



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	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/42915">https://hdl.handle.net/11094/42915</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=" <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>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	柳谷周作
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第14967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100L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-hexanolamine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、電気泳動を用いて单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50ng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時間の中斷・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、全自动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、ヒト囊胞性線維症由来の  $\alpha$ 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% と非常に高い相同意を示したが、 $\alpha$ 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意は見られなかった。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% で单一に精製し、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する明確な知識はなかった。

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。