

Title	Purification and cDNA cloning of UDP-GlcNAc : GlcNAc $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4Glc(NAc)-R[GlcNAc to Gal] $\beta$ 1,6N -acetylglucosaminyltransferase from rat small intestine : A major carrier of dIGnT activity in rat small intestine
Author(s)	是金, 宏昭
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/43892">https://hdl.handle.net/11094/43892</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="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</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	これ かね ひろ あき 是 金 宏 昭
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 17600 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	Purification and cDNA cloning of UDP-GlcNAc : GlcNAc $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4Glc (NAc)-R[GlcNAc to Gal] $\beta$ 1, 6 <i>N</i> -acetylglucosaminyltransferase from rat small intestine : A major carrier of dIGnT activity in rat small intestine (ラット小腸からの UDP-GlcNAc:GlcNAc $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4Glc (NAc)-R[GlcNAc $\rightarrow$ Gal] $\beta$ 1, 6 <i>N</i> -アセチルグルコサミン転移酵素の精製と cDNA クローニング : ラット小腸における dIGnT 活性の主要な担い手)
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】

*N*-アセチルラクトサミン (Gal  $\beta$  1-4GlcNAc) 単位の繰り返し構造であるポリ-*N*-アセチルラクトサミン鎖は、直鎖型 (血液型 i 抗原) 或いは分岐型 (血液型 I 抗原) として細胞表面の糖タンパク質 (*N*および *O*型糖鎖) ならびに糖脂質上に形成される。胚発生過程においてヒト赤血球表面の i 抗原は I 抗原へと劇的に変化し、またシアリルルイス X を有する多分岐型の I 抗原は、より強力に L-セレクトリンと結合するなど分化や細胞接着といった複雑な生命現象へのポリ-*N*-アセチルラクトサミン鎖の関与が示唆されている。本構造の生物学的機能をより詳細に解析するには、その生合成担当酵素群の単離が不可欠である。I 抗原形成を担う  $\beta$  1,6*N*-アセチルグルコサミン転移酵素 (GnT) には、末端部 (ディスタル) に働く dIGnT と中心部 (セントラル) に働く clGnT の 2 種類が知られている。近年、*O*型糖鎖の分岐構造であるコア 2 およびコア 4 構造の生合成 (C2 および C4GnT 活性) を担うムチン型 C2GnT (C2GnT-M) がクローン化され、試験管内において dIGnT としても機能することが示された。しかしながら、その dIGnT 活性は C2GnT 活性 (100%) と比較し 7% と大変低く、実際の組織における dIGnT 活性にどの程度の役割を果たし得るのか疑問であった。また、新たな dIGnT タンパク質が存在する可能性も否定し得ない。

本研究では、組織中で如何なる dIGnT タンパク質が実際に機能しているのかを明らかにするため、ラット小腸組織からその活性を指標として dIGnT を精製し、その部分アミノ酸配列をもとに cDNA クローンを単離することを試みた。

#### [方法ならびに成績]

GlcNAc  $\beta$  1-3\*Gal  $\beta$  1-4Glc-PA (\*,GlcNAc が  $\beta$  1,6 結合で転移される部位; PA、ピリジルアミノ基) をアクセプター基質とするアッセイ法を用いて dIGnT 活性を測定した。ラット小腸 (140 g) をホモジナイズし、分画遠心法によりミクロソーム画分を調製した。酵素タンパク質を Triton X-100 存在下で可溶化し、陰イオン交換、二種類の金属

キレート ( $\text{Ni}^{2+}$  および  $\text{Zn}^{2+}$ ) および二種類のアフィニティー (ドナー基質アナログおよびアクセプター基質) カラムによる各種クロマトグラフィーにより、抽出液と比較し 45,000 倍以上に dIGnT を精製した。精製酵素は非還元条件下での SDS-PAGE、銀染色で分子量 66,000 の単一バンドを示した。本酵素の至適 pH は 7.75-8.00 の間であり、その活性に金属を要求しなかった。

精製規模を約 2 倍に拡大し、これを三回繰り返すことで約 1.5  $\mu\text{g}$  の精製酵素を調製した。精製酵素を SDS-PAGE 後 CBB 染色し、*Achromobacter* プロテアーゼ I (Lys-C) により直接ゲル中で消化した。逆相 HPLC によりペプチド断片を分取し、気相プロテインシーケンサーおよび MALDI-TOF 質量分析計を用いてアミノ酸配列を決定した。その結果、本酵素には既知の C2GnT-M と極めて相同性の高い配列が存在することが明らかになった。この部分アミノ酸配列をもとに、ラット小腸 cDNA 群から本酵素に対応する cDNA クローンを単離した。cDNA 塩基配列から推定されるアミノ酸配列から、本酵素が 437 アミノ酸残基からなる II 型の膜貫通タンパク質であり、既知のヒトおよびウイルス C2GnT-M とアミノ酸レベルで各々 77% および 74% の相同性を示すことが明らかになった。これは本酵素が既知 C2GnT-M のラットオーソログであることを示した。

本酵素の cDNA を発現ベクター pSVK3 に挿入し、COS-1 細胞にて一過性に発現させたところ、dI/C2/C4GnT 活性が強く発現した。これらの活性比は 0.34 (dIGnT) : 1.00 (C2GnT) : 0.90 (C4GnT) だった。この活性比はラット小腸から精製した酵素標品についても全く同様であった。このことは単離した cDNA クローンが確かに精製ラット酵素に対応していることを示した。

#### [総括]

ラット小腸から均一にまで精製した dIGnT は既知 C2GnT-M のラットオーソログだった。このことは実際の小腸組織における dIGnT 活性が、ほとんど唯一 C2GnT-M に起因していることを強く示唆した。

### 論文審査の結果の要旨

細胞表面の糖タンパク質ならびに糖脂質上に形成されるポリ-Nアセチルラクトサミン鎖は、分化や細胞接着といった複雑な生命現象への関与が示唆される重要な糖鎖構造である。本構造の生物学的機能を詳細に解析するには、その生合成を担う糖転移酵素群の単離が不可欠である。ポリ-Nアセチルラクトサミン鎖の分岐構造 (血液型 I 抗原) 形成に関わる  $\beta$  1,6Nアセチルグルコサミン転移酵素 (GnT) の一つにディスタル IGnT (dIGnT) が知られている。近年、O型糖鎖の分岐構造であるコア 2 およびコア 4 構造の生合成 (C2/C4GnT 活性) を担う酵素タンパク質としてムチン型コア 2GnT (C2GnT-M) がクローン化され、試験管内において僅かながらも dIGnT 活性を示すことが明らかにされた。しかしながら、実際の組織における dIGnT 活性が如何なる酵素タンパク質に起因するのかを明確に示した研究はこれまでになかった。本研究ではラット小腸からその活性を指標として dIGnT を均一にまで精製し、精製酵素の部分アミノ酸配列をもとに対応する cDNA クローンを単離した。また、この cDNA を COS-1 細胞にて一過性に発現させ、本酵素の基質特異性を明らかにした。結果、ラット小腸から精製した dIGnT が、既知 C2GnT-M のオーソログであることが明らかになった。これは実際の小腸組織における dIGnT 活性が、ほとんど唯一 C2GnT-M に起因していることを明確に示した。本研究はこの C2GnT-M を小腸組織における dIGnT 活性の本体として精製かつ同定した初めての報告である。以上の理由から本研究は学位の授与に値するものと考えられる。