

Title	Establishment of a new assay method, and purification and cDNA cloning of GDP-L-fuc : N-acetyl- β -D-glucosaminide α 1-6fucosyltransferase.
Author(s)	魚住, 尚史
Citation	大阪大学, 1996, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/40066
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	魚住尚史
博士の専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	第 12737 号
学位授与年月日	平成 8 年 11 月 29 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学研究科 生理系専攻
学位論文名	Establishment of a new assay method, and purification and cDNA cloning of GDP-L-fuc: N-acetyl-β-D-glucosaminide α1-6fucosyltransferase. (α1-6Fucosyltransferase(α1-6FucT)の新規活性測定法の確立と精製と cDNA クローニング。)
論文審査委員	(主査) 教授 谷口 直之 (副査) 教授 中村 敏一 教授 高井 義美

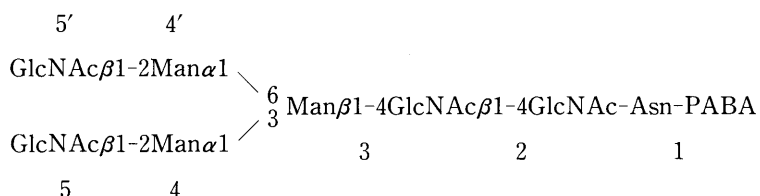
論文内容の要旨

[目的]

糖タンパク質の糖鎖構造は、発生過程や分化、癌化に伴って変化することが多く知られ、個々の糖鎖は固有の糖転移酵素によって生合成される。肝癌においてもアルファフェトプロテイン (AFP) や γ-グルタミルトランスぺプチダーゼ (γ-GTP) などの糖鎖に癌性変化がみられることが知られ、特に前者は実地の臨床の場で肝癌の早期発見に応用されつつある。すなわち、フコースを認識するレクチンであるレンズ豆レクチン (LCA) やヒイロチャワンダケレクチン (AAL) に対する親和性の増強から、癌患者における血清 AFP の糖鎖にフコースの付加率が増加しているものと予想される。これは、糖鎖の構造解析からも確認され、N-グリコシド型糖鎖のうち複合型の糖鎖の還元末端の N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) に付加されるフコースの増加が原因であることが明らかとなっている。本研究では、この糖鎖構造にみられる癌性変化の機序を解明するため、糖鎖構造を生合成する key enzyme であるフコシルトランスフェラーゼ (α1-6FucT) の活性測定法を開発し、本酵素の精製、クローニングを行った。

[方法ならびに成績]

γ-グロブリン由来の糖ペプチドを 4-(2-ピリジルアミノ) プチルアミン (PABA ; NH₂-(CH₂)₄-NH-pyridine) で蛍光標識し、以下の分子



を逆相の HPLC (High Performance Liquid Chromatography) を用いて単離した。これを α1-6FucT のアクセプター基質, GDP-Fuc をドナー基質として種々の条件で反応を行った。活性は、フコース残基の付加された基質を HPLC で単離定量し、時間あたりのフコース残基の転移量として算出した。比活性が高かったブタの脳 (2 Kg) からマイク

ロゾーム分画を抽出し、トランスフェリン由来のアシアロアガラクト糖ペプチドカラムと GDP-ヘキサノラミンカラムによるアフィニティークロマトを用いて精製を試みた。これらのステップで最終的に比活性が4.4万倍に上昇し、10%SDS-PAGEで、58 KDaに主要なバンドを得た。得られたアミノ酸シーケンスをもとにブタ脳の λ gt11, cDNAライブラリーから5つの α 1-6FucT の cDNA を得た。この cDNA の塩基配列から、open reading frame は1,728 bp からなり、575アミノ酸をコードしていることが分かった。この結果は、精製された α 1-6FucT のアミノ酸配列と全く一致した。発現ベクターである pSVK3 に α 1-6FucT 遺伝子を組み込み、COS 細胞に一過性に発現させたところ著しい α 1-6FucT 活性を認めた。

[総括]

α 1-6FucT は還元末端に結合した N-アセチルグルコサミンの構造が損なわれていないことが酵素活性に不可欠なため、従来法とは異なる PABA 標識による新しい活性測定法を開発した。この活性測定法を使ってブタ脳の α 1-6FucT の酵素精製を行い、得られたアミノ酸情報をもとにブタ α 1-6FucT の cDNA をクローニングした。 α 1-6FucT の mRNA は、3.5 kb からなり、予想されるアミノ酸配列から、全長575アミノ酸からなる II 型膜貫通プロテインであることがわかった。すなわち、本酵素は短いサイトプラスミックテイルとそれに続くトランスメンブレン領域をもち、261残基から340残基の間にグリコシルトランスフェラーゼに特徴的なプロリンに豊かな領域をもつことが分かった。しかし、これまでに報告されたフコシルトランスフェラーゼとは、全く違うアミノ酸配列を持つことから、従来のフコシルトランスフェラーゼのジーンファミリーには属さない新しい遺伝子であることが分かった。今後、正常肝、肝癌における α 1-6FucT の発現調節機能の解析及び、肝癌の早期診断への応用が期待される。

論文審査の結果の要旨

糖タンパク質の糖鎖は癌化、分化、発生に関与するといわれ、近年、糖鎖遺伝子のクローニングによって、その直接的な証明がなされるようになってきた。しかし、その多くは expression cloning 又はホモロジーから得られたもので、生体内に微量しか存在していない糖転移酵素を精製し、クローニングするのは至難といえる。

肝癌で α フェトプロテインの糖鎖構造が変化することは古くから知られており、実地臨床の場で応用されている。この特殊なフコシル化を修飾する α 1-6 フコシルトランスフェラーゼは、1974年にその存在を報告されているが、今日までクローニングされていなかった。本研究室では、従来の蛍光標識法を改良した新しい活性測定法を確率し精製クローニングを可能にした。

以上により本研究は学位に値する。