

Title	A specific detection of GlcNAc $\beta$ 1-6Man $\alpha$ 1-branches in N-linked glycoproteins based on the specificity of N-acetylglucosaminyltransferase VI
Author(s)	渡辺, 多絵
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/46285">https://hdl.handle.net/11094/46285</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〉をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

氏名	渡 辺 多 絵
博士の専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	第 20076 号
学位授与年月日	平成 18 年 3 月 24 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	A specific detection of GlcNAc $\beta$ 1-6Man $\alpha$ 1-branches in <i>N</i> -linked glycoproteins based on the specificity of <i>N</i> -acetylglucosaminyltransferase VI ( <i>N</i> -acetylglucosaminyltransferase VI の基質特異性を利用した、N 型糖タンパク質中の GlcNAc $\beta$ 1-6Man $\alpha$ 1-構造の新規検出法)
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 〕

癌の形質転換に伴い、細胞表面の糖鎖構造が変化することが多数報告されている。その一つに、*N*-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ V (GnT V) によって生合成される、N 型糖タンパク質上の GlcNAc $\beta$ 1-6Man $\alpha$ 1-構造の発現の変化がある。そのため、これらの糖鎖構造を特異的に検出することは、糖鎖構造の発現パターンと癌細胞の転移能との関係を検討するなど、数々の研究を進める上で大変意義がある。現在この GlcNAc $\beta$ 1-6Man $\alpha$ 1-構造の検出には、植物レクチンの leucoagglutinating phytohemagglutinin (L<sub>4</sub>-PHA) を用いた方法が主に用いられているが、基質特異性がそれほど高くないなどの問題点を抱えている。そこで本研究において、GlcNAc $\beta$ 1-6Man $\alpha$ 1-構造に作用するトリ *N*-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ VI (GnT VI) の組換え型酵素を用いて、GlcNAc $\beta$ 1-6Man $\alpha$ 1-構造をより特異的に検出することを試みた。

## 〔 方法ならびに成績 〕

組換え型 GnT VI は、可溶性酵素として昆虫細胞株 Sf21 を用いて発現させ、各種精製を行うことで酵素標品とした。検出法の評価は、GlcNAc $\beta$ 1-6Man $\alpha$ 1-構造をもつことが既に報告されているヒト  $\alpha$ 1-acid glycoprotein (AGP) と、GlcNAc $\beta$ 1-6Man $\alpha$ 1-構造をもたないヒトトランスフェリン、ウシフェツインを用いて行った。シアリダーゼと  $\beta$ -ガラクトシダーゼ処理した AGP、トランスフェリン、フェツインに対して、ドナー基質である放射性同位元素標識 (RI) した UDP-GlcNAc 共存下で GnT VI 酵素標品を反応させると、アシアロアガラクト AGP のみに RI 標識 GlcNAc が取り込まれた。

次に応用実験として、正常ヒト血清と各種癌細胞株を用いて GnT VI 反応を行った。同様にグリコシダーゼ処理した正常ヒト血清タンパク質をアクセプター基質として用いると、数種類のバンドが検出され、その中の一つが分子量から AGP であることが強く示唆された。さらに癌細胞株 (ヒト大腸癌細胞 WiDr とマウスメラノーマ細胞 B16F1) から溶出したタンパク質を用いた実験で、WiDr では L<sub>4</sub>-PHA によって検出されるバンドと同様の分子量を示すバン

ドが検出された。一方で、B16F1を用いた場合は、L<sub>4</sub>-PHAで検出されるバンドの他に、GnT VI によってのみ特異的に検出されるバンドがみられた。

#### [ 総 括 ]

AGP、トランスフェリン、フェツインを用いた実験により、トリ GnT VI が GlcNAc $\beta$ 1-6Man $\alpha$ 1-構造をもつ N 型糖タンパク質を特異的に検出することが示された。応用実験として、正常ヒト血清タンパク質をアクセプター基質として用いると、数種類のバンドが検出されその一つが AGP であることが強く示唆された。つまり複数の糖タンパク質が存在している条件下でも、GnT VI が GlcNAc $\beta$ 1-6Man $\alpha$ 1-構造をもつ N 型糖タンパク質を特異的に検出することが示された。さらに癌細胞株から抽出したタンパク質を用いた実験で、L<sub>4</sub>-PHA でも検出されるバンドの他に、GnT VI により特異的に検出されたバンドがみられた。このことは、L<sub>4</sub>-PHA と GnT VI の感度の違いによるものと考えられている。

以上の結果より、GnT VI を用いた新規検出方法は、GlcNAc $\beta$ 1-6Man $\alpha$ 1-構造を特異的に検出する有用な検出法として利用できる可能性が示唆された。

#### 論文審査の結果の要旨

癌の形質転換に伴い、細胞表面の糖鎖構造が変化することが多数報告されている。その一つに、N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ V (GnT-V) によって生合成される、N 型糖タンパク質上の GlcNAc $\beta$ 1-6Man $\alpha$ 1-構造の発現の変化がある。現在この構造の検出には、植物レクチンの leucoagglutinating phytohemagglutinin (L<sub>4</sub>-PHA) を用いた方法が主に用いられているが、基質特異性がそれほど高くないなどの問題点がある。

そこで本研究において、GlcNAc $\beta$ 1-6Man $\alpha$ 1-構造に作用するトリ N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ VI (GnT VI) の組換え型酵素を用いて、より特異的な検出法の開発を試みた。組換え型 GnT VI は、可溶性酵素として発現させて各種精製を行い酵素標品とした。GlcNAc $\beta$ 1-6Man $\alpha$ 1-構造をもつ AGP、GlcNAc $\beta$ 1-6Man $\alpha$ 1-構造をもたないトランスフェリンとフェツインを用いた実験により、トリ GnT VI が GlcNAc $\beta$ 1-6Man $\alpha$ 1-構造をもつ N 型糖タンパク質を特異的に検出することが示された。正常ヒト血清タンパク質をアクセプター基質として用いた実験では、AGP を含む数種類のバンドが検出され、複数の糖タンパク質が存在している条件下でも新規検出法が有効であった。さらに癌細胞株から抽出したタンパク質を用いた実験で、GnT VI によってのみ特異的に検出されるバンドがみられた。

これらの糖鎖構造の特異的な検出法は、糖鎖構造の発現パターンと癌細胞の転移能との関係を検討するなど、数々の研究を進める上で大変意義がある。以上の理由により、本研究は学位の授与に値すると考えられる。