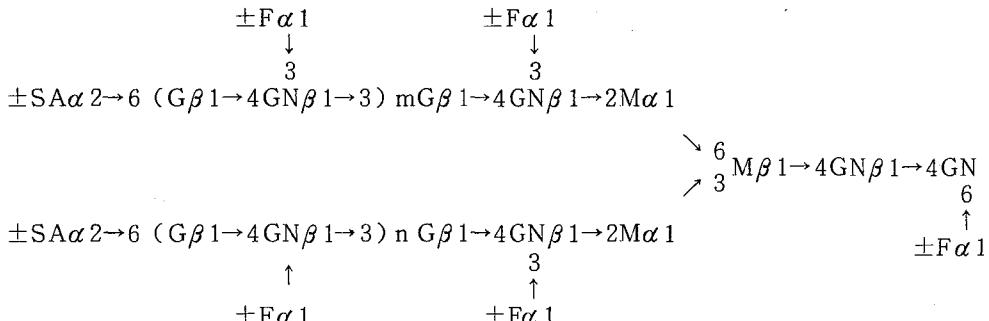
- (1) SC 1 分子は、4 本の糖鎖を有し、それらの糖鎖はすべてアミノ酸アスパラギンを介して蛋白部分と結合していた。
  - (2) 糖鎖の 19% は中性であった。残りの 81% の酸性成分の原因はすべてシアル酸に由来し、全体の 57% がシアル酸を 1 個、24% が 2 個有していた。
  - (3) 糖鎖の主要構造を図 1 (A)(B) に示す。総計 40 種以上もの互いに異なる構造が同定された。

1

(A)



(B)



$$m, n = 0, 1, 2$$

## 略号

### SA, N-アセチルノイラミン酸

## G, ガラクトース

F, フコース

M, マンノース

## GN, N-アセチルグルコサミン

## 考 察

本研究によって、SCの单一蛋白部分は、4本の糖鎖を有し、その糖鎖は、互いに異なる40種以上の構造を有することが明らかとなった。従来、单一糖蛋白に対する糖部分の多様性は、一般に数種以下であり、特定の蛋白部位には特定の糖鎖構造のみが結合すると考えられていたが、SCに於ては、その有する糖鎖の本数の10倍以上の構造が同定され、糖蛋白の生合成に関して新しい解釈の必要性が指摘された。

次に、これら40種以上の構造多様性の原因を考察すると、それは、二つに大別される。第1の原因是、母核構造と呼ばれる部分に存在し、還元末端であるN-アセチルグルコサミンが4位以外置換されていない場合と、4位以外に6位の水酸基がフコースで置換されている場合とが認められた。第2の原因是、側鎖構造と呼ばれる部分に存在し、非還元末端の单糖の種類や結合様式の差異が認められた。まず図1(A)に示す構造では、普通の二本鎖よりも一方が短縮した不同二本鎖構造が認められた。しかも短かい方の側鎖は、必ず $\beta$ -マンノースの6位に結合しており、このことはこの糖鎖が完成後の非特異的分解によって生じたのではなく、むしろ合成途上の糖鎖と考えるべきことを物語っている。次に図1(B)に示す構造では、側鎖として $G\beta 1 \rightarrow 4GN$ ,  $SA\alpha 2 \rightarrow 6G\beta 1 \rightarrow 4GN$ , 又は,  $G\beta 1 \rightarrow 4(F\alpha 1 \rightarrow 3)GN$ のいずれかが存在し、非還元末端がガラクトースである場合には、その3位にもう一分子の側鎖が結合することにより“繰り返し構造”的形成が認められた。即ち、任意の非還元末端 $G\beta 1 \rightarrow 4GN$ について、“そのまま終止”, “シアル酸の結合”, “フコースの結合”および“繰り返し延長”という4つの場合が存在し、これが2本の側鎖について存在することが、SC糖鎖の多様性の大部分の惹起せしめると結論される。ただし、上記の4つの場合が2本の側鎖にランダムに形成されるのではなく、例えば繰り返し構造を持たない普通の二本鎖構造にフコースが1個結合する場合、 $\beta$ -マンノースの6位から伸びる側鎖に70%, 3位から伸びる側鎖に30%結合するというように、各種結合様式の形成には、その形成の難易度に微妙な傾向が存在することも示された。

またSCの糖鎖の中で抗原性と関連して最も注目される構造は、 $G\beta 1 \rightarrow 4(F\alpha 1 \rightarrow 3)GN$ の繰り返し構造で、この構造は、最近糖脂質の糖部分としても同定され、しかも胚発生の桑実胚期に特異的に出現する抗原、SSEA-1の抗原決定基であることが証明されており、これがアスパラギン結合型の糖蛋白にも認められたことは、糖脂質および糖蛋白の糖部分の構造と機能を考える上で興味深い。

## 論文審査の結果の要旨

現在、糖蛋白質の糖鎖部分が、細胞表面および細胞内部における各種の識別機構に重要な役割を果していることを示唆する多くの知見が蓄積されている。GesnerとGinsbergらによって明らかにされたリンパ球のリンパ組織血管壁通過のエキソグリコシダーゼによる阻害、Ashwellらによって明らかにされた血清糖蛋白質の肝臓への取込みに於ける糖鎖非還元末端のガラクトース残基の関与、NeufeldとSlyらによって明らかにされた酵素のライソゾームへの取込みに於けるマンノース-6-リン酸の関与等がその代表的な例である。しかし糖鎖の構造解析は、構成単位である单糖の結合様式が著しく

多様で複雑な分枝構造を形成すること、および糖蛋白質上で糖鎖が一般に混合物として存在し、その分離精製に有力な手段がなかったために困難なものとされ、具体的な糖鎖の分子構造をふまえて識別現象を解明した例は少ない。

本研究では、ヒドラジン分解法、Bio-Gel P-4によるゲルろ過、ガスクロマトグラフィーおよびマススペクトロメトリーなどの研究手段により、乳汁免疫に主要な役割を果す糖蛋白質SCの糖鎖構造が詳細に解析された。その結果、単一のSC蛋白質部分に対して総計40種類以上の糖鎖構造が同定され、しかもそれらの諸構造間には一定の秩序が認められた。

すなわち、すべての同定された糖鎖は、複合型2本鎖構造であるという共通の特徴をもち、各糖鎖には生合成の中間段階と考えられる構造が存在している。また量的には、いわゆる“普通の2本鎖構造”が最も多く、それ以上大きな構造も、小さな構造も漸減している。一方、非還元末端のシアル酸やフコースの結合の際、両者とも2本の鎖のうちの一方に結合しやすく他方に結合しにくいという傾向がある。以上のごとく、分枝様式は厳しく制限されているにもかかわらず、非還元末端の自由度によってこれらの構造が遂次付加合成されるという糖鎖の構造多様性の本態が示唆された点に、本研究の意義がある。

また、SCと同じく乳腺上皮細胞で合成される糖蛋白質ラクトトランスフェリンの糖鎖構造と比較すると、分枝様式は両者の糖蛋白質に共通であるが、還元末端および非還元末端には微妙な差異が認められ、同一細胞内での異った蛋白質部分への糖鎖付加の区別が、糖鎖の還元、非還元、両末端の変化を介して行われることが明らかにされた。

これらの結果により価値ある業績と認め、よって、本研究者は医学博士の学位を得る資格があると認める。