



Title	ヒト耳下腺唾液に存在するフコース転移酵素の精製とその性質
Author(s)	玉川, 裕夫
Citation	大阪大学, 1986, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/35491
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【3】

氏名・(本籍)	たま	がわ	ひろ	お
	玉	川	裕	夫
学位の種類	歯	学	博	士
学位記番号	第	7433	号	
学位授与の日付	昭和61年	9月	22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	ヒト耳下腺唾液に存在するフコ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	猪木 令三	教授 鈴木不二男	教授 岡田 宏
	講師	高田春比古		

論文内容の要旨

フコース転移酵素は、GDP-フコースよりフコースを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、糖タンパク質の生成や、血液型の発現などの研究に関連して、哺乳類の肝臓、脾臓、脳、胃および小腸粘膜、骨髄、赤血球膜、HeLa細胞のほか乳汁、血清中のものに関して多くの報告がある。また近年、血液型物質や複合糖質の特異な糖鎖構造の合成に働く数種類のフコース転移酵素の存在が明らかにされている。

唾液の糖タンパク質は、歯垢の基質形成にあずかり、また血液型活性、菌凝集作用や種々の免疫学的活性などの発現に係わっている。この糖タンパク質のオリゴ糖鎖の合成に関与する複合糖転移酵素群の1つであるフコース転移酵素の存在は、Nakamuraら(1975)により初めて報告された。また、血液型の遺伝学的見地より、Yazawaら(1980)やJohnsonら(1981)の研究がある。しかし、これまで唾液のフコース転移酵素の精製は試みられておらず、その受容体特異性には不明な点が多い。

この研究で、著者はまずヒト耳下腺唾液、顎舌下腺唾液および全唾液にフコース転移酵素が存在することを確認し、ルイス式血液型の違いによる本酵素の転移様式の差異について調べた。ついで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、精製標品を用いて酵素タンパクの基本的性質を調べるとともに、糖鎖構造の明らかな受容体へのフコースの転移様式を調べ、さらにヒト唾液糖タンパク質の主成分であるプロリン含量の高い糖タンパク質(P R G P)へのフコースの転移様式を追求した。

本酵素の活性測定は、マグネシウムイオンの存在下でGDP-[¹⁴C]-フコースより受容体に取り込まれた[¹⁴C]-フコースの放射能を指標として行った。種々の低分子受容体および糖タンパク質受容体

を用い、耳下腺唾液のフコース転移酵素活性を調べたところ、Le(a-b+)型のヒトの耳下腺唾液では、N-アセチルグルコサミンへの $\alpha 1 \rightarrow 3$ 、N-アセチルグルコサミンへの $\alpha 1 \rightarrow 4$ およびグルコースへの $\alpha 1 \rightarrow 3$ フコース転移酵素の活性が認められた。しかし、Le(a-b-)型のヒトの耳下腺唾液には、N-アセチルグルコサミンへの $\alpha 1 \rightarrow 3$ フコース転移酵素の活性しか認められなかった。また、供試したいずれの唾液においてもガラクトースへの $\alpha 1 \rightarrow 2$ フコース転移酵素活性は検出されなかった。

本酵素の耳下腺唾液からの精製は、GDP-ヘキサノラミン-セファロースを用いたアフィニティークロマトグラフィーとクロマトフォーカシング(PBE96交換ゲル、pH勾配6.5-8.0)によった。Le(a-b+)型のヒトの耳下腺唾液より精製した本酵素標品は上記の3酵素活性を全て保有しており、それぞれの回収率と精製度はよく似た値を示した。精製酵素の至適pHは7.5で、等電点は7.2であり、分子量は高速液体クロマトグラフィーとSDS電気泳動法による測定で約20,000と推定された。精製標品は電気泳動法的に単一のタンパクバンドを与え、ゲルろ過法によっても同一の画分に上記の3酵素活性が認められた。また、これらの活性に対するpH、温度および2価金属イオンの影響はともによく類似していた。

精製酵素の受容体特異性を調べたところ、ラクト-N-フコペンタオースI(LNFI)、ラクト-N-ネオテトラオース、ラクト-N-テトラオース、2'フコシルラクトース(2'FL)およびN-アセチルラクトサミンへのフコースの転移がみられたが、3フコシルラクトース、ラクトース、フェニル- β -D-ガラクトシドへの転移は認められなかった。2'FLおよびLNFIを受容体とした場合の精製酵素による生成物は、ペーパークロマトグラフィーにより、それぞれラクトジフコテトラオースとラクトジフコヘキサオースIであることが確認された。また、それぞれの反応生成物は $\alpha 1 \rightarrow 2$ フコシダーゼの作用を受けないが、 $\alpha 1 \rightarrow 3$ と $\alpha 1 \rightarrow 4$ フコシダーゼ処理により転移されたフコースが遊離され、フコースは $\alpha 1 \rightarrow 3$ または $\alpha 1 \rightarrow 4$ 結合で転移していることが裏付けられた。PRGPを緩和酸加水分解と β -ガラクトシダーゼで処理してもフコースは転移されるが、N-アセチルグルコサミニダーゼで処理すると転移は著しく減少することが確認された。さらに、本酵素によりフコースを転移させたPRGPは、 $\alpha 1 \rightarrow 2$ フコシダーゼで処理してもフコースを遊離しないが $\alpha 1 \rightarrow 3$ と $\alpha 1 \rightarrow 4$ フコシダーゼで処理するとフコースの遊離が認められた。これらの結果、精製酵素は2'FLのグルコースへ $\alpha 1 \rightarrow 3$ で、LNFIのN-アセチルグルコサミンへ $\alpha 1 \rightarrow 4$ で、またPRGPの糖鎖のN-アセチルグルコサミンへ $\alpha 1 \rightarrow 3$ でフコースを転移することが示された。

以上この研究は、ヒト耳下腺唾液に存在するフコース転移酵素を精製し、酵素的特性を調べ、次の諸点を明らかにした。すなわち、1) ヒト耳下腺唾液には、受容体特異性の異なる少なくとも3つのフコース転移酵素活性が存在し、ルイス式血液型の違いにより本酵素の持つ結合様式に差異がみとめられること、2) Le(a-b+)型のヒトの耳下腺唾液より精製した酵素標品は、N-アセチルグルコサミンへ $\alpha 1 \rightarrow 3$ 、N-アセチルグルコサミンへ $\alpha 1 \rightarrow 4$ およびグルコースへ $\alpha 1 \rightarrow 3$ でフコースを転移させる3つの活性を保有していること、3) 本酵素は唾液のPRGPを受容体とし、PRGPの糖鎖に存在するN-アセチルグルコサミンに $\alpha 1 \rightarrow 3$ 結合でフコースを転移させることが示された。

論文審査結果の要旨

本研究はヒト耳下腺唾液に存在するフコース転移酵素を分離、精製し、その酵素タンパク質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GDP-フコースから糖側鎖中に位置するN-アセチルグルコサミンまたはグルコースにフコ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フコシド結合はフコース $\alpha 1 \rightarrow 3$ あるいは $\alpha 1 \rightarrow 4$ N-アセチルグルコサミンまたはフコース $\alpha 1 \rightarrow 3$ グルコースであることが示された。

この論文は口腔内の生理および病理過程に重要な係わりあいをもつ唾液糖タンパク質の動態を支配する要因を解析する上で、貴重な手掛か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。