

Title	Demonstration of the expression and the enzymatic activity of N-acetylglucosaminyltransferase IX in the mouse brain
Author(s)	三田, 知花
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46349
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"〉 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	三 田 知 花
博士の専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	第 20080 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	Demonstration of the expression and the enzymatic activity of <i>N</i> -acetylglucosaminyltransferase IX in the mouse brain. (マウス脳での GnT-IX の酵素活性と発現に関する研究)
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 岡本 光弘

論文内容の要旨

目的

糖鎖はほとんどの細胞表面及び分泌タンパク質上に存在しており、発生や分化などの様々な生理機能、病態形成に関与している。これまで当研究室において *N*結合型糖鎖のコア部分の生合成に関与する *N*-アセチルグルコサミン転移酵素 V (GnT-V) の精製、クローニングがなされていたが、近年、そのホモログとして GnT-IX 遺伝子がクローニングされた。GnT-IX は脳に特異的に発現しており、GnT-V と同様に、*N*結合型糖鎖の β 1、6GlcNAc 分岐鎖を形成し、さらに *O*-Man 型糖鎖に対しても作用する。本研究では、マウス脳における GnT-IX の発現解析と酵素活性について検討を行なう。また、抗 GnT-IX 抗体を作製し、さらに、脳における GnT-V との発現パターンを比較する。

方法ならびに成績

これまで、ヒトの各組織を用いたノーザンブロット解析より、GnT-IX は脳で特異的に発現しているが GnT-V は広範囲に発現していることがわかっている。今回、マウスでの発現を検討すると、ヒト組織でみられたように GnT-IX は脳特異的に発現していた。また、弱いながらも胸腺、精巣にもその発現が確認できた。脳においては約 4.7 kb のバンドが検出され、精巣ではこれより低分子量のものが検出された。マウス GnT-IX は 17 個のエクソンより構成されていることから、この結果は精巣でのスプライシングバリエーションの存在を示唆している。一方 GnT-V は広範な組織において発現がみられた。

次に、GnT-IX と GnT-V の脳における局在をより詳細に検討する目的で、抗 GnT-IX 抗体を作製した。ヒト GnT-IX の C 末端 Ile634-Leu792 に相当する断片を His タグをもつ発現ベクターにて組み込み、大腸菌で発現させた。組み換えタンパク質は封入体として得られたので、変性条件下にて精製した。精製タンパク質をウサギに免疫し、得られた抗血清より、抗原カラムを用いたアフィニティー精製にて特異的抗体を得た。また、COS-1 細胞へ GnT-IX 及び GnT-V 遺伝子を導入し、蛍光染色を行なった結果、抗 GnT-IX 抗体は GnT-V には反応せず GnT-IX のみ特異的に認識することが確認できた。また、シスゴルジマーカである GM130 との局在を比較した結果、GnT-IX はこれまでの糖転移酵素と同様、ゴルジ体に局在することが明らかとなった。

次に、実際にマウス組織を用いた免疫組織染色を行なった。GnT-IXは脳において pons や脳梁などにおいて発現が見られたが、肝臓では見られなかった。これはノーザンブロットでの結果と一致している。

また、GnT-IXは基質である Gn-Gn-bi-PA に対して GnT-Vと同じ産物を生成することと、GnT-Vの活性に比べてその活性が非常に低いことから、これまで内在性の活性の検出が困難であった。そこで、脳における GnT-IX 活性の検出を行なう為に、GnT-Vノックアウトマウスの脳を用いて活性測定を行なった。野生型マウスあるいは GnT-Vノックアウトマウスの脳よりマイクロソーム画分を調製し、これを酵素源に用いて酵素活性を HPLC にて検討した。その結果、野生型マウスがもつ GnT-V活性に比べて非常に微弱ではあったが、産物 Gn-Gn-Gn-tri'-PA の溶出位置に相当するピークが確認できた。さらに質量分析の結果から、このピークの質量が Gn-Gn-Gn-tri'-PA のものと一致し、脳での GnT-IX の酵素活性をはじめて検出することができた。

総括

GnT-V のホモログである GnT-IX は、ヒト同様にマウス組織においても脳特異的な発現パターンを示した。脳での GnT-IX と GnT-V の発現を詳細に検討する為に、抗 GnT-IX 抗体を作製した。この抗体は GnT-V には反応せず GnT-IX のみを特異的に認識することがわかった。マウス組織を用いた免疫染色を試みたところ、ノーザンブロットの結果と同様脳における GnT-IX の発現を確認できた。また GnT-V ノックアウトマウスの脳を酵素源に用いて酵素活性測定を行なうことで、初めて脳における GnT-IX 活性を特異的に検出することができた。今回の結果から、GnT-IX が確かに脳において酵素活性をもち、GnT-V と異なる発現パターンで局在していることが示された。

論文審査の結果の要旨

近年、糖鎖は核酸、タンパク質に続く第3の生命鎖として注目されている。申請者の研究室では、N結合型糖鎖のコア部分の生合成に関与する N-アセチルグルコサミン転移酵素 V (GnT-V) の精製、クローニングがなされている。また最近になり、そのホモログである GnT-IX がクローニングされた。本研究ではマウス脳での GnT-IX の発現解析と酵素活性についての検討を行なった。これまで GnT-IX は、基質である Gn-Gn-bi-PA に対して、広範な組織に発現している GnT-V と同様の反応産物を生じること、また GnT-IX の活性が GnT-V に比べて極めて弱いことから、組織における内在性活性の検出が困難であった。そこで、この内在性の GnT-V 活性の影響を除く為に、GnT-V ノックアウトマウス、及び野生型マウスの脳から調製したマイクロソーム画分を酵素源に用い、逆相 HPLC にて酵素活性を測定した。この結果、野生型マウスのもつ GnT-V 活性に比べると微弱ではあるが、産物 Gn-Gn-Gn-tri'-PA の溶出位置にピークを検出できた。さらに質量分析を行なうことで、これが確かに Gn-Gn-Gn-tri'-PA であることを確認した。また、GnT-IX と GnT-V の発現パターンの解析で必須となる抗 GnT-IX 抗体を作製し、マウス脳での両者の発現を比較した。結果、GnT-IX と GnT-V は脳において異なった発現パターンを示すことがわかった。以上のことより、本研究から GnT-IX が確かに脳において酵素活性を有して存在することがわかり、GnT-V と脳において役割分担をしていることが予想された。以上の研究結果から、学位の授与に値するといえる。