Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-05

Purification of hamster melanoma tyrosinases and structural studies of their asparagine-linked sugar chains

大倉，隆司

(Degree)
博士（医学）
(Date of Degree)
1984-03-31
(Resource Type)
doctoral thesis
(Report Number)
甲0529
(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1000529

※ 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）　大倉隆司（おおくら たかし）　（岡山県）

学位の種類　医学博士

学位記番号　医博い第451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　**Purificaton of Hamster Melanoma Tyrosinases and Structural Studies of Their Asparagine-Linked Sugar Chains**
（Greene氏Malignant Melanoma（Hamster）のTyrosinasesの精製とそのアスパラギン結合糖鎖の構造）

審査委員　主査　教授　三島　豊
教授　高井義美　教授　伊東　宏

論文内容の要旨

緒言

Tyrosinase はメラニン合成を司る糖タンパク質であり，ribosome で合成され，GERL を通り，coated vesicle により premelanosome へ運ばれると考えられている。三島ら（1983）は，培養メラノーマ細胞をアスパラギン（Asn）結合型糖鎖の合成阻害剤である tunicamycin で処理すると，premelanosome 内における tyrosinase の消失という電顕的，生化学的所見と共に，メラニン合成もほぼ完全に停止する事を見出した。この所見は tyrosinase のGERL から Premelanosome への移行過程における glycosylation の関与を示唆している。近年，種々の膜糖タンパク質において糖鎖が細胞認識機構に関与している事が報告されている。例えば，lysosome 酵素のいくつかは，そのリン酸化された高マンノース型糖鎖がシグナルになる事によって lysosome へ運ばれる事がわかっている。そこで我々は，tyrosinase 酵素そのものの糖鎖の細胞内移行における役割を解析するため，まず hamster melanoma から tyrosinase を精製し，その Asn 結合型糖鎖の構造を決定した。

実験材料および方法

Greene 氏 malignant melanoma をゴールデンハムスターの皮下に移植し，10〜14日目に採取した。その顆粒・膜画分（30,000 ×g，60分沈渣）を Triton X－100 で可溶化し，これをDEAE-cellulose，Sephadex G－200，硫安沈殿，DEAE-Sephadex，Polyacrylamide gel 電気泳動，hydroxylapatite で処理し，tyrosinase を精製した。これからヒドラジン分解により

Asn 結合型糖鎖を遊離させ，N－アセチル化後，HaB〔^{9}H〕$_4$ で還元標識した。高圧濾紙電気泳動法により中性糖鎖と酸性糖鎖を分画し，それらの単糖の配列とアノマー構造を種々の exoglycosidase の消化とBio-Gel P-4 column chromatography における溶出位置の分析により決定した。またそれぞれの糖の結合位置は，箱守法により完全メチル化後，ガスクロマトグラフ質量分析法により決定した。

結　果

1. Tyrosinase の精製

本 melanoma では，tyrosinase の70～80%が顆粒・膜画分に存在し，これを 0.5 % Triton X－100 処理する事により，効率よく可溶化できた。以下の精製手順と結果は表1に示している。DEAE－Sephadex を NaCl で段階的に溶出する事により，早く出てくるピークAと遅いピークBに分れた。そこでその後はそれぞれ別々に分取用 polyacrylamide gel 電気泳動（5 % gel, pH8），hydroxylapatite などでさらに精製した。得られた tyrosinases A, Bはほぼ同じ比活性に達し，SDS－Polyacrylamide gel 電気泳動でもどちらも分子量 69,000 の単一バンドであった。これにより両者ともT_1 タイプの tyrosinase と考えられる。また，純度は糖鎖構造解析に充分であると考えられる。

2. Tyrosinase の糖鎖構造

Tyrosinases A，Bをヒドラジン分解してAsn 結合型糖鎖を分解し，上述の方法で分析した結果，どちらも次の**2**つのグループの構造の糖鎖である事が明らかになった。

a.　$(Man\alpha1\rightarrow2)_{6-0}$ $(Man\alpha1\rightarrow)_{2-4}$ $Man\beta1\rightarrow4GlcNAc\beta1\rightarrow4GlcNAc$

b.　$(Sia\alpha2\rightarrow3)_{0-2}$ $(Gal\beta1\rightarrow4GlcNAc\beta1\rightarrow)_{1-4}$ $\begin{matrix} Man\alpha1\searrow 6 \\ Man\alpha1\nearrow 3 \end{matrix}$ $Man\beta1\rightarrow4GlcNAc\beta1\rightarrow4GlcNAc$ ($\pm Fuc\alpha1 \downarrow 6$)

また糖鎖に標識された放射活性量より，tyrosinases A，Bとも1モル分子中に約4モルの糖鎖を持つ事が明らかになった。そのうち約1本が高マンノース型糖鎖（a）であった。これまで報告されている高マンノース型糖鎖はほとんど全て Man_5・GlcNAc・GlcNAc をコアに持つものであるが，tyrosinase では Man_{4-9}・GlcNAc・GlcNAc をコアとする極めて特徴的な糖鎖である。4本のうち3本はbの様な複合型糖鎖であり，tyrosinases A，Bの糖鎖の違いはこのシアル酸含量にのみ見られ，構造的には同一であった。中性糖鎖は Man_3・GlcNAc・±Fuc・GlcNAc を共通のコア構造とし，（Gal・GlcNAc）の側鎖を1～4本持つものであった。また酸性糖鎖はこれら中性糖鎖にシアル酸が1～2モル結合していた。

表　1

Hamster melanoma からの tyrosinases の精製

Procedures	Volume (ml)	Protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Yield (%)
Membrane fraction	40	28,408	196	0,007	—
Triton X-100 extraction	425	4,688	279	0.060	100
DEAE- cellulose	956	1,434	254	0.177	91
Sephadex G- 200	182	518	204	0.394	73
$(NH_4)_2SO_4$ Fractionation	43	150	178	1.187	64
DEAE-Sephadex A-50					
A	120	14.7	90.7	6.170	33
B	122	107	79.6	0.744	29
Preparative PAGE					
A	90	8.82	66.1	7.494	24
B	91	14.1	56.6	4.014	20
Hydroxylapatite and DEAE-Sephadex					
A	12.9	2.70	59.4	22.000	21
B	12.9	2.36	49.4	20.932	18

考　察

本論文で明らかにした tyrosinase の Asn 結合型糖鎖のいくつかは，他の糖タンパク質にはほとんど見られない構造を有していた。Asn 結合型糖鎖は，リボソームで合成された直後のペプチドに高マンノース型糖鎖として結合し，ER（endoplasmic reticulum）でプロセシングされ，一部はそのままの形で残り，一部はER，ゴルジ体で Man_5・GlcNAc・GlcNAc まで小さくなった後，GlcNAc が結合して複合型糖鎖合成経路へ進んで行く。従って，Man_{4-3}・GlcNAc・GlcNAc という他ではほとんど見られない低分子量の糖鎖が，今回主に premelanosome から精製された tyrosinase に見出された事は，melanoma には Man_5・GlcNAc・GlcNAc からの通常の複合型糖鎖合成経路の他に Man_{4-3}・GlcNAc からの経路が存在する可能性を示唆している。最近オボムコイドの糖鎖の研究においても，tyrosinase で見られた糖鎖とは違うが，Man_3・GlcNAc・GlcNAc からの経路を経たと考えられる一連のユニークな糖鎖が報告されている。一方，複合型1本鎖は human chorionic gonadotropin（hCG）など数少ない例でしか見られず，特に hCG ではこの1本鎖を含む全 Asn 型糖鎖を取り除くとホルモン活性を失なう事から，生物学的活性に重要な役割を果していると考えられている。

細胞内移行のシグナルは tyrosinase にかなり特異的な糖鎖である可能性が最も高いと考えられ

る。従って，上記の高マンノース型糖鎖や複合型1本鎖がシグナルである可能性は高い。しかし他の複合型2～4本鎖もそれぞれを特異的に認識する植物性レクチンが存在する事などから，これらもシグナルになりうる事を否定できない。糖鎖合成の tunicamycin による阻害によって tyrosinase の細胞内移行が停止するという事から，本論文で明らかにした tyrosinase の糖鎖，計十数種類の中のどれかが移行のシグナルの役目を果しているのであろう。その糖鎖を特定するためには，今後 tunicamycin のように全 Asn 型糖鎖合成を阻害するのではなく，プロセシングの途中で一部の糖鎖合成のみを阻害する 1-deoxynojirimycin や swansonine の melanoma に対する効果を調べたり，各糖鎖に対する monoclonal antibody を応用し receptor の解析が必要であろう。

論文審査の結果の要旨

人種特有の皮膚色調を規定しているメラニン蛋白の生体内における生成は，色素細胞内の特異的小器官 premelanosome 内においてのみ行なわれる。一方，糖蛋白質であるメラニン生成酵素 tyrosinase は，粗面小胞体の ribosome で生成された後，特異的輸送機構により，premelanosome 内へ転送されると考えられる。

一般に，糖蛋白質の糖鎖は細胞の種々の認識機構に関与している事が判明してきているが，その詳細な機構は未だ不明の点が多い。細胞外膜系としては肝細胞やマクロファージの pinocytotic process が，細胞内膜系としては lysosome 酵素の輸送における糖鎖のシグナルとしての役割が'80年代に入りようやく解明された。特に，lysosome 酵素の場合，リン酸化された高マンノース型という特殊な糖鎖が Golgi complex 中の GERL から lysosome への酵素の輸送のシグナルになっている。我々は'70年代後半に黒色腫細胞の糖鎖合成を阻害する事により，tyrosinase の premelanosome への輸送を阻害し，黒色腫細胞の白色化を誘導し得た。そこで tyrosinase の糖鎖部分が premelanosome への輸送のシグナルであると考え，本研究では，hamster melanome より tyrosinase を精製し，その糖鎖構造を決定した。本酵素の精製は 105,000 g ×60分の沈渣である膜画分から種々のクロマトグラフィーを組合わせて行なった。その結果ゲル電気泳動において挙動の違う2種類の tyrosinases を 2.5 mg 前後得たが，分子量はどちらも 69,000 で T_1 タイプのものであった。これらの糖鎖を分析した結果，どちらの tyrosinase も約4本のアスパラギン結合型糖鎖を持ち，そのうち1本は高マンノース型，残りは複合型1～4本鎖糖鎖であった。また複合型の一部にはシアル酸が結合しており，その割合の差が2種の tyrosinases の挙動の違いの原因と推論された。そして高マンノース型にも複合型にも他の糖蛋白質にはほとんど見られない特殊な糖鎖が含まれていた。特に高マンノース型では現在知られているものとは違ったコア構造を持つ一連の糖鎖が見られ，melanoma 細胞に特異な糖鎖合成経路の存在も示唆している。

本研究は以上の如く，今後の melanogenesis の生化学的研究に重要な tyrosinase の精製法を確立するとともに，その糖鎖構造を明らかにした事は，メラニン生成の制御機構における糖鎖の役割

を追求する上で重要な価値ある業績と認める。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。