



Substrate specificity of mammalian endo- β -N-acetylglucosaminidase : study with the enzyme of rat liver ; Digestion of asparagine-linked oligosaccharides by endo- β -N----

立花, 陽子

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1983-03-09

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙0826

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2000826>

※ 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） 立 花 陽 子 （兵庫 県）

学 位 の 種 類 医 学 博 士

学 位 記 番 号 医博ろ第 723 号

学位授与の要件 学位規則第 5 条第 2 項該当

学位授与の日付 昭和 58 年 3 月 9 日

学位論文題目 1. **Substrate Specificity of Mammalian Endo- β -N-Acetylglucosaminidase : Study with the Enzyme of Rat Liver**
 （哺乳動物のエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼの基質特異性：ラット肝臓由来の酵素についての研究）
 2. **Digestion of Asparagine-Linked Oligosaccharides by Endo- β -N-Acetylglucosaminidase in the Human Skin Fibroblasts Obtained from Fucosidosis Patients**
 （ヒトフコシドーシス患者の培養線維芽細胞中のエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼによるアスパラギン結合少糖の水解）

審 査 委 員 主査 教授 木 幡 陽
 教授 西 塚 泰 美 教授 田 中 千賀子

論 文 内 容 の 要 旨

序 文

アスパラギン結合糖鎖の Chitobiose 部分に働き少糖を遊離するエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼは、まず最初に種々の微生物で発見され、現在では明らかにされた基質特異性により糖タンパク質のアスパラギン結合糖鎖の構造解析に有用な酵素として使われている。同様の酵素が哺乳動物にも存在することは、ラット、ブタ、人間で報告されているが、その基質特異性は微生物起源のものほど明らかにされていなかった。

先天性酵素欠損症の一つであるグリコンダーゼ欠損症の患者-GM1 gangliosidosis, mannosidosis, Sandhoff's disease -の尿中にはマンノース含有少糖群が異常に排泄されることが報告されている。それら少糖群はいずれも欠損しているエキソグリコンダーゼに対応した非還元末端残基を持ち、還元末端に Man β 1-4 GlcNAc という構造を有するという特徴をもつ。糖鎖構造の類似から、これら種々の少糖群は、エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼによる糖タンパク質のアスパラギン結合糖鎖からの水解産物であることが示唆された。

一方、フコシドーシス患者の尿中には、還元末端のN-アセチルグルコサミンにフコースが結合した糖ペプチド群が排泄される。これは何らかの理由でエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼが働かなかったためと考えられる。

以上のグリコシダーゼ欠損症にみられる現象の生化学的背景を明らかにするために、ラット肝臓及びフコシドーシス患者の皮膚培養線維芽細胞から調整したエンドー β -N-アセチルグルコサミニダーゼの基質特異性を検索した。

実験方法

省 略

実験結果

第 I 部 ラット肝臓由来のエンドー β -N-アセチルグルコサミニダーゼ

1. エンドー β -N-アセチルグルコサミニダーゼの性状

ラット肝臓の粗抽出液は、エンドー β -N-アセチルグルコサミニダーゼ活性を有する。この酵素活性は、糖ペプチドのアスパラギンを $[^{14}\text{C}]$ -N-アセチル化したものを基質として用い、反応後ペーパークロマトグラフィーで遊離した $\text{GlcNAc}-\text{N}-[^{14}\text{C}]\text{acetyl Asn}$ 又は $\text{Fuc}-\text{GlcNAc}-\text{N}-[^{14}\text{C}]\text{acetyl Asn}$ を基質と分離し、放射活性を測定することにより測定できる。

しかし本酵素は非常に不安定で精製困難であったので、まず混在する種々のエキソグリコシダーゼ活性の影響を受けない標準反応系を設定した。

至適PHは7.0で、 CaCl_2 、 MnCl_2 、 MgCl_2 、EDTA及びN-アセチルグルコサミノラクトン各10 mMの存在下で活性はかわらず、0.1 mM P-クロロマーキュリフェニルスルホネイトの存在下では58%に活性が低下した。またフェニルメチルスルホニルフルオリドによっても活性低下がみられることから、システイン及びセリン残基が本酵素の活性に関与していることが示唆された。

2. エンドー β -N-アセチルグルコサミニダーゼのアスパラギン結合糖鎖への作用

微生物由来の酵素とは異なりラット肝臓由来の酵素は、高マンノース型糖鎖構造を持つ $[^{14}\text{C}]\text{C}-\text{GP}-\text{V}$ のみならず、複合型糖鎖 $\text{Gal}_2 \cdot \text{GlcNAc}_2 \cdot \text{Man}_3 \cdot \text{GlcNAc}_2 - \text{N}-[^{14}\text{C}]\text{acetyl Asn}$ にも作用した。そこでこれら糖ペプチドがエキソグリコシダーゼ群の協同作用で分解したのではないことを証明するために、上記二つの糖ペプチドを基質にし酵素反応を行ない、遊離少糖を $\text{NaB}([^3\text{H}])_4$ で還元標識後、Bio-Gel P-4 カラムクロマトグラフィー及びエキソグリコシダーゼの逐次分解により構造を調べ、実際に $\text{Man}_5 \cdot \text{GlcNAc}$ あるいは $\text{Gal}_2 \cdot \text{GlcNAc}_2 \cdot \text{Man}_3 \cdot \text{GlcNAc}$ が遊離されていることを確認した。

また、両者に働く酵素は各々互いに大量の糖ペプチド添加により水解が阻害されることから同一のものであることが示唆された。

$[^{14}\text{C}]\text{GP}-\text{V}$ について $K_m = 6.06 \times 10^{-4} \text{ M}$, $V = 1.64 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, $\text{Gal}_2 \cdot \text{GlcNAc}_2 \cdot \text{Man}_3 \cdot \text{GlcNAc}_2 - \text{N}-[^{14}\text{C}]\text{acetyl Asn}$ については $K_m = 2.15 \times 10^{-4} \text{ M}$, $V = 5.86 \times 10^{-2} \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}$ という値が得られた。

3. エンドー β -N-アセチルグルコサミニダーゼの基質特異性

基質特異性を明らかにするために図1に示すような種々の糖ペプチド、少糖を用いて酵素反

応を行ない、その水解率を比較した。

表 1

基 質	相対水解率 (%)
Man ₉ · R ₁	25.1
Man ₈ · R ₁	31.6
[¹⁴ C]GP-IIIB	23.8
[¹⁴ C]GP-IV	42.0
[¹⁴ C]GP-V	43.2
[¹⁴ C]GP-VI	38.9
Man ₃ · R ₁	49.1
Manα1—6Man · R ₁	0.6
Manα1—3Man · R ₁	0.6
Man · R ₁	0.1
R ₁	0.1

R₁ = GlcNacβ1—4GlcNac—N-[¹⁴C]acetylAsn.

表 2

基 質	相対水解率 (%)
[¹⁴ C]GP-V	66.3
[¹⁴ C]GP-I	0.7
[¹⁴ C]GP-IIIB	1.6
[¹⁴ C]GP-IIIA	20.2
[¹⁴ C]GP-IIIC	7.9
GlcNac · Man ₉ · R ₁	24.1
Man ₃ · R ₁	75.4
Man ₃ · R ₂	0.3
Gal ₂ · GlcNac ₂ · Man ₃ · R ₁	9.8
[³ H]Gal ₂ · GlcNac ₂ · Man ₃ · GlcNac ₂	7.2
Gal ₂ · GlcNac ₂ · Man ₃ · GlcNac · GlcNac _{OT}	0.1

R₁ = GlcNacβ1—4GlcNac—N-[¹⁴C]acetylAsn.

R₂ = GlcNacβ1—4(Fucα1—3 or 6)GlcNac—N-[¹⁴C]acetylAsn.

名 称	構 造
高マンノース型系	
Man ₁ -GlcMac ₁ -Asn	$ \begin{array}{c} \text{Man}_1-2\text{Man}_1-6\text{Man}_1-6\text{Man}_1-4R_1 \\ \text{Man}_1-2\text{Man}_1-6\text{Man}_1-6\text{Man}_1-4R_1 \\ \text{Man}_1-2\text{Man}_1-2\text{Man}_1-6\text{Man}_1-4R_1 \end{array} $
Man ₁ -GlcMac ₁ -Asn	$ \begin{array}{c} \text{Man}_1-6\text{Man}_1-6\text{Man}_1-4R_1 \\ (\text{Man}_1-2)_2 \quad \text{Man}_1-6\text{Man}_1-6\text{Man}_1-4R_1 \\ \text{Man}_1-6\text{Man}_1-4R_1 \end{array} $
GP-III B	$ \begin{array}{c} \text{Man}_1-2\text{Man}_1-6\text{Man}_1-6\text{Man}_1-4R_1 \\ \text{Man}_1-6\text{Man}_1-6\text{Man}_1-4R_1 \\ \text{Man}_1-2\text{Man}_1-6\text{Man}_1-4R_1 \end{array} $
GP-IV	$ \begin{array}{c} \text{Man}_1-6\text{Man}_1-6\text{Man}_1-4R_1 \\ \text{Man}_1-6\text{Man}_1-6\text{Man}_1-4R_1 \\ \text{Man}_1-2\text{Man}_1-6\text{Man}_1-4R_1 \end{array} $
GP-V	$ \begin{array}{c} \text{Man}_1-6\text{Man}_1-6\text{Man}_1-4R_1 \\ \text{Man}_1-6\text{Man}_1-6\text{Man}_1-4R_1 \\ \text{Man}_1-6\text{Man}_1-4R_1 \end{array} $
GP-VI	$ \begin{array}{c} \text{Man}_1-3\text{Man}_1-6\text{Man}_1-4R_1 \\ \text{Man}_1-6\text{Man}_1-4R_1 \end{array} $
Man ₁ -GlcMac ₁ -Asn	$ \begin{array}{c} \text{Man}_1-6\text{Man}_1-4R_1 \\ \text{Man}_1-6\text{Man}_1-4R_1 \end{array} $
Man ₁ -4Man-GlcMac ₁ -Asn	$ \text{Man}_1-4\text{Man}_1-4R_1 $
Man ₁ -3Man-GlcMac ₁ -Asn	$ \text{Man}_1-3\text{Man}_1-4R_1 $
Man-GlcMac ₁ -Asn	$ \text{Man}_1-4R_1 $
複合型系	
Gal ₁ -GlcMac ₁ -Man ₁ -GlcMac ₁ -Asn	$ \begin{array}{c} \text{Gal}_1-4\text{GlcMac}_1-2\text{Man}_1-6\text{Man}_1-4R_1 \\ \text{Gal}_1-4\text{GlcMac}_1-2\text{Man}_1-6\text{Man}_1-4R_1 \end{array} $
[¹⁴ C]Gal ₁ -GlcMac ₁ -Man ₁ -GlcMac ₁ -Asn	$ \begin{array}{c} [^{14}\text{C}]\text{Gal}_1-4\text{GlcMac}_1-2\text{Man}_1-6\text{Man}_1-4\text{GlcMac}_1-4\text{GlcMac}_1 \\ [^{14}\text{C}]\text{Gal}_1-4\text{GlcMac}_1-2\text{Man}_1-6\text{Man}_1-4R_1 \end{array} $
Man ₁ -GlcMac ₁ -Fuc-GlcMac ₁ -Asn	$ \begin{array}{c} \text{Man}_1-6\text{Man}_1-4R_1 \\ \text{Man}_1-6\text{Man}_1-4R_1 \end{array} $
混合型系	
GP-I	$ \begin{array}{c} \text{Man}_1-6\text{GlcMac}_1-6\text{Man}_1-4R_1 \\ \text{Man}_1-6\text{GlcMac}_1-6\text{Man}_1-4R_1 \\ \text{Gal}_1-4\text{GlcMac}_1-6\text{Man}_1-4R_1 \\ \text{GlcMac}_1-6\text{Man}_1-4R_1 \end{array} $
GP-II B	$ \begin{array}{c} \text{Man}_1-6\text{GlcMac}_1-6\text{Man}_1-4R_1 \\ \text{Man}_1-6\text{GlcMac}_1-6\text{Man}_1-4R_1 \\ \text{GlcMac}_1-6\text{Man}_1-4R_1 \end{array} $
GP-III A	$ \begin{array}{c} \text{Man}_1-6\text{GlcMac}_1-6\text{Man}_1-4R_1 \\ \text{Man}_1-6\text{GlcMac}_1-6\text{Man}_1-4R_1 \\ \text{GlcMac}_1-6\text{Man}_1-4R_1 \end{array} $
GlcMac ₁ -Man ₁ -GlcMac ₁ -Asn	$ \begin{array}{c} \text{Man}_1-6\text{GlcMac}_1-6\text{Man}_1-4R_1 \\ \text{Man}_1-6\text{GlcMac}_1-6\text{Man}_1-4R_1 \end{array} $

R₁ = GlcMac₁-4GlcMac₁-Asn

R₂ = GlcMac₁-4(Fuc₁-3 or 6)GlcMac₁-Asn

表1に示すように $\text{Man}\alpha 1-6 (\text{Man}\alpha 1-3) \text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc}-\text{Asn}$ を母核に持つ高マンノース型アスパラギン結合糖鎖は速やかに水解されたが、その母核の部分分解物はいずれも殆ど水解されなかった。

表2に示すように、この $\text{Man}_3 \cdot \text{GlcNAc}_2 \cdot \text{Asn}$ の還元末端の N-アセチルグルコサミンの3か6の位置にフコースが置換すると殆ど水解されなくなり、この母核を持つ複合型糖ペプチド $\text{Gal}_2 \cdot \text{GlcNAc}_2 \cdot \text{Man}_3 \cdot \text{GlcNAc}_2 \cdot \text{Asn}$ でもその水解率は1桁低くなった。またこの糖ペプチドをアスパラギナーゼ消化し、 $\text{Gal}_2 \cdot \text{GlcNAc}_2 \cdot \text{Man}_3 \cdot \text{GlcNAc}_2$ の形にしてもほぼ同様の酵素活性を示したが、この還元末端 N-アセチルグルコサミンを NaBH_4 で還元し糖アルコールにすると酵素は働かなくなった。

また、混合型アスパラギン結合糖鎖においては、 $\beta-\text{Man}$ 残基の4位に置換した N-アセチルグルコサミンの存在のため水解率は約30%減少した。

第II部 フコシドーシス患者の培養線維芽細胞中のエンドー $\beta-\text{N}$ -アセチルグルコサミニダーゼの特性

フコシドーシス患者の培養線維芽細胞のホモジネートを経験源として用い、基質として Man_5-R_1 , Man_3-R_1 , $\text{Gal}_2 \cdot \text{GlcNAc}_2 \cdot \text{Man}_3-R_1$, $\text{Man}\alpha 1-6 \text{Man}\beta 1-4R_1$, Man_3-R_2 及び $\text{Fuc}_2 \cdot \text{Gal}_2 \cdot \text{GlcNAc}_2 \cdot \text{Man}_3-R_2$ $\left\{ R_1=\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc}-\text{N}-[^{14}\text{C}] \text{acetyl Asn}, R_2=\text{GlcNAc}\beta 1-4(\text{Fuc}\alpha 1-3 \text{ 又は } 6) \text{GlcNAc}-\text{N}-[^{14}\text{C}] \text{acetyl Asn} \right\}$ を使用して調べたところ、ラット肝臓由来のものと同じ結果が得られた。

また第I部の2と同様の方法で $\text{Gal}_2 \cdot \text{GlcNAc}_2 \cdot \text{Man}_3 \cdot R_1$ を用いてこの酵素で遊離した少糖の構造を調べ、実際に $\text{Gal}_2 \cdot \text{GlcNAc}_2 \cdot \text{Man}_3 \cdot \text{GlcNAc}$ が遊離されていることを確認した。

考 察

哺乳動物のエンドー $\beta-\text{N}$ -アセチルグルコサミニダーゼは、中性の至適PH (PH 7.0) を持ち、大部分はリソゾームではなく細胞質に存在していると報告されている。そして交叉阻害実験の結果より、一つの酵素が種々の型のアスパラギン結合糖鎖に働いているものと考えられる。

そこで図1に示すような種々の糖ペプチド及び少糖を用いて調べた結果、以下のような基質特異性が明らかにされた。

I グリコン特異性

- (1) $\text{Man}\alpha 1-6 (\text{Man}\alpha 1-3) \text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc}$ という構造が最小限必要である。
- (2) 母核の $\text{Man}\alpha 1-6$ 残基のC-3及びC-6位への置換、 $\text{Man}\alpha 1-3$ 残基のC-2位への置換は酵素活性に影響しない。
- (3) 母核の $\beta-\text{Man}$ 残基のC-4位への置換、 $\text{Man}\alpha 1-6$ 残基のC-2位への置換は酵素活性を低下させる。
- (4) $\text{Man}\alpha 1-3$ 残基のC-4位への置換は酵素活性を著しく低下させる。

II アグリコン特異性

- (1) 還元末端N-アセチルグルコサミンはC-4位以外で置換されていないことが必要である。
- (2) 還元末端N-アセチルグルコサミンはピラノース型であることが必要である。

以上明らかにされた哺乳動物のエンドーβ-N-アセチルグルコサミニダーゼの基質特異性は、微生物起源のものとは著しく異っているが、これによって多くの先天性エキソグリコシダーゼ欠損症患者の尿中に排泄される特徴的な構造を持つ少糖群の生成機構がうまく説明される。つまり、フコシドーシス患者の場合、リソゾームのα-フコシダーゼ欠損のためアスパラギン結合糖鎖の還元末端N-アセチルグルコサミンに置換したフコースは水解されず、その結果、この糖鎖構造を持つ糖ペプチド群はエンドーβ-N-アセチルグルコサミニダーゼの存在にもかかわらず、糖ペプチドの形のまま尿中に排泄されると考えられる。

論文審査の結果の要旨

エンドーβ-N-アセチルグルコサミニダーゼは、アスパラギン結合糖鎖のN, N'-ジアセチルキトビオース部分を水解切断して少糖を遊離する酵素で、微生物から様々な特異性を有するものが発見され、糖蛋白質糖鎖の構造と機能の研究に有効な試薬として使われて来た。

ヒトを含む哺乳動物の糖蛋白質の代謝においてエンドーβ-N-アセチルグルコサミニダーゼがリソゾームに含まれる一連のエキソグリコシダーゼ群と並んで重要な役割を演じている可能性が考えられるようになったのは、先天性代謝異常症の一種であるグリコシダーゼ欠損症の患者の尿中に大量のマノースを含む少糖が発見されたことが糸口となっている。これら少糖はいずれも欠損しているエキソグリコシダーゼによって水解除去されるべき単糖を非還元末端に持ち、還元末端にManβ1-4GlcNAcと云う二糖構造を有していると云う特徴があり、酵素欠損によって代謝不全を起した糖蛋白質の糖鎖がエンドーβ-N-アセチルグルコサミニダーゼの働きで少糖として切り出されたものと考えよううまく説明出来るわけである。ところがグリコシダーゼ欠損症の中でα-フコシダーゼを先天的に欠損したフコシドーシスの場合には、尿中に排泄されるマノース含有少糖はごく僅かで、代ってアスパラギン少糖が大量に排泄されている。

申請者はこうしたグリコシダーゼ欠損症にみられる興味ある現象の生化学的背景を探る目的で、ラットの肝臓およびヒトの培養線維芽細胞を材料に哺乳動物のエンドーβ-N-アセチルグルコサミニダーゼの研究を実施した。論文は二部に分れていて、第一部はラットの肝臓の酵素に関する詳細な性質の研究であり、第二部はヒトの線維芽細胞の酵素に関する研究成果をまとめたものである。両酵素の間に本質的な違いはなく、哺乳動物のエンドーβ-N-アセチルグルコサミニダーゼはいずれも次のような諸性質を持つと結論している。

哺乳動物のエンドーβ-N-アセチルグルコサミニダーゼの第一の特徴はその細胞内分布で、エキソグリコシダーゼとは異なり、リソゾームには殆んど存在せず、主として細胞質に分布している。第二の特徴はその基質特異性で、アスパラギン結合糖鎖のうちで高マノース型とハイブリット型にしか作用しない微生物の酵素とは異なり、哺乳動物の酵素は複合型の糖鎖も水解する

ことが出来る。

以上の知見に加えて申請者は更に、構造のわかった糖ペプチドを部分分解してえた22種の糖ペプチド並びに3種の少糖に対する本酵素の作用を詳細に調べて、その基質特異性の全体像を次のように明らかにすることに成功した。すなわち、本酵素は $\text{Man}\alpha 1-6(\text{Man}\alpha 1-3)\text{Man}\beta 1\rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1\rightarrow 4\text{GlcNAc}$ と云う5糖構造を必要最小構造として要求し、これより小さな糖鎖を持った糖ペプチドには殆ど作用しない。又この5糖構造を有していても、根本のN-アセチルグルコサミンにフコースを結合した糖鎖には一切作用しないのである。

この特異性によって、フコシドーシス患者の尿中に主としてアスパラギン少糖が排泄されている事実がきれいに説明出来る。すなわち、フコシドーシス患者では糖鎖の根本のフコースが除去出来ず、したがってこのような糖鎖をエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼで消化することが出来ない為、アスパラギン結合少糖のまゝ排泄してしまうことになると考えられる。

以上、概説したように本研究は従来全く不明であったヒトを含む哺乳動物のエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼの細胞内分布並びにその基質特異性の全貌を明らかにしたもので、人体内での糖蛋白質の代謝を理解する上で極めて重要な知見を加えた点で価値ある業績であると認める。よって、本申請者は医学博士の学位をうる資格があると認める。