

Title	Purification, cDNA cloning, and expression of UDP-N-acetylglucosamine : β -D-mannoside β -1,4 N-acetylglucosaminyltransferase III from rat kidney
Author(s)	西河, 淳
Citation	大阪大学, 1993, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38613
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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏 名	にし 西	かわ 河	あつし 淳
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)		
学位記番号	第 1 1 0 0 6 号		
学位授与年月日	平成 5 年 12 月 15 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当		
学位論文名	Purification, cDNA cloning, and expression of UDP- <i>N</i> -acetylglucosamine: β -D-mannoside β -1, 4 <i>N</i> -acetylglucosaminyltransferase III from rat kidney (ラット腎 <i>N</i> -アセチルグルコサミン転移酵素Ⅲの精製, cDNA グローニングとその発現)		
論文審査委員	(主査) 教授 谷口 直之		
	(副査) 教授 岡本 光弘 教授 谷口 維紹		

論 文 内 容 の 要 旨

【目 的】

糖タンパク質や糖脂質の糖鎖構造には、細胞の癌化さらにはその悪性度に伴った変化が観察されている。また、個体発生や幹細胞分化時においても、それらの細胞表面等の糖鎖構造がそれぞれのステージごとに変化していることが知られている。例えば、N-結合型糖タンパク質である γ -グルタミルトランスフェラーゼの肝癌由来のものには、bisecting GlcNAc と呼ばれる構造を持つものが多く存在するが、正常肝由来のものには殆ど観られない。一方、正常でも腎臓由来のものには、ほぼすべての糖鎖にこの構造が観られる。このことは、bisecting GlcNAc 構造を生合成する *N*-アセチルグルコサミン転移酵素Ⅲ（以下、GnT-Ⅲ）の癌化による異所性発現と、著明な活性化によると考えられる。しかし、これら糖鎖構造の多様性の出現に関する機序やその意義は未だに明らかにはされておらず、詳細な解明が待たれている。そこで、本研究は、GnT-Ⅲの簡便な活性測定法の開発から始め、それを利用してGnT-Ⅲの単離精製さらに cDNA クローニングを行い、諸性質を検討した。

【方法および結果】

新たな活性測定法の開発

糖鎖の還元末端を 2-アミノピリジンで蛍光標識して糖鎖の構造を解析する方法が、阪大の長谷らにより開発された。本研究ではこの方法を応用し、GnT-Ⅲの基質を蛍光標識して、反応生成物を HPLC で分離し定量する新しい測定法を確立した。

GnT-Ⅲの精製

ラットの腎臓約 2.2kg のホモジネートより、マイクロゾーム分画を得、1% TritonX-100 を含む溶液で GnT-Ⅲ を抽出した。この抽出液を QAE-Sepharose を用いたイオン交換、Hydroxylapatite、銅キレート Sepharose、コンカナバリン A-Sepharose、UDP-hexanolamine を用いたアフィニティー、そして最後に基質の糖鎖をリガンドとしたアフィニティーの各種クロマトグラフィーにかけ、GnT-Ⅲ を約 15 万倍に精製した。得られた精製標品 35 μ g の収率は 1.5% で、電気泳動を用いて単一であることを確認した。

GnT-Ⅲの cDNA クローニング

精製標品 3 μ g をトリプシンで酵素消化し、ペプチドを HPLC の逆相カラムで分取後、全自動アミノ酸配列分析器にて分析した。得られた部分アミノ酸配列より、それに相当する核酸を合成してプライマーとし、ラット腎の cDNA を鋳型にして PCR を行った。次に、この PCR 増幅産物をプローブに用いてラット腎ライブラリーをスクリーニングし、複数のポジティブクローンを得た。そして、これらのクローンの配列分析より、GnT-Ⅲの全コード領域を含む全長約 2.7kbp の cDNA が得られ、GnT-Ⅲの全一次構造を推定した。

【考 察】

生体内には、100種を越える糖の結合様式があり、その各々に異なった糖転移酵素が存在していると考えられている。しかし、従来の糖転移酵素の活性測定は非常に複雑である、生体内に膜タンパクとして極微量しか存在していない、相互のホモロジーが殆どない等の理由から、現在まで精製されたものは本酵素を加えても僅かに 5 種しかない。本研究において、GnT-Ⅲの精製に成功した一因には、GnT-Ⅲの活性測定に蛍光標識した基質を用いる新たな方法を確立したことにあると思われる。この測定法は、従来法に比べて非常に簡便でしかも高感度であるため、最近、他の多くの糖転移酵素の活性測定に応用され始めている。

cDNA より GnT-Ⅲの構造は、アミノ酸 536 残基からなり、N-結合型糖鎖の結合可能サイトは 3 カ所存在すると推定された。また、SDS 電気泳動では分子量約 62kDa を示した。現在までに報告のあった他の糖転移酵素と GnT-Ⅲの構造を比較すると、アミノ酸配列上のホモロジーは全くみられないが、N 末端付近に膜貫通部分、続いて Pro 残基の多い幹部分、そして C 末端側に酵素反応部位が存在すると云う全体のトポロジーは非常に類似していることが判明した。

GnT-Ⅲの cDNA を発現ベクターに組み込み、COS-Ⅰ細胞を用いて GnT-Ⅲの一過性発現を試みたところ、対象群に比べて約 3600 倍もの活性上昇が観察された。

論文審査の結果の要旨

本研究は、N-アセチルグルコサミン転移酵素Ⅲを精製、cDNA クローニングし、その諸性質を明らかにしたものである。

生体内に膜結合型で極微量しか存在しない N-アセチルグルコサミン転移酵素Ⅲを、ラットの腎臓から新しく確立した活性測定法と様々なアフィニティークロマトグラフィーを用いて比活性約 15 万倍、収率 1.5% で精製した。次に精製標品をトリプシン消化後、部分アミノ酸配列を決定し、その情報を基に cDNA のクローニングを行い、N-アセチルグルコサミン転移酵素Ⅲの全アミノ酸一次構造を推定した。これにより、N 末端側に短な塩基性アミノ酸の続く部分と膜貫通部位と思われる疎水性アミノ酸の続く部分が存在し、C 末端側に酵素触媒部位が存在することが明らかになったが、他の糖転移酵素との間に配列上の類似性は全く見られなかった。一方、酵素コード領域を含む cDNA を発現ベクターに組み込み、COS-Ⅰ細胞に一過性で N-アセチルグルコサミン転移酵素Ⅲを発現させることにも成功した。

生体内に存在する複合糖類の糖鎖構造は多様で、細胞の分化や癌化また個体の発生段階においてさらに変化することが知られているが、これらの出現に関する機序やその意義は未だに明らかにはされておらず、詳細な解明が待たれている。この意味においても、本研究は今後の発展につながる礎となるもので、学位に値すると認められる。