OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Purification and Characterization of UDP-GlcNAc : Gal β1-4GlcNAcβ1-3*Galβ1-4Glc(NAc)-R(GlcNAc to *Gal)β1, 6N-Acetylglucosaminyltransferase from Hog Small Intestine
Author(s)	阪本, 吉広
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41802
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

氏名	阪本吉広（さかもとよしひろ）
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学位記番号	第 15315 号
学位授与年月日	平成12年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科外科系専攻
学位論文名	Purification and Characterization of UDP-GlcNAc:Gal β1－4GlcNAcβ1－3*Gal β1－4Glc(NAc)－R(GlcNAc to *Gal) β1，6 *N*－Acetylglucosaminyltransferase from Hog Small Intestine （ポリ－*N*－アセチルラクトサミン構造の分岐に関与するブタ小腸由来β1、6 *N*－アセチルグルコサミン転移酵素の精製と性質）
論文審査委員	（主査） 教授 田野 保雄 （副査） 教授 谷口 直之　教授 不二門 尚

論文内容の要旨

【目的】

ポリ－*N*－アセチルラクトサミン構造とは、ガラクトース（以下、Gal）と*N*－アセチルグルコサミン（以下、GlcNAc）の繰り返し構造であり、この構造は糖タンパク質上の*N*型糖鎖、*O*型糖鎖や糖脂質及びプロテオグリカンにみられ、種々のエピトープ糖鎖構造を多価に末端で発現するのに不可欠な基本的構造である。リンパ球と内皮細胞の接着の際に必要であるシアリルルイス^{x}糖鎖構造がポリ－*N*－アセチルラクトサミン構造上にタンデムで多価に発現することで、そのレセプター分子であるセレクチンとの親和性を増強していること、またプロテオグリカンのケラタン硫酸の硫酸基が、この構造を足場として多価に発現することで、ケラタン硫酸の溶解度を高め角膜の透明化に寄与していることなどから、この構造の重要性が示唆されてきている。しかし、直接的なポリ－*N*－アセチルラクトサミン構造の機能に関する知見を得るためには、未だその全貌が明らかになっていない生合成に与る糖転移酵素群を単離、精製ならびにクローニングすることが必要であると考えられる。今回私はこの構造の特に分岐に関与するβ1、6 *N*－アセチルグルコサミン転移酵素（血液型抗原のI抗原の形成に関与する酵素であるので、以下、IGnTと略す）に着目し、その単離、精製ならびに基質特異性の検討を行った。

【方法ならびに成績】

酵素の精製においては、迅速・簡便なアッセイ法の確立と優れた酵素源の選択が重要であると考えられる。私は還元末端部をピリジルアミノ基で蛍光標識したラクト－*N*－ネオテトラオース（Galβ1－4GlcNAcβ1－3*Galβ1－4Glc－PA）をポリ－*N*－アセチルラクトサミン構造の基本骨格を反映した人工基質として用い、*にβ1－6で転移されるGlcNAcの量を定量することでIGnTのアッセイ法とした。

基質とプロダクトの分離はHPLCで行い、これにより0.1pmol程度の微量なプロダクトの定量が可能になった。またIGnTの酵素源としては量的にもまた比活性的にも優れたブタ小腸ミクロソーム分画を用いた。ミクロソーム分画をTriton X－100で可溶化後、陽イオン交換カラム、金属キレートカラム、及びドナー基質のアフィニティカラムを用いることで、ホモジェネートと比較して21万倍までに精製でき、SDS電気泳動（非還元下）で活性とパラレルな76,000Daのバンドを得た。活性の収率は2.4%だった。この酵素の至適pHは7.0で、その活性に金属イオンを必要としなかった。また、Km値は、UDP－GlcNAc、Galβ1－4GlcNAcβ1－3Galβ1－4Glc－PAに対して、それぞれ0.96、2.59mMであった。この精製した酵素はGalβ1－3GlcNAcβ1－3Galβ1－4Glc－PA、GlcNAc

β1－3Galβ1－4Glc－PAを基質にできなかった。数種のポリ－*N*－アセチルラクトサミン鎖に対しても基質特異性を検討したところ、この酵素は非還元末端部に［Galβ1－4GlcNAcβ1－3］$_n$構造を持つGal残基を基質として要求することが明かとなった。

【総括】

これまでに、ポリ－*N*－アセチルラクトサミン構造の分岐に関しては末端部に働くIGnT活性（distal－IGnT）と中心部に働くIGnT活性（central－IGnT）の異同は不明であったが、今回精製したブタIGnTはcentral－IGnT活性のみを有し、distal－IGnT活性を示さなかった。また、上記の条件を満たすGal残基には還元末端部、非還元末端部を問わず均等にGlcNAcを転移できた。つまり、この酵素は生合成過程において伸長中のポリ－*N*－アセチルラクトサミンの末端部において分岐構造を形成するのではなく、既に完成している直鎖のポリ－*N*－アセチルラクトサミン構造を分岐させるのに重要であることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

ポリ－*N*－アセチルラクトサミン構造は、*N*型糖鎖、*O*型糖鎖をもつ糖タンパク質や、糖脂質及びプロテオグリカンにみられ、シアリルルイス^{x}等の様々なエピトープ構造を末端に発現するのに、また糖鎖を巨大化させるのに不可欠な構造である。そのポリ－*N*－アセチルラクトサミン構造の生合成機構を明らかにするため、本研究では、β1、6*N*－アセチルグルコサミン転移酵素を、ブタ小腸ミクロソーム分画からTritonX－100で可溶化し、陽イオンカラム、金属キレートカラム、及び基質のアフィニティカラムを使うことにより、ホモジェネートと比較して21万倍まで精製し均一標品を得た。さらに質量分析、NMR解析及びEndo－β－galactosidase処理等により、本酵素の基質特異性を検討した結果、非還元末端部に［Galβ1－4GlcNAcβ1－3］$_n$構造を持つGal残基を基質として要求することが判明した。つまり、この酵素は、ポリ－*N*－アセチルラクトサミンの非還元末端に働いて分岐構造を作るのではなくて、既に完成している直鎖のポリ－*N*－アセチルラクトサミン構造の非末端の中央部を分岐させるのに重要であることが明らかとなった。このように、本研究は新しいβ1、6*N*－アセチルグルコサミン転移酵素の分離精製と基質特異性を初めて明らかにしたものであり、今後の糖鎖合成の機構を解明する重要な研究で、学位に値するものと認める。