

哺乳類皮膚細胞のアポトーシスと 細胞接着をつかさどるセラミドの研究

九州大学 理学部

野村 一也

In this study, we showed that antibodies against human blood group B trisaccharides block Ca^{2+} dependent cell-cell adhesion of frog (*Xenopus laevis*) embryonic cells. We isolated several different novel pentaglycosylceramides with blood group B activity. The structure is novel in that it lacks N-acetylhexosamine in its core carbohydrate structure. By using two dimensional electrophoresis followed by western blot analysis, we identified two series of acidic proteins in 30-60 kDa range. We showed that one series of protein spots represents proteins with glycosyl phosphatidylinositol anchor (GPI-anchor). The effect of phosphatidylinositol specific phospholipase C on Ca^{2+} dependent cell-cell adhesion was tested and the enzyme treatment inhibited Ca^{2+} dependent adhesion of embryonic cells completely. From these experiments, we concluded the presence of novel GPI-anchored cell-cell adhesion molecules with human blood group B antigens. Blood group B active glycosylceramides were also detected in the nematode *Caenorhabditis elegans*. In the nematode and in frog cells, the blood group B active glycoconjugates colocalized with cadherins. The colocalization is observed in nematode nervous cells and in frog embryonic cells and in skin cells. The cadherins and blood group B active glycoconjugates seem to be forming supramolecular complex on cell surface. On the basis of our findings, it now seems possible to isolate homologous glycoconjugates (especially GPI-anchored glycoproteins) from mammalian skin cells. Isolation of mammalian homologues of these novel GPI-anchored glycoproteins and glycosylceramides of frog cells will certainly shed light on the mechanism of skin cell adhesion, thus deepening our understanding of the dynamic nature of homeostasis of skin cells through differentiation and apoptosis. The possible interaction of signaling pathways through ceramide, cadherin and diacylglycerol is also discussed.

1 緒言

私達はアフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) の初期胚 (卵母細胞から胞胚まで) におけるカルシウムに依存した細胞接着が、ヒトのABO式血液型物質の一つであるB型物質に対する抗体で完全に阻害されることを明らかにした。

カルシウムを除いて細胞一個一個がバラバラになるように解離したカエルの胚細胞はカルシウムを加えてやると15分から1時間程度で接着を始め大きな凝集塊を形成する。この実験でカル

シウムの他にヒトB型血液型物質に対する抗体を加えておくといくら待っても細胞は凝集塊を形成せず、バラバラのままである。この後抗体を洗い流してやると細胞は急速に接着をするようになり大きな凝集塊を形成する。抗体の代わりにヒトB型血液型糖鎖自体を加えると拮抗阻害により同様に細胞の接着は破壊された。これらの実験により従来機能が無いと考えられていたヒトB型血液型糖鎖は非常に意外なことにカエルでは細胞接着分子として機能していることが確実となった¹⁾。

ではこのB型血液型糖鎖はいったいどのような分子上に存在しているのだろうか？ヒト血液型B型物質は主としてアフリカツメガエルの初期胚の膜上に存在する糖蛋白質と糖脂質上に存在しており、その中の糖脂質について構造決定を行ったところ、全く新しい構造を有する5糖の中性糖脂質であることが判明した (Fig.1)¹⁾。このグリコシルセラミドはどのようにして細胞接着に機能し

Study on novel glycosylceramides mediating cell-cell adhesion of mammalian skin cells-their possible involvement in apoptosis
Kazuya Nomura
Department of Biology, Faculty of Science, Kyushu University



Gal α 1-3

Gal β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-1'Cer

Fuc α 1-2

Fig. 1 Novel glycosylceramides found in frog (*Xenopus laevis*) embryonic cells

ているのだろうか？またB型糖鎖を含有している糖蛋白質はどのようなものでどのように細胞接着に関与しているのだろうか？代表的なカルシウム依存性細胞接着分子であるカドヘリンとは一体どのような関係にあるのだろうか？

アフリカツメガエル初期胚でみつかったB型糖鎖含有グリコシルセラミドとB型糖鎖含有糖蛋白質はツメガエルの皮膚細胞にも存在しておりその機能が皮膚細胞の分化と恒常性の維持に重要な役割を果たしていると考えられる。本研究ではカエルの細胞接着に重要な役割を果たしているこれらB型糖鎖含有複合糖質の研究を通じて哺乳類の皮膚細胞における相同分子の手がかりを求め、これら分子の細胞接着とアポトーシスへの寄与の可能性を追求した。

2 実験

2.1 モノクローナル抗体の作成

P3U1ミエローマ細胞と免疫感作したBalb/cマウスの脾臓細胞をポリエチレングリコール4000（メルク・ガスクロマトグラフィーグレード）によって融合させることでハイブリドーマを得た。融合は文献²⁾に正確に従った。目的とするクローンをスクリーニングの後、限外希釈法でクローニングしハイブリドーマを得た。抗原としてヒトB型糖鎖に対するモノクローナル抗体の作成にはヒトB型赤血球・豚B型ムコ多糖・アフリカツメガエル胎胚膜フラクションを用いた。カエルのXBカドヘリンに対するモノクローナル抗体の作成にはクローニングしたXBカドヘリンの遺伝子をマウスの皮

膚由来線維芽細胞L929細胞にトランスフェクトした細胞を用いた。スクリーニングの方法としてはB型糖鎖の場合は96穴それぞれの培養上清をELISAプレートに100 μ l入れこれに1 \times 10⁵ヶのB型ヒト赤血球を加え直ちにプレートごと遠心する。赤血球に対する抗体含む上清を加えた穴では赤血球の凝集が遠心終了直後からはっきりと観察できる。この迅速スクリーニング法を採用してからは百発百中で候補を見つけることが出来るようになった。また候補がB型物質に特異的であるかどうかはO型赤血球やA型赤血球を凝集しないことで確認しさらにB型糖脂質との反応性で最終的確認を行った。XBカドヘリンに対するモノクローナル抗体のスクリーニングには培養上清を96穴培養皿にいれ同時にEDTAで解離した1 \times 10⁵ヶ程度のXBカドヘリンを発現させたマウス皮膚由来L929細胞を同時にまきこんだ。1日培養した後細胞と細胞の接着が阻害されている穴を選び同様の実験を再度くりかえすとともに抗体の産生の有無をチェックした。さらに候補の穴で産生される抗体を使いウエスタンブロッティングして確認した。

2.2 糖脂質と糖蛋白質の分析

得られた抗体や本研究で用いた抗体がどのような抗原を認識しているかをさまざまな方法で調べた。糖脂質についてはFolch分配法で抽出分離した後、薄層クロマトグラフィー法で展開した¹⁾。この薄層プレートに抗体液を重層して一晩放置したうえでよく洗い流し、つぎにアルカリフォスファターゼ標識の二次抗体をかけて数時間以上放置し、この二次抗体をよく洗い流した後BCIP/NBTの発色剤で発色して観察した。

蛍光抗体法には3%パラホルムアルデヒドで固定した胎胚のクライオスタット切片を作成し、抗体と数時間インキュベートした後よく洗いFITC標識の二次抗体をかけて更に数時間インキュベートした。この切片をよく洗った後レーザー共焦点顕微鏡 (Zeiss LSM410) で観察した。またウエスタンブロッティング法は通常の7.5%ゲルに

よるSDS電気泳動の後、セミドライのプロット
ング装置でニトロセルロース膜に転写するという
方法で行った。転写の効率のモニターは色素染色
済みの分子量マーカをつかうとともにボンソー
Sによる膜の可逆的染色法により行った。二次元
電気泳動にはPharmacia Biotech社製のMulti-
phor II システムを使い、一次元目の等電点電気泳
動にはImmobiline Dry strip (PI 3.0-10)、二次
元目のSDS電気泳動にはExcel Gel SDS precast
gradient gelを利用した。プロットングはフィル
ムリムーバーでゲルをはがした後、ATTO社製の
セミドライプロットング装置で行った。

3 結果

3.1 B型糖鎖に対するモノクローナル抗体の作製

B型糖鎖に対する市販のモノクローナル抗体は
カエルのカルシウム依存性細胞接着を完全に阻
害する。しかし市販品の利用は抗体のアフィニ
ティークロマトグラフィーなどへの利用などを考
えると経済的ではない。そこで自前で強力な抗
B型血液型物質に対するモノクローナル抗体を作
成した。こうして得られた抗体はB型ヒト赤血球
を特異的に凝集する他、胞胚解離細胞のカルシ
ウム依存性細胞接着を完全に阻害し、さらに胞胚
のクライオスタット切片をそめてみると見事に膜
表面を染色した。また数種類のB型糖鎖含有糖蛋
白質に対して特異性の違う抗体が得られた。さら
に面白いことにヒトB型糖鎖の抗体を作製するに
は、カエルの膜フラクションがもっとも抗原性の
点から適していることもわかった。

3.2 ヒト血液型B型糖鎖を含む複合糖質の同定

カエルの初期胚に存在するB型糖鎖含有複合糖
質は糖蛋白質と糖脂質からなる。それぞれどのよ
うな分子がB型糖鎖を付加されておりどのように
細胞接着に関与しているのだろうか？これを調べ
るため糖脂質と糖蛋白質の分析を行った。糖脂質
の方の主要分子としてはFig. 1に示した中性のグ

リコシルセラミドがある。セラミドの部分の脂肪
酸の組成にのみ違いのある2種類の中性糖脂質、
および糖鎖の数の多いもう1種合計3種類の主要な
B型糖鎖含有中性糖脂質が存在することが判明し
た。膜表面に存在するこれらのB型糖鎖含有糖脂
質はかなり大量に存在する糖脂質でありその存在
量の多さは重要な機能の存在をうかがわせる。
A型糖鎖含有複合糖脂質もごくわずかながら存在
するがB型糖鎖含有糖脂質に比べると0.1%以下し
か存在せず、またB型糖鎖を含む極微量のガング
リオシドも検出したがあまりにも微量のためにそ
の構造解析は不可能であった。

次にB型糖鎖を含有する糖蛋白質については二
次元電気泳動法と抗B型糖鎖モノクローナル抗体
を利用したウエスタンプロットングで解析した。

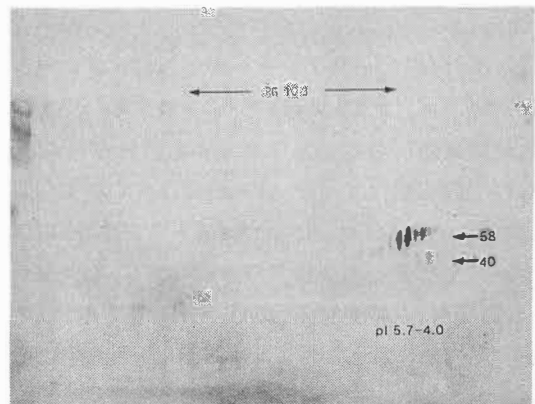


Fig. 2 Novel blood group B active proteins separated by two-dimensional electrophoresis

Fig. 2に示すように分子量30-60kDaにわたる複数
種の蛋白質がアフリカツメガエルの膜フラクショ
ンに存在していることがわかった。これらは
fucosidaseやgalactosidaseなどB型糖鎖を消化す
る酵素で抗原性が失われるのでB型糖鎖を含有し
ていることが確認できた。またこれらの蛋白質は
カエルの皮膚細胞にも存在することが分かった。
このようにB型糖鎖を有する数種類の分子が存在
するわけだがこれらはいったいどのような性質を

もった分子なのだろうか？

3.3 B型糖鎖含有糖蛋白質の性質の解明

アフリカツメガエルの膜を脱脂質するとB型糖鎖に対する抗体による蛍光染色性がかなり弱まることがわかった。これはグリコシルセラミドが膜から失われることによると当初は考えた。確かにグリコシルセラミドは脂質をぬく操作（クロロホルム、メタノール、水による抽出¹¹⁾）をすると失われるが、念のために蛋白質もこの操作で抽出されないかどうか調べてみた。すると面白いことに二次元電気泳動で検出されるFig. 2の膜タンパク質群の中で分子量の高い方の一群の糖蛋白質が消えてしまうことが判明したのである。脂質と同じような操作で抽出される蛋白質としてはGPI (glycosylphosphatidylinositol) アンカー型蛋白質が考えられる。そこでさっそくこれら抽出される蛋白質が、GPIアンカー型蛋白質かどうかを調べてみた。結果は明確で、GPIアンカー型蛋白質を特異的に二相分配できる界面活性剤Triton X114で膜を抽出すると、B型糖鎖を含む糖蛋白質はTriton X114がわに分配され、さらに膜をGPIアンカーを特異的に切断する酵素である phosphatidylinositol 特異的 phospholipase C (PI PLCと略) で処理するとこれらは水層側に分配されることが判明した。この酵素は蛋白分解酵素活性はなく、かつ極めて特異的であるのでB型糖鎖含有糖蛋白質の分子量高い一群はGPIアンカー型糖蛋白質であると結論された。

3.4 GPIアンカー型B型糖鎖含有糖蛋白質は細胞接着に関与している

このGPIアンカー型B型糖鎖含有糖蛋白質は細胞接着に関与しているのだろうか？幸いなことにPI PLCは中性付近のpHで活性が保たれており、かつカルシウム存在下でその活性があまり阻害されない。そこでカルシウムを除いて胞胚を単一細胞にまで解離し、これにカルシウムを加えて再凝集させる実験系（緒言参照）にこの酵素を加

えて接着活性に対する効果のみてみた。その結果は劇的で酵素処理した割球は全くカルシウムがあっても接着せず、カルシウム依存性細胞接着性は完全に酵素処理で失われてしまった。また酵素を除いてよく洗い2時間程度回復させると接着能は回復した。この実験からアフリカツメガエルの初期胚の細胞接着にはB型糖鎖を付加されたGPIアンカー型蛋白質が接着分子として働いていることがわかった。現在この分子の部分的アミノ酸配列の決定を試みようとしているところである。

3.5 B型糖鎖とカドヘリンは相互作用している可能性が高い

カドヘリンはカエルでは120-140kDa程度の大きな分子量をもつ膜一回貫通型蛋白質でB型糖鎖は付加されていない。しかしカルシウム依存性細胞接着の主要分子と考えられており私達の発見したB型糖鎖含有複合糖質はこのカドヘリンと相互作用している可能性が高い。そこでこの可能性の追求のためにまずカエルの胞胚型カドヘリンに対するモノクローナル抗体を作製した。方法としては哺乳類皮膚細胞としてマウスの皮膚由来の線維芽細胞であるL929細胞をえらび、これに熊本大学の但馬達哉助手と私たちの共同研究の結果えられたアフリカツメガエルの初期胚型カドヘリン (XBカドヘリン) の完全長遺伝子をリポフェクチンを利用してL929細胞に導入（京都大学医学部永淵昭良先生のプロトコルによる導入ベクターを用いた。）し、カルシウム依存性細胞接着能を有しかつ約119kDaのXBカドヘリンを発現している細胞株をクローニングした。この細胞を用いてマウスを免疫感作しカエルのXBカドヘリンに対するモノクローナル抗体11Dを得た。B型糖鎖に対するモノクローナル抗体とカドヘリンに対するモノクローナル抗体で二重染色するとアフリカツメガエルの胞胚や皮膚細胞ではカドヘリンとB型糖鎖が同一の細胞接着部位に存在していることが分かった。

この実験からカドヘリンとB型糖鎖が皮膚細胞や胎胚細胞で局在性を同じにして相互作用している可能性が強く示唆されたわけである。私達はB型糖鎖はカドヘリンと細胞膜上で超分子複合体を形成しているものと考え現在弱い相互作用を検出できる量子プラズモン共鳴を用いたバイオセンサー（BIAcore）を利用し、B型糖鎖とカドヘリンの結合定数の決定を行っているところである。

3.6 哺乳類皮膚細胞での細胞接着分子とアポトーシスの関係の解明に向けて

アフリカツメガエルを用いて得られた以上の結果は胎胚の細胞や皮膚の細胞においてGPIアンカー型のB型糖鎖含有糖蛋白質が存在しておりカドヘリンと超分子複合体を形成しながら、細胞接着に機能していることを強く示唆している。現在までのところカドヘリンと相互作用する分子としては両生類や哺乳類・鳥類などすべての脊椎動物で細胞質側で結合するカテニン類が知られている。私達が発見したようにグリコシルセラミドやGPIアンカー型蛋白質が、皮膚の細胞を含む多細胞生物の細胞において、カドヘリンと相互作用していることはまったく知られていなかったのである。この研究の遅れの原因の一つはグリコシルセラミドの研究者でカドヘリンとの関連を追及する研究者が私達以外皆無であったこと、もうひとつはGPIアンカー型蛋白質やグリコシルセラミドのカドヘリンとの相互作用が、糖鎖-蛋白質の相互作用であるため比較的弱く、通常の免疫沈降反応では複合体として落ちてこなかったことによると思われる。ツメガエルの細胞接着機構は哺乳類の皮膚細胞の接着機構とカドヘリンに関する限り完全に同一であり互換性を有することが知られている。本研究の結果、カドヘリンと相互作用すると考えられる新しいグリコシルセラミドとGPIアンカー型糖蛋白質が同定できた訳で、これらの分子の相同分子を哺乳類皮膚細胞で検索同定できる可能性は極めて高い。

カドヘリンが相互作用する相手のB型糖鎖含有

糖蛋白質がGPIアンカー型糖蛋白質であることは細胞接着にPhospholipaseCやdiacylglycerolを介した信号伝達系が関与していることをうかがわせる。カドヘリンを介する信号伝達系としてはショウジョウバエのwingless相同分子からカテニンへの信号の流れが詳しく解明されており、さらに成長因子であるEGFのリセプターがカドヘリンと膜上で会合している可能性が指摘されている³⁾。そこでEGFをカエルの細胞にかけてみた。

B型糖鎖の発現量は細胞周期に依存しており通常は全細胞集団の20%程度でG1初期とG2、M期にのみ発現している。だがこの成長因子をかけると24時間で発現量は100%に増加した。この事実はB型糖鎖の発現がEGFからの信号伝達とうまく共役していることを示唆している。この信号伝達系はGPIアンカーと共役しているのだろうか？二次元電気泳動を利用して判明したGPIアンカーでない高分子量側の分子群がEGFリセプター自体である可能性も検討中である。phospholipase Cやdiacylglycerolを介した信号伝達系の細胞接着への関与の可能性は細胞接着における信号伝達系のクロストークの観点から極めて興味深い。また成長因子を培養液から除去した際に生ずるアポトーシスにおいてカドヘリンの機能はどう変化するのか、またこのアポトーシスにおいてB型糖鎖を有するグリコシルセラミドがどのような変化をみせるのかなどを詳細に調べることで、哺乳類皮膚細胞とカエル皮膚細胞・カエル胚細胞に共通した細胞接着とアポトーシスの実態が解明できるものと期待される。

3.7 グリコシルセラミドとカドヘリンの関係の線虫を用いた解析

線虫（*C. elegans*）は現在最も遺伝子レベルで解析の進んでいる生物である。その全ゲノムDNAの塩基配列決定計画はヒトゲノムプロジェクトをリードするかたちで進んでおり数年以内には確実に全ゲノムの塩基配列が決定されるはずだし、体を構成する細胞1000個あまりがどのように分裂し

て発生するかという細胞系譜が完全に判明している。また神経細胞（といっても300個ほどしかない）の配線図がほぼできあがっていることも他の生物の研究の追隨を許さない。さらに突然変異の系統の蓄積・遺伝解析の進歩も他に類をみない利点である。この生物は下等とはいえ、さまざまな哺乳動物と共通の遺伝子を機能させている。最近では癌遺伝子rasへの信号伝達系路の解明に大きく貢献したことは記憶に新しい⁴⁾。この線虫にもカドヘリンやグリコシルセラミドはあるのだろうか？もしこの生物にグリコシルセラミドがあり、またあわよくばB型糖鎖を持つグリコシルセラミドがあればグリコシルセラミドの合成系路の研究や遺伝子発現の制御機構の研究がゲノムプロジェクトやミュータントの蓄積を利用して飛躍的に進むと予想できる。その結果はほとんどの場合ただちに哺乳類にフィードバックできるであろう。この期待のもとに線虫のグリコシルセラミドの研究を開始したところ大変期待できる結果が得られた。

線虫を大量培養したうえで超音波破碎して脂質をFolch分配⁵⁾により抽出した。薄層クロマトグラフィーで脂質を展開し糖を染色するオルシノール試薬で発色すると各種の糖脂質が存在することが判明した。さらに薄層クロマトグラフィープレート上での抗体染色法によって検討した結果酸性糖脂質分画ではなく中性糖脂質分画にさまざまなB型糖鎖含有糖脂質が存在することが判明した。これらの脂質がB型糖鎖構造をもつことはこれらの脂質を α ガラクトシダーゼや α ガラクトシダーゼで処理して染色性が失われることで確認した。ヒト血液型B型糖鎖が線虫*C. elegans*に存在すること（しかしA型糖鎖やO型糖鎖も確認できなかった。）はB型血液型糖鎖が非常に基本的な役割を果たしていることを強く示唆している。さらに面白いのは、古典的カドヘリンとよばれるカドヘリン一般に対する抗体が咽頭の神経を染色しさらにその神経細胞にB型糖鎖が局在しているという結果である。このことはカエルで確認したカドヘリン

とB型糖鎖の相互作用という事実がさらに一般的に成立することを強く示唆している。線虫はアポトーシスの研究がもっとも進んでいる生物であり、アポトーシスの抑制遺伝子ced-9やアポトーシスを引き起こす遺伝子ced-3のホモログとしてそれぞれ、ヒトのアポトーシスにかかわるbcl-2やinterleukin 1 β converting enzyme (ICE)などが解明されてきている⁶⁾。これらのアポトーシスの研究の蓄積を利用してグリコシルセラミドとカドヘリンのアポトーシスへの関係を解明し哺乳類皮膚細胞のグリコシルセラミドとアポトーシス、そして細胞接着の関連の解明を行いたいと考えている。

4 考 察

カエルと線虫は哺乳類とは一見かけ離れた研究材料であるが、意外に哺乳類の研究に役立つものである。皮膚細胞の細胞接着とアポトーシスを媒介するであろうグリコシルセラミドやセラミドの研究の過程で、私達は細胞接着分子であるカドヘリンと相互作用している新しいグリコシルセラミドとGPIアンカー型糖蛋白質の存在を明らかにした。これらがカエルのみならず哺乳類細胞にも存在することはほぼ確実であると考えられ今後GPIアンカー型糖蛋白質の部分的アミノ酸配列の決定による遺伝子の単離をおこない、その遺伝子を利用して哺乳類皮膚細胞での相同分子を同定する計画である。またカエルと線虫での研究をさらにすすめて哺乳類におけるアポトーシスと細胞接着におけるGPIアンカー型糖蛋白質の機能の解明を行い、カドヘリンを介した細胞接着とそれに関わる信号伝達系のネットワークを解明したいと考えている。

謝 辞

本研究を多方面にわたり支援していただきましたコスメトロジー研究振興財団に心から感謝いた

します。またこの研究のあらゆる局面で相談にのっていただきました理化学研究所国際フロンティア・糖細胞情報のチームリーダー平林義雄先生、九州大学農学部伊東信先生、京都大学農学部山本憲二先生、その他私たちのすべての共同研究者の方々に感謝いたします。また当時ケンブリッジ大学におられたChris Wylie教授とJanet Heasman博士、Adrian Turner博士には筆者の目を糖鎖生物学に向けさせていただいたことについて心からの感謝を捧げます。

引用文献

- 1) K. Nomura et. al. *Biochemical J.*, 306 821-827 1995
- 2) 細胞免疫実験操作法、川口進・原田孝之訳理工学社 第17章
- 3) H. Hoschuetzky et. al. *J. Cell Biol.*, 127 1375-1380 1994
- 4) 形態形成にかかわる遺伝子群(蛋白質・核酸・酵素 増刊)、西田育巧 他編、共立出版、178-190.
- 5) R. L. Schnaar and L.K. Needham, *Methods in Enzymology*, Vol.230, p371. Academic Press, New York, 1994.
- 6) アポトーシス実験プロトコール、田沼靖一監修、細胞工学別冊、秀潤社