

Title	A novel carbohydrate binding activity of annexin V toward a bisecting N-acetylglucosamine
Author(s)	高, 叢笑
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/42672
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	高 从 笑
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 15727 号
学位授与年月日	平成12年9月29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	A novel carbohydrate binding activity of annexin V toward a bisecting N-acetylglucosamine (アネキシンVの新規糖結合活性：バイセクティング N-アセチルグルコサミン構造の認識)
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

<目的>

細胞表面の糖タンパク質の糖鎖構造は、癌の悪性化に伴い著しく変化し、細胞接着や癌の転移に関与する。バイセクティング N-アセチルグルコサミン (bisecting GlcNAc) の付加によりアスパラギン結合型糖鎖の分岐を制御する N-アセチルグルコサミン転移酵素Ⅲ (GnT-Ⅲ) の遺伝子を細胞に導入すると、細胞表面の bisecting GlcNAc 構造が増加し、細胞の接着や増殖因子に対する応答性など細胞の様々な性質が変化することがこれまでの研究により明らかにされている。また、GnT-Ⅲ-導入 K562細胞がヌードマウスの脾臓に集積することなどから、bisecting GlcNAc 構造のもつ様々な生物機能の発現には、これを認識するレクチン (様) 分子が関与することが示唆されてきた。そこで本研究では、このような bisecting GlcNAc 結合タンパク質を同定するため、ブタ脾臓より精製を試みた。

<方法ならびに成績>

bisecting GlcNAc に特異的に結合するレクチンである E-PHA の GnT-Ⅲ-transfected K562細胞への結合に対する阻害活性をフローサイトメトリー法により検出し、これを指標にして bisecting GlcNAc 結合タンパク質を精製した。ブタ脾臓のマイクロゾーム画分の Triton X-100抽出物を DEAE イオン交換カラム、糖鎖リガンドアフィニティカラムにて分画し、阻害活性を含む画分を集めた。最終的な精製タンパク質は、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動において33kDaの均一なバンドを示した。フローサイトメトリー法による阻害活性の評価から大まかに算出した精製倍率および収率は、それぞれおよそ7,000倍および10%であり、250gの脾臓から80μgの精製タンパク質が得られた。この33kDaのタンパク質のリジルエンドペプチダーゼ消化物から6つのペプチドのアミノ酸配列を決定した結果、得られた全てのアミノ酸配列がアネキシンVのものとは一致した。このことから、アネキシンVが bisecting GlcNAc 結合活性をもつことが示唆された。

精製アネキシンVはCa²⁺存在下でE-PHAと細胞との結合を阻害したが、bisecting GlcNAcを認識しないL-PHAやDSAのような他のレクチンの結合には影響を与えなかったことから、アネキシンVはE-PHAと競合的に細胞表面の bisecting GlcNAc 構造と結合することが示唆された。さらにFITC標識したアネキシンVは、GnT-Ⅲ-transfected細胞に非常によく結合するのに対して、bisecting GlcNAcを発現していない対照細胞ではほとんど結合は見られなかった。

アネキシン V は Ca^{2+} 依存性にリン脂質と結合し、アポトーシス細胞に強い結合性をもつことが知られている。アポトーシス細胞へのアネキシン V の結合はリン脂質の添加により完全に阻害されたが、一方、GnT-III-transfected 細胞との結合はまったく阻害されず、この結合は細胞表面のリン脂質を介するものではなく、糖鎖を介したものであることが支持された。

さらに、表面プラズモン共鳴法を用いてアネキシン V の bisecting GlcNAc 構造との結合を解析した。アネキシン V を CM5 センサーチップに固相化し、bisecting GlcNAc をもつ 2 本鎖糖鎖をリガンドにした場合、明らかな結合が認められ、解離定数は約 $200 \mu\text{M}$ と決定できた。一方、bisecting GlcNAc 構造を持たない 2 本鎖の糖鎖の場合は、全く結合が見られず、アネキシン V と N-グリカンの結合には bisecting GlcNAc 構造が不可欠であることが示された。さらに、 γ -グロブリンとトランスフェリンからそれぞれ糖ペプチドを調製し、同様に検討したところ、アネキシン V は bisecting GlcNAc 構造を含んでいる γ -グロブリン由来の糖鎖にのみ結合し、bisecting GlcNAc を含まないトランスフェリン由来の糖鎖には全く結合しないことがわかった。これらの相互作用は EDTA により完全に阻害されたが、リン脂質は影響しなかったことから、この結合には Ca^{2+} が必須で、糖鎖の結合部位はリン脂質とは異なる部位であることが示唆された。

<総括>

本研究では、ブタ脾臓から bisecting GlcNAc 結合タンパク質を精製し、それがアネキシン V であることを同定した。さらに、アネキシン V は bisecting GlcNAc 構造を持つ N-glycan と Ca^{2+} 依存性に特異的に結合すること、およびその結合部位はリン脂質の結合部位とは異なることを明らかにし、今まで知られていないアネキシン V の新しい機能を見出した。アネキシン V はこのユニークな糖結合活性を通して、糖鎖を介した接着や糖タンパク質の細胞内輸送などに関わる可能性が考えられるとともに、bisecting GlcNAc 構造がもつ様々な生物学的機能の発現に関与することが示唆された。

論文審査の結果の要旨

近年、多くの糖転移酵素の遺伝子がクローニングされ、その遺伝子を用いた研究から、特定の糖鎖構造には細胞接着、細胞内輸送、癌の転移などを制御する生物学的機能を有することが明らかになってきた。そのメカニズム解明の糸口の一つとして特定の糖鎖を認識する生体内のレクチンを同定することがある。本研究では、これまで当教室で精製、クローニングした N-アセチルグルコサミン転移酵素 III (GnT-III) に関する種々の生命現象を明らかにするため、ブタの脾臓のマイクロゾーム分画から GnT-III の産物である bisecting GlcNAc 糖鎖を認識するタンパク質を精製し、その糖鎖結合特性を解析した。アミノ酸配列解析の結果、本レクチンは annexin V と判明した。アネキシン V が Ca^{2+} 依存性に bisecting GlcNAc 糖鎖と結合し、糖鎖との結合部位はリン脂質との結合部位とは異なることも明らかにした。アネキシンファミリーに関しては、これまで多くの生物機能が報告されているが、アネキシン V の機能は不明であった。今後、アネキシン V を通じて、bisecting GlcNAc を介する細胞接着、細胞内糖蛋白質の輸送、細胞の分化、癌化などのメカニズムの詳細が明らかになることが期待される。

以上の理由から本研究は学位に値するものと考えられる。