

Title	Purification and cDNA Cloning of GDP-L-Fuc : N-Acetyl- $\beta$ -D-Glucosaminide: $\alpha$ 1-6 Fucosyltransferase ( $\alpha$ 1-6 FucT) from Human Gastric Cancer MKN45 Cells
Author(s)	柳谷, 周作
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	<a href="http://hdl.handle.net/11094/42915">http://hdl.handle.net/11094/42915</a>
DOI	
rights	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/repo/ouka/all/>

氏名	柳 <sup>やなぎ</sup> 谷 <sup>だに</sup> 周 <sup>しゅう</sup> 作 <sup>まく</sup>
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 1 4 9 6 7 号
学位授与年月日	平成 11 年 9 月 30 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文名	Purification and cDNA Cloning of GDP-L-Fuc : N-Acetyl- $\beta$ -D-Glucosaminide : $\alpha$ 1-6 Fucosyltransferase ( $\alpha$ 1-6 FucT) from Human Gastric Cancer MKN45 Cells (ヒト胃癌細胞株 MKN45からの GDP-L-Fuc : N-Acetyl- $\beta$ -D-Glucosaminide : $\alpha$ 1-6 Fucosyltransferase ( $\alpha$ 1-6 FucT) の精製及び 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 木下タロウ

## 論文内容の要旨

### 【目的】

$\alpha$ 1-6 FucT は N-結合型糖鎖のアスパラギンに結合した GlcNAc (inner most GlcNAc) に  $\alpha$ 1-6 結合でフコースを付加する酵素であり、糖蛋白質糖鎖の構造変化に関与する重要な糖転移酵素の一つである。また、肝臓癌患者の AFP の糖鎖の殆どが  $\alpha$ 1-6 フコシル化されていることや、Yolk Sac 腫等の胚細胞癌において  $\alpha$ 1-6 FucT 活性の上昇が見られること等から、 $\alpha$ 1-6 FucT はこれらの癌化と深く関与していると考えられており、腫瘍マーカーとしての期待が高い酵素である。これまで、当研究室に於いてブタ脳由来  $\alpha$ 1-6 FucT の精製及び cDNA クローニングがなされているが、ヒト由来の  $\alpha$ 1-6 FucT に関しては囊胞性線維症培養細胞からの精製の報告があるのみで、その遺伝子構造は明らかにされておらず、ヒト由来の  $\alpha$ 1-6 FucT の cDNA クローニング及びその諸性質の解明が望まれていた。そこで、本研究は、ヒト由来の  $\alpha$ 1-6 FucT を単離精製し、さらに cDNA クローニングを行い、その諸性質の検討を行った。

### 【方法ならびに成績】

#### ① $\alpha$ 1-6 FucT の精製

ヒト胃癌細胞株 MKN45 無血清培養上清 100 L を限外濾過膜により濃縮後、ストレプトマイシン硫酸塩にて除核酸を行った。除核酸画分を Q-Sepharose Fast Flow を用いたイオン交換クロマト、糖供与体類似体である GDP-hex-anolamine をリガンドとしたアフィニティークロマト、及び基質糖鎖をリガンドとしたアフィニティークロマトの各種クロマトグラフィーに供することにより、 $\alpha$ 1-6 FucT を約 4,600 倍に精製した。得られた精製標品 100  $\mu$ g の収率は 12% で、電気泳動を用いて単一であることを確認した。

#### ② $\alpha$ 1-6 FucT の cDNA クローニング

精製標品 10  $\mu$ g とリジルエンドペプチダーゼ 50 ng を混合したものを電気泳動に供し、途中で電気泳動を中断することにより泳動ゲル内で  $\alpha$ 1-6 FucT の部分分解を行った。室温にて 2 時間の中断・部分分解の後、さらに電気泳動を行い部分分解物の分離を行った。電気泳動後、分解物を PVDF 膜に転写し、全自動アミノ酸配列分析器にてアミノ酸配列を決定した。得られた部分アミノ酸配列より、それに相当する核酸を合成してプライマーとし、MKN45 の cDNA を

鋳型にしてPCRを行った。次に、このPCR増幅産物をプローブに用いてMKN45のcDNAライブラリーをスクリーニングし、複数のポジティブクローンを得た。これらのクローンの塩基配列分析より $\alpha$ 1-6 FucTの全コード領域を含むcDNAが得られ、 $\alpha$ 1-6 FucTの一次構造を推定した。

#### 【総括】

##### ① $\alpha$ 1-6 FucTの精製

ヒト胃癌細胞MKN45無血清培養上清から $\alpha$ 1-6 FucTを単離精製した。精製に於いて、2種類のアフィニティークロマトグラフィーが効果的であった。本酵素の至適反応pHはpH 7.5、至適反応温度は30~37°C、SDS-PAGEに於ける分子量は約60 kDaであり、ブタ脳由来の $\alpha$ 1-6 FucTと同じ性質を示したが、ヒト嚢胞性線維症由来の $\alpha$ 1-6 FucTとは至適反応pH及び分子量の点で大きく異なるものであった。

##### ② $\alpha$ 1-6 FucTのcDNAクローニング

cDNAより $\alpha$ 1-6 FucTの構造はアミノ酸残基575残基からなり、N-結合型糖鎖の結合可能部位は存在しないと推定された。ブタ脳由来 $\alpha$ 1-6 FucTと核酸レベルで92.2%、アミノ酸レベルで95.7%と非常に高い相同性を示したが、 $\alpha$ 1-2 FucT、 $\alpha$ 1-3 FucT、 $\alpha$ 1-4 FucT等のその他のフコシルトランスフェラーゼとの相同性は見られなかった。酵素コード領域を含むcDNAを発現ベクターに組み込み、COS-1細胞に一過性で $\alpha$ 1-6 FucTを発現させた結果、 $\alpha$ 1-6 FucT活性の増加が確認され、本cDNAが確かに $\alpha$ 1-6 FucT遺伝子をコードしていることが確認された。

## 論文審査の結果の要旨

生体内に極微量しか存在しない $\alpha$ 1-6 フコース転移酵素 ( $\alpha$ 1-6 FucT) を、ヒト胃癌細胞MKN45無血清培養上清からアフィニティークロマトグラフィーを用いて比活性約4,600倍、収率12%で単一に精製し、その酵素学的諸性質の決定を行った。次に、精製標品の部分アミノ酸配列を決定し、その情報を基にcDNAのクローニングを行い、 $\alpha$ 1-6 FucTの一次構造の決定に成功した。また、酵素コード領域を含むcDNAを発現ベクターに組み込み、大腸菌に $\alpha$ 1-6 FucTを発現させることにも成功した。

近年、肝癌患者の $\alpha$ -Fetoprotein (AFP)の糖鎖が $\alpha$ 1-6 フコシル化されていることから、このフコシル化AFPや $\alpha$ 1-6 FucTの腫瘍マーカーとしての重要性が期待されていたが、これまでAFPのフコシル化に関与するヒト由来 $\alpha$ 1-6 FucTの一次構造は明らかにされておらず、フコシル化AFPの発現の詳細なメカニズムに関しても明らかではなかった。

本研究はヒト由来の $\alpha$ 1-6 FucTの一次構造を決定するとともに、酵素の諸性質についても明らかにしている。これは、フコシル化AFP発現のメカニズムの解明のみならず、癌化における糖鎖の役割の解明や、新しい腫瘍マーカーの確立につながる重要な成果であり、学位の授与に値すると考えられる。