The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Ectopic expression of α1,6 fucosyltransferase in mice causes steatosis in the liver and kidney accompanied by a modification of lysosomal acid lipase
Author(s)	李, 蔚
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43864
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

【29】

氏　　名	李（リ）　蔚（イ）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　17599　号
学位授与年月日	平成15年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科生体制御医学専攻
学　位　論　文　名	Ectopic expression of α1,6 fucosyltransferase in mice causes steatosis in the liver and kidney accompanied by a modification of lysosomal acid lipase （マウスにおけるα1,6 fucosyltransferaseの異所性発現は、lysosomal acid lipase活性を低下させ、肝臓と腎臓に脂質蓄積を惹起する）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　谷口　直之 （副査） 教　授　岡本　光弘　　教　授　下村伊一郎

論　文　内　容　の　要　旨

【目的】

タンパク質に付加された糖鎖は、そのタンパク質の生理活性、安定性、細胞内輸送などに関与することが知られている。α1,6 Fucosyltransferase（α1,6 FucT）はGDP-fucoseからフコースをN-結合型糖鎖還元末端のGlcNAc残基に転移する反応を触媒する。我々の教室ではα1,6 FucTの精製および遺伝子クローニングに成功しており、糖タンパク質糖鎖のコアに存在するα1,6 fucose 残基がどのような生物学的な意味を持つのかを解明するために、α1,6 FucTトランスジェニックマウスを作製して解析することを目的とした。

【方法並びに成績】

全ORFを含むヒトα1,6 FucTのcDNAをcytomegarovirusおよびβ-actinのプロモーターを持つpCAGGSのベクターに組み込み、Slc：BDF1xSlc：BDF1のマウス受精卵に注射した。生まれたマウスの尾からDNAを抽出し、サザンブロットによってα1,6 FucTトランスジェニックマウスであることを確認した。α1,6 FucTの発現を調べるため、ノザンブロットおよび酵素活性の測定を行った。トランスジェニックマウスの各臓器のα1,6 FucT活性を測定した結果、肝臓と腎臓では野生型の10倍以上の活性を示し、膵臓、小腸、副腎、胸腺では2倍程度に増加していた。α1,6 FucTトランスジェニックマウスにおける糖鎖の変化を調べるため、肝臓タンパク質をSDS-PAGE電気泳動した後、α1,6 fucoseを認識するAleuria Aurantia Lectin（略称AAL）を用いて、レクチンブロッティングを行った。肝臓ホモジェネートから細胞内小器官を分画した結果、lightミトコンドリア画分とミクロソーム画分で大きな変化が見られた。さらに、light ミトコンドリア画分を用いて二次元電気泳動を行った後、AAL レクチンあるいは抗α1,6 fucoseモノクローナル抗体CAB4と反応させた結果、多くの特異的なバンドが見られた。血清タンパクと腎臓についても同様に、AAL反応性バンドが増加していた。これらの結果は、α1,6 FucTトランスジェニックマウスの肝臓と腎臓では数多くの糖タンパク質でα1,6フコシル化が増加していることがわかった。

α1,6 FucTトランスジェニックマウスの各臓器の切片を作って、ヘマトキシリン－エオジン（HE）で染色して組

織学的な観察を行った結果、α1,6 FucT トランスジェニックマウスの肝臓では、多くの小胞が見られ、Oil Red O 染色により中性脂質が蓄積していることがわかった。腎臓の近位尿細管細胞にも多くの脂肪滴が基底膜側コンパートメントに局在することが観察された。さらに、電子顕微鏡による観察では、肝細胞にリソソームの数が増え、後期リソソーム内に脂質が蓄積していることがわかった。Kupffer 細胞にも脂質の蓄積が観察された。近位尿細管上皮細胞中にも多くの脂肪滴が観察され、脂肪滴は大部分膜に囲まれ、基底側に局在することから、リソソーム内に脂質が蓄積していることが示唆された。

α1,6 FucT トランスジェニックマウスの血清脂質には変化が見られなかったので、脂質の分泌過程の異常ではないと考えられた細胞内の脂質代謝過程のどこに問題があるかを調べるため、蓄積脂質の成分を分析した。肝臓と腎臓では、トリグリセリド、全コレステロール、脂肪酸が増加していた。腎臓と肝臓から抽出した脂質の薄層クロマトグラフィーでは、トリグリセリドとコレステロールエステルが著しく増えていた。これらの脂質が蓄積するメカニズムを解明するため、脂質代謝に関する酵素および作用タンパク質を調べた結果では、lysosomal acid lipase（LAL）の活性が有意に低下していたが、MTP（microsososaml triglyceride transfer protein）、HMG-CoA reductase、carnitine palmitoyltransferase、free fatty acidsynthase、acyl-CoA oxidase には、変化が見られなかった。この結果は、形態学的観察で脂質のリソソームに蓄積していた結果と一致している。

α1,6 FucT トランスジェニックマウスでは、LAL の糖鎖がフコシルされて活性が低下したことが予想されたので、まず、LAL のフコシル化について調べた。肝臓ホモジェネートから LAL を免疫沈殿で分離した後、AAL レクチンと CAB4 抗体を用いて、α1,6 フコシル化の程度を比較した。正常マウスと比べて、α1,6 FucT トランスジェニックマウスの方が AAL と CAB4 と強く反応したので、トランスジェニックマウスの LAL の方がよりフコシル化されていることがわかった。フコシル化の程度と LAL 活性にどのような関係があるかを調べるため、α1,6 FucT と LAL の活性を同時に測定した。その結果、α1,6 FucT と LAL 活性は負に相関することがわかった。これらの結果から、LAL が過剰にフコシル化されると活性が抑制されることが示唆された。

【結論】

糖タンパク質糖鎖のコアに存在するα1,6 fucose の生理学的意義を明らかにするために、α1,6 FucT トランスジェニックマウスを作製した。α1,6 FucT トラスジェニックマウスの肝臓と腎臓ではフコシル化された lysosmal acid lipase の活性低下に伴ってリソソーム内に中性脂質が蓄積することが示唆された。

論文審査の結果の要旨

タンパク質に付加された糖鎖は、そのタンパク質の生理活性、安定性、細胞内輸送などに関与することが知られている。α1,6 Fucosyltransferase（α1,6 FucT）は GDP-fucose からフコースを N-結合型糖鎖還元末端の GlcNAc 残基に転移する反応を触媒する。糖タンパク質糖鎖のコアに存在するα1,6 fucose 残基がどのような生物学的な意味を持つのかを解明するために、α1,6 FucT トランスジェニックマウス（α1,6 FucT マウスと略）を作製して解析した。

α1,6 FucT マウスの肝臓と腎臓において活性が著明に発現を示した。レクチンブロットの結果、α1,6 FucT マウスの肝臓と腎臓では数多くの糖タンパク質でα1,6 フコシル化が増加していることがわかった。組織学的な観察では、α1,6 FucT マウスの肝細胞と近位尿細管上皮細胞中に膜に囲まれた多くの脂肪滴が存在し、リソソーム内に局在していることが示唆された。蓄積脂質を分析した結果、トリグリセリド、コレステロールエステルと遊離脂肪酸が著しく増えていた。脂質関する酵素を調べた結果、lysosomal acid lipase（LAL）の活性が有意に低下していた。α1,6 FucT マウスの LAL が野生型よりフコシル化され、α1,6 FucT と LAL 活性は負に相関することがわかった。これらの結果から、LAL が過剰にフコシル化されると活性が抑制されることが示唆された。

α1,6 FucT トラスジェニックマウスの肝臓と腎臓ではフコシル化された lysosomal acid lipase の活性低下に伴ってリソソーム内に中性脂質が蓄積することが示唆された。