

# 26W-am01S

## ヒトノイラミニダーゼ4の発現と分子特性解析

○月本 準<sup>1</sup>, 伊藤 孝司<sup>2</sup> (<sup>1</sup>徳島大薬, <sup>2</sup>徳島大薬院)

【目的】ヒトノイラミニダーゼ (NEU) には4種類のアイソザイム (NEU1~NEU4) があり、このうち、NEU1 はリソソームに局在し、その活性化にカテプシン A (CTSA) との会合が必要である。NEU2 は細胞質に存在し、NEU3 は細胞膜に存在している。NEU4 にはミトコンドリアに移行する NEU4 Long とリソソームに移行する NEU4 Short の2種類のアイソフォームが知られている。NEU4L はミトコンドリア、NEU4S はリソソームに局在すると報告されているが、その機構等は不明な点が多い。本研究では NEU4 の細胞内局在機構を解明する目的で、NEU4L と NEU4S の発現実験を行うとともに、組換え酵素の分子特性解析を行った。

【方法】NEU4 はアスパラギン結合型 (N 型) 糖鎖を持ち、リソソームへの輸送に必要なマンノース-6-リン酸が付加されていると報告されている。そこで、N 型糖鎖を切断する PNGase を用いて糖鎖を切断し、SDS-PAGE、Western blotting により N 型糖鎖が付いているか解析した。また、N 型糖鎖を付加できるコンセンサス配列を追加した遺伝子を構築して、HEK293 細胞において発現し、分子特性解析を行った。さらに、NEU4L、NEU4S、糖鎖追加型 NEU4 の細胞内局在性を解析した。

【結果・考察】正常 NEU4 を PNGase 処理しても分子量に変化は見られず、N 型糖鎖は付加していない。また、NEU4 の配列を一部置換し、小胞体移行シグナル配列を N 末端に追加する事でノイラミニダーゼ活性を失わせることなく糖鎖を付加させることに成功した。シグナル配列が無ければ糖鎖は付加しなかったことから、細胞質で生合成される事が示唆される。現在、付加糖鎖構造解析と同遺伝子、並びに NEU4L、NEU4S 発現 HEK293 細胞の樹立を行っており、糖鎖追加型 NEU4S、野生型 NEU4L 及び NEU4S 発現細胞における細胞内局在性を比較検討していく予定である。