



Title	ヒト唾液に存在するガラクトース転移酵素の精製とその性質
Author(s)	谷口, 健詩
Citation	大阪大学, 1978, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/32300
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名・(本籍)	谷 口 健 詩
学位の種類	歯 学 博 士
学位記番号	第 4 3 7 0 号
学位授与の日付	昭 和 53 年 8 月 3 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当
学位論文題目	ヒト唾液に存在するガラクトース転移酵素の精製とその性質
論文審査委員	(主査) 教 授 常 光 旭
	(副査) 教 授 小 谷 尚 三 教 授 鈴木不二男 助教授 下 野 勉
	講 師 岩 山 幸 雄

論 文 内 容 の 要 旨

ガラクトース転移酵素は、UDP-ガラクトースよりガラクトースを単糖、オリゴ糖や複合糖質の非還元末端に転移する反応を触媒する。本酵素については、糖タンパクの生合成や複合糖質代謝異常症などの研究と関連して、哺乳動物の種々の臓器や組織のほか、脊髄液、羊水、乳汁、血液中のものに関して数多くの報告がある。近年になって、B型血液型物質に特異な構造の合成に働くガラクトース転移酵素の存在が明らかになり、また乳汁から抽出されたガラクトース転移酵素はN-アセチルグルコサミンを受容体とするほか、 α -ラクトアルブミンの存在下ではN-アセチルグルコサミンではなくグルコースを受容体とするという特異な受容体親和性を保有することが示された。

さて、唾液の糖タンパクは、歯垢の基質形成にあずかり、また歯垢が示す血液型活性、菌凝集作用や種々の免疫学的活性などの発現に係っている。この糖タンパクを構成するオリゴ糖の合成に関与する唾液中の酵素としては、シアル酸転移酵素とフコース転移酵素の存在を報じた中村ら(1975)の研究があるのみであり、ガラクトース転移酵素についてはその存在すら知られていない。

この研究で著者は、まずヒト耳下腺唾液、顎舌下腺唾液にガラクトース転移酵素が存在することを確認し、多量に採取可能な耳下腺唾液を材料として本酵素の分離・精製を試みた。ついで精製標品を用い、酵素タンパクとしての基本的性質を調べると共に、唾液糖タンパクのオリゴ糖側鎖を修飾したものを受容体とするガラクトース転移について検討を加えた。酵素活性は、触媒としてのマンガンイオンの存在下で、UDP-ガラクトースより受容体に取り込まれた¹⁴C-ガラクトースの放射能を指標として測定した。

耳下腺唾液よりの目的とする酵素の精製は、硫安塩析後、CNBr-活性化セファロース 4 Bに α -ラ

クトアルブミンを結合させたカラムを用いるアフィニティークロマトグラフィーを2回くり返すことにより行なった。得られた精製酵素標品は、ディスク電気泳動法による分析(テスト量は20 μ g)で単一のバンドを与え、分子量はゲル濾過法とSDS電気泳動法による測定で、約56,000と推定された。等電点は5.4であった。また作用の至適pHは、受容体により多少の差異がみられたが、いずれも弱アルカリ域に存在した。

精製酵素の受容体特異性を調べると、N-アセチルグルコサミンの単糖、オリゴ糖、および多糖のいずれにもガラクトースの転移がみられた。また乳汁中の本酵素と同様、唾液から得た酵素標品も、 α -ラクトアルブミンの存在下ではグルコースを受容体とする高いラクトース合成能を示した。糖タンパクに対する受容体特異性については、糖部分の構造が決定されているフェツイン、ヒト血漿糖タンパク、ウシ顎下腺ムチンなどに加えてブタ顎下腺ムチンのオリゴ糖末端を化学的に修飾した糖タンパクを受容体として検討した。その結果、N-アセチルグルコサミンをオリゴ糖部分の非還元末端とする糖タンパクに特異的にガラクトースを転移させることが確認された。さらにヒト耳下腺唾液より調製した糖タンパクのオリゴ糖側鎖の非還元末端シアル酸を緩和酸加水分解によって除いた後、 β -ガラクトシダーゼおよび β -N-ヘキソサミニダーゼ(いずれも*S. sanguis* ATCC 10557株由来)を作用させ、非還元末端より順次構成糖を酵素的に除去した糖タンパクを受容体として実験したところ、緩和酸加水分解とガラクトシダーゼ処理を行なった糖タンパクにはガラクトースが本酵素によって効果的に転移されるが、さらにヘキソサミニダーゼで処理するとガラクトースの転移が著しく減少することが明らかになった。この事実と上記の所見とを合わせて考えると、唾液中のガラクトース転移酵素は唾液糖タンパクの非還元末端糖として存在するN-アセチルグルコサミンにガラクトースを転移させる役割をもつと結論されよう。

なお、本酵素によって受容体に転移されたガラクトースの結合様式については、ジ-N-アセチルキトビオースを受容体として用い、赤外線吸収スペクトル分析ならびに α -および β -ガラクトシダーゼを用いて調べたところ、生成されるガラクトシド結合は β -立体配置であること、さらに箱守法による完全メチル化後、ガスクロマトグラフィー・質量分析を行なった結果Gal 1 \rightarrow 4GlcNAc結合であることが確認された。

最後に、採取した混合唾液を直ちに37 $^{\circ}$ Cで所定時間インキュベートし、唾液中に含まれる細菌のシアリダーゼ、ガラクトシダーゼ、およびヘキソサミニダーゼなどの酵素を働かせることにより糖タンパクの糖部分の構造を修飾したものを受容体として本酵素によるガラクトースの転移を調べた。修飾のための時間が長くなるにつれてガラクトースの糖タンパクへの取り込みが増加することが観察された。また、インキュベートする混合唾液にガラクトース転移酵素の供与体であるUDP-ガラクトースを添加すると、ガラクトースの取り込みが時間的に遅延することが認められた。

以上この研究では、耳下腺唾液のガラクトース転移酵素を精製し、かつ酵素的特性を調べ、次の諸点を明らかにした。すなわち(1)酵素タンパクの分子量は約56,000と推定された。(2)精製酵素は、UDP-ガラクトースからN-アセチルグルコサミン、またはN-アセチルグルコサミンを糖側鎖の非還元末端とする糖タンパクに、ガラクトースを特異的に転移させた。(3)これらの反応で生成したガラクトシド

結合は Gal β 1 \rightarrow 4 Glc NAcであった。(4)または α -ラクトアルブミンの存在下ではラクトース合成能がみられた。さらに、(5)口腔細菌由来のグリコシダーゼによって唾液の糖タンパクのオリゴ糖側鎖の本来の構造が失われても、唾液中のガラクトース転移酵素がもとの糖構造に修復する可能性があることが示された。

論文の審査結果の要旨

本研究は、ヒト唾液に存在するガラクトース転移酵素の分離・精製に初めて成功し、その酵素タンパクとしての特性を明らかにしたものである。また作用の面では、この酵素はUDP-ガラクトースから、N-アセチルグルコサミンまたはN-アセチルグルコサミンを糖側鎖の非還元末端とする糖タンパクに、ガラクトースを特異的に転移させることが確認され、これらの反応で生成したガラクトシド結合はガラクトース β 1 \rightarrow 4 N-アセチルグルコサミンであることが証明された。

この論文は、口腔内の生理および病理過程に重要なかわりあいをもつ唾液糖タンパクの動態を支配する要因を解析する上で、貴重な手掛りを与えるものであり、歯学博士の学位論文に十分値するものと認める。