The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	N-Glycosylation is Requisite for the Enzyme Activity and Golgi Retention of N-Acetylglucosaminyltransferase III (N-アセチルグルコサミン転移酵素III
Author(s)	長井, 薫
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/40737
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

【10】

氏　　名	長　井　　薫（ながい かおる）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　13683　号
学位授与年月日	平成10年3月25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	N-Glycosylation is Requisite for the Enzyme Activity and Golgi Retention of N-AcetylglucosaminyltransferaseⅢ （N－アセチルグルコサミン転移酵素Ⅲ（GnT-Ⅲ）における分子内糖鎖の重要性）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　谷口　直之 （副査） 教　授　木下タロウ　　教　授　高井　義美

論　文　内　容　の　要　旨

【目的】

複合糖質の糖鎖は主としてゴルジ装置等にある糖転移酵素や糖分解酵素により生合成されるが，様々な生命現象に関与していると考えられている。N－アセチルグルコサミン転移酵素Ⅲ（GnT-Ⅲ）はN-結合型糖鎖の構造を修飾する糖転移酵素の1つであり，これ自身も糖タンパク質でN-結合型糖鎖の結合可能部位を3カ所有している。GnT-ⅢはmRNAの発現量とその活性が必ずしも一致しないことがこれまでに観察されており，活性発現における翻訳後修飾の影響には興味が持たれる。今回は糖鎖付加のGnT-Ⅲの活性発現に対する機能について調べた。

【方法】

GnT-Ⅲ活性，細胞内局在の変化を調べる為にCOS-1細胞中で発現させる系を用いた。まず，全体としての糖鎖の機能について検討する為に，糖鎖付加阻害剤であるツニカマイシン，あるいは粗面小胞体中での糖鎖構造修飾の影響について検討する為に，粗面小胞体中においてグルコシダーゼ阻害剤として作用するカスタノスペルミンの存在下でCOS-1細胞を培養し，GnT-Ⅲを発現させた。次に，個々の糖鎖の機能について検討するために，個々のN-結合型糖鎖の結合可能部位を部位特異的変異法によりAsn残基をGln残基に変換した。また，複合糖質の糖鎖構造は種々の糖分解酵素と糖転移酵素による秩序立った一連の反応により形成されるものであるので，in vivoにおける機能という面から考えるとGnT-Ⅲはゴルジ体に存在することが非常に重要である。従って，蛍光抗体染色法によりCOS-1細胞中におけるGnT-Ⅲの局在についても確認した。

【結果】

まず，ツニカマイシン処理により全く糖鎖の付加されなかったGnT-Ⅲはほとんどその活性を失っており，ゴルジ体への局在も見られなかった。カスタノスペルミン処理により，糖鎖は付加されたが糖鎖構造の修飾を全く受けていないGnT-Ⅲは，活性はほぼ100%あったがゴルジ体への局在は見られなかった。従って，粗面小胞体中におけるN-結合型糖鎖上のグルコース残基の切断は活性発現にはそれほど重要ではないが，ゴルジ体への輸送には必要であることがわかった。次に，個々の糖鎖の機能について検討した。活性の面から見ると，Asn243あるいはAsn261における糖鎖の欠失は50－60%の活性の低下を招いたが，Asn399における糖鎖の欠失はそれほど影響はなくせいぜい20-30

%の活性の低下にとどまった。2カ所における糖鎖の欠失については，Asn243とAsn261の場合は約10%ほどの残存活性しか見られなかったが，Asn243またはAsn261とAsn399における糖鎖の欠失はAsn243あるいはAsn261単独における糖鎖の欠失と大差なかった。また，3カ所全ての糖鎖の欠失はツニカマイシン処理の場合と同様ほとんどその活性を失った。活性低下のメカニズムについて，donor基質とacceptor基質それぞれに対するLineweaver-Burk plotにより解析した結果，Asn399における糖鎖の欠失はdonor基質とacceptor基質のどちらに対するKm値にも変化は見られなかったが，Asn243またはAsn261における糖鎖の欠失はdonor基質に対するKm値の上昇を招くことがわかった。従って，Asn243またはAsn261における糖鎖の欠失による活性の低下はdonor基質に対する親和性の低下に由来することがわかった。しかしながら，Asn243，Asn261，Asn399の各々において糖鎖を欠失したGnT-Ⅲは，その全てにおいてゴルジ体への局在が見られなかった。

【総括】

今回の研究により，GnT-ⅢはN－結合型糖鎖の結合可能部位3カ所全てに糖鎖が付加されており，その全てにおける糖鎖の存在と粗面小胞体中での糖鎖構造修飾がGnT-Ⅲの糖転移酵素としての機能発現のために重要であることがわかった。

Asn243とAsn261は1次配列中においても近隣に存在しており，その双方各々における糖鎖の欠失が同様にdonor基質に対する親和性の低下を招くことから，その近辺にdonor基質への結合に関わる領域が存在することが示唆された。また，Asn243あるいはAsn261だけでなく，活性にほとんど影響のないAsn399における糖鎖の欠失によってもゴルジ体への局在が見られなかった。これは，in vitroでの活性にはほとんど影響しない領域の構造が細胞によって認識されており，これによってもゴルジ体への輸送がコントロールされていることを示唆している。これについては最近，medial-Golgi中の酵素が近隣の酵素と複合体を形成することにより，medial-Golgiに局在するという'Kin-recognition mechanism'というものが報告されているが，今回の結果によりGnT-Ⅲの糖鎖，特にAsn399における糖鎖はこの機構に関わる領域の構造に関与している可能性も考えられる。特に，複合糖質における糖鎖構造は種々の糖分解酵素と糖転移酵素による秩序立った一連の反応により形成されるものであるので，GnT-Ⅲを含む糖鎖構造修飾酵素群は細胞内の限局された部位に秩序正しく局在することが重要である。従って本論文では，糖タンパク質の糖鎖構造を修飾する酵素の1つであるGnT-Ⅲを例に，糖転移酵素の機能発現に重要な活性発現とゴルジ体への局在の双方に，糖鎖付加という翻訳後修飾が重要な役割を果たしていることを初めて明らかにした。

論文審査の結果の要旨

本論文は，糖タンパク質の持つN－結合型糖鎖の構造を修飾する酵素の1つであるN－アセチルグルコサミン転移酵素Ⅲ（GnT-Ⅲ）が，これ自身もN－結合型糖鎖を持つ糖タンパク質であることに注目し，そのGnT-Ⅲ自身の持つ糖鎖の機能について検討したものである。GnT-Ⅲは243，261，そして399番目のアスパラギン残基に糖鎖の結合可能部位を3カ所有しており，その全てに糖鎖が付加していることが分かった。そこで，これら各々の糖鎖の機能について検討したところ，399における糖鎖の欠如は活性にほとんど影響がなかったのに対し，243と261における糖鎖の欠如は酵素活性を有意に低下させた。これら2カ所の各々における糖鎖の欠如がUDP-GlcNAcに対する親和性の低下を招くことから，これらの糖鎖はUDP-GlcNAc結合部位の適切な局所構造を安定化することで基質結合に関与していると考えられた。また，3カ所各々における糖鎖の欠如はその全てがゴルジ体への移行を阻害することが明らかとなった。また，粗面小胞体における糖鎖構造の修飾であるグルコース残基の切断は活性には影響は無いが，ゴルジ体への移行には必要であることを明らかにした。

糖鎖の構造は細胞内での輸送経路において秩序だった一連の反応により合成されるものであるので，GnT-Ⅲを含む糖鎖構造修飾酵素群は活性があるのはもちろんのこと，粗面小胞体あるいはゴルジ体中の特定の領域に局在することが非常に重要である。よって，糖鎖の重要性を解明するためには，糖鎖構造の合成経路について知ることが重要であり，それには糖鎖構造の修飾酵素とその機能発現のメカニズムについての知見が必須である。本研究はGnT-Ⅲの

持つＮ－結合型糖鎖が機能発現に重要な活性とゴルジ体への移送の双方に関与していることを明らかにしており，糖鎖構造の生物学的意義の解明に価値ある基礎的知見を与える。従って，本論文は博士の学位の授与に値するものと考えられる。