



Title	Establishment of a new assay method, and purification and cDNA cloning of GDP-L-fuc : N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminide $\alpha$ 1-6fucosyltransferase.
Author(s)	魚住, 尚史
Citation	大阪大学, 1996, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/40066">https://hdl.handle.net/11094/40066</a>
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=" <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> ">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

## 【 3 】

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- $\beta$ -D-glucosaminide $\alpha$ 1-6fucosyltransferase. ( $\alpha$ 1-6Fucosyltransferase( $\alpha$ 1-6FucT)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

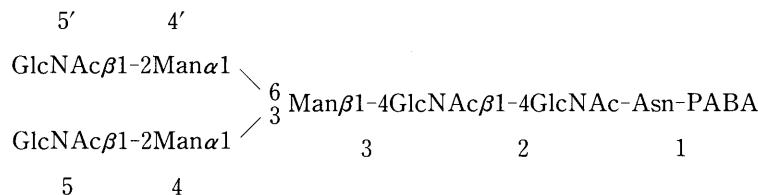
## 論文内容の要旨

## [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ーフェトプロテイン(AFP)や $\gamma$ -グルタミルトランスペプチダーゼ( $\gamma$ -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、糖鎖構造を合成するkey enzymeであるフコシルトランスフェラーゼ( $\alpha$ 1-6FucT)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]

$\gamma$ -グロブリン由来の糖ペプチドを4-(2-ピリジルアミノ)ブチルアミン(PABA; NH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-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 $\alpha$ 1-6FucT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いた。比活性が高かったブタの脳(2Kg)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クエンスをもとにブタ脳の $\lambda$ gt11, cDNAライブラリーから5つの $\alpha$ 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 $\alpha$ 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 $\alpha$ 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 $\alpha$ 1-6FucT活性を認めた。

#### [総括]

$\alpha$ 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 $\alpha$ 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 $\alpha$ 1-6FucTのcDNAをクローニングした。 $\alpha$ 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んだ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 $\alpha$ 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 $\alpha$ 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 $\alpha$ 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。