



Title	Bisecting GlcNAc structures act as negative sorting signals for cell surface glycoproteins in forskolin-treated rat hepatoma cells
Author(s)	Ahamed, Samir Sultan
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/41708">https://hdl.handle.net/11094/41708</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="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 href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</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

氏名	アハメド サミル スルタン AHAMED SAMIR SULTAN
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 14444 号
学位授与年月日	平成11年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科生理系専攻
学位論文名	Bisecting GlcNAc structures act as negative sorting signals for cell surface glycoproteins in forskolin-treated rat hepatoma cells. (フォルスコリン処理をしたラット肝癌細胞において、バイセクティングN-アセチルグルコサミン構造は細胞表面の糖タンパク質の逆向け輸送のシグナルとして作用する)
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 宮坂 昌之

#### 論文内容の要旨

【背景と目的】タンパク質の糖鎖は細胞の発生、分化、接着、増殖の制御に関与し、個々の糖鎖構造は固有の糖転移酵素の作用により合成される。タンパク質の糖鎖合成を糖鎖合成阻害剤や site directed mutagenesis などによって抑えると細胞内輸送が阻害されるという報告がみられるが、特定の糖鎖構造の機能を論じたものはない。N-アセチルグルコサミン転移酵素Ⅲ (GnT-Ⅲ) は、N型糖鎖のコアの部分に作用し Bisecting GlcNAc 構造を作る。本酵素は正常の肝臓にはほとんど発現していないが、肝癌において強発現する。また GnT-Ⅲ の過剰発現がメラノーマの肺転移を抑制したり、B型肝炎ウイルスの発現を抑制することから、Bisecting GlcNAc 構造のもつ生物機能は非常に多彩なものと考えられる。しかし GnT-Ⅲ は種々のサイトカインでは誘導されず、内因性の GnT-Ⅲ を活性化するメカニズム、その産物である Bisecting GlcNAc 構造糖鎖の生物機能は不明であった。本研究では、adenylyl cyclase activator であるフォルスコリンがラット肝癌細胞において GnT-Ⅲ の遺伝子発現を増強させることを見出し、細胞表面の糖タンパク質の輸送に関して検討した。

【材料と方法】細胞株としては、種々の肝癌細胞 HuH 6, HuH 7, Hep3B, M31 とラットおよびマウスの初代培養肝細胞を用いた。GnT-Ⅲ の酵素活性は、既報に従い蛍光標識した糖鎖を基質とし、ホモジナイズした細胞と反応後 HPLC で解析した。遺伝子の発現はノザンプロット法で、糖鎖構造の解析はレクチンプロット (E4-PHA, L4-PHA, ConA, SSA)、フローサイトメーター、蛍光染色法にて行った。0-50  $\mu$ M のフォルスコリンを細胞に添加し、経時的に GnT-Ⅲ の活性変化、mRNA の発現、細胞の糖鎖構造の変化を検討した。さらに個々の糖タンパク質の糖鎖構造、細胞内輸送を検討するため、細胞表面の糖タンパクとして Lamp-1,  $\beta$ -glucuronidase,  $\gamma$ -GTP, 分泌タンパクとして ceruloplasmin,  $\alpha$ -fetoprotein を免疫沈降後、レクチンプロット、ウエスタンプロットで検討した。また、細胞内における糖タンパク質の分布を知るため、Opti-Prep を用いて細胞分画を行いレクチンプロットで解析した。

【結果】フォルスコリン添加後12時間で、GnT-Ⅲ の酵素活性、遺伝子発現はピークに達した。GnT-Ⅲ の誘導は HuH 6, M31 とラットおよびマウスの初代培養肝細胞に見られたが、M31 で最も顕著だったため以後の検討はこの細胞を用いた。糖鎖構造の解析からは、GnT-Ⅲ の活性化にともない細胞全体の Bisecting GlcNAc 構造糖鎖の数が増

加したが、細胞表面での数は逆に低下した。つまり活性化した GnT-III により合成された Bisecting GlcNAc 構造の糖鎖をもつ糖タンパク質は細胞内に蓄積すると考えられた。この変化はフォルスコリンの濃度依存性に見られた。次に細胞分画法により、それらのタンパク質の局在を検討すると、ゴルジ装置、ライソゾーム分画に多く存在することがわかった。個々のタンパク質で検討すると、分泌タンパクである ceruloplasmin と  $\alpha$ -fetoprotein は Bisecting GlcNAc が付加されるにもかかわらず培養液中にコントロールと同様に分泌されるが、細胞表面の糖タンパクである Lamp-1,  $\beta$ -glucuronidase,  $\gamma$ -GTP は Bisecting GlcNAc が付加されて、細胞表面への輸送が阻害された。

【総括】本研究により、癌化、癌転移と関連が深い糖転移酵素 GnT-III が、adenylyl cyclase activator であるフォルスコリンにより誘導されることが明らかとなった。さらに、その時生合成された Bisecting GlcNAc 構造の糖鎖をもつ糖タンパク質は、選択的に細胞内輸送が阻害されていることが明らかとなった。Bisecting GlcNAc 構造の糖鎖を認識するレクチンの存在が近年注目されており、本研究の今後の展開が期待される。

### 論文審査の結果の要旨

近年、多くの糖鎖遺伝子がクローニングされ、糖鎖の研究は急速な進歩を遂げた。中でも N-アセチルグルコサミン転移酵素 III (GnT-III) は、癌化と関連が深い糖転移酵素として注目され、遺伝子の 5' 構造が解析されたにもかかわらず、誘導因子に関しては長らく不明であった。本研究では第一に、cAMP activator であるフォルスコリンが GnT-III を遺伝子レベルで発現増強させることを見出した。また、糖鎖が糖タンパク質の細胞内輸送に関与しているという論文は多いが、本研究のように特定の糖鎖構造が細胞内輸送に関係している可能性を示したものはない。第二に、フォルスコリンによって誘導された Bisecting GlcNAc 構造をもつ糖タンパク質がゴルジ装置とライソゾームに蓄積することを見出した。近年、Bisecting GlcNAc 構造を認識するレクチンの存在が強く示唆され、本研究に見られた生命現象が今後新たな展開を見せる可能性がある。

以上の理由によって本論文は医学博士の学位を授与するに値すると認定する。