

# 論文の内容の要旨

論文題目 Molecular Cloning and Characterization of Two Novel  $\beta$ 1,3-glycosyltransferases.  $\sim\beta$ 1,3-galactosyltransferase 5 ( $\beta$ 3Gal-T5) And  $\beta$ 1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 5 ( $\beta$ 3Gn-T5)

2種類の新規  $\beta$ 1,3-糖転移酵素のクローニングと解析 $\sim\beta$ 1,3-ガラクトース転移酵素 5 及び  $\beta$ 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素 5 について

氏名 梶谷内 晶

## はじめに

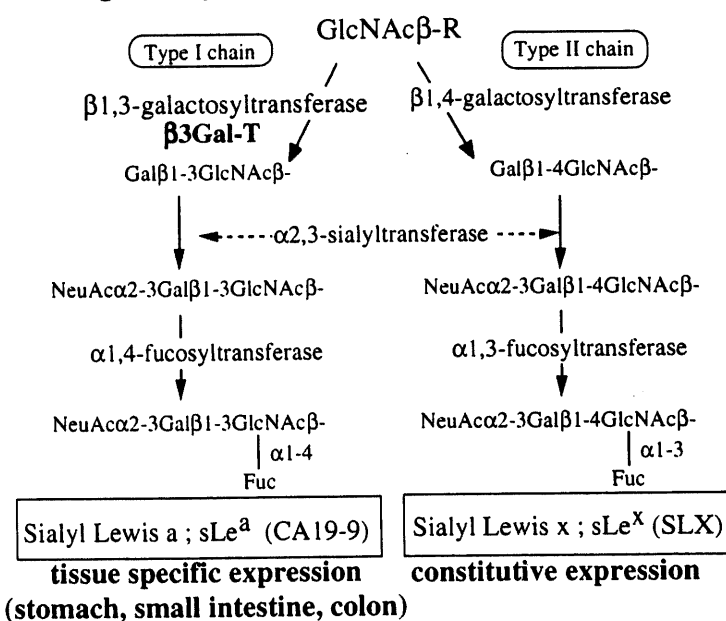
細胞表面の糖鎖構造は多くの糖転移酵素の協調的な働きによって、その生合成が担われており、合成に関わる糖転移酵素の様々な特性により、多種多様な構造を生ずる。しかし、消化管上皮細胞における CA19-9 抗原の発現、神経細胞や血球細胞における HNK-1 抗原の発現において、特定の糖転移酵素の発現が制御の鍵となっていることを以下に述べる研究から見出した。

## 第1章

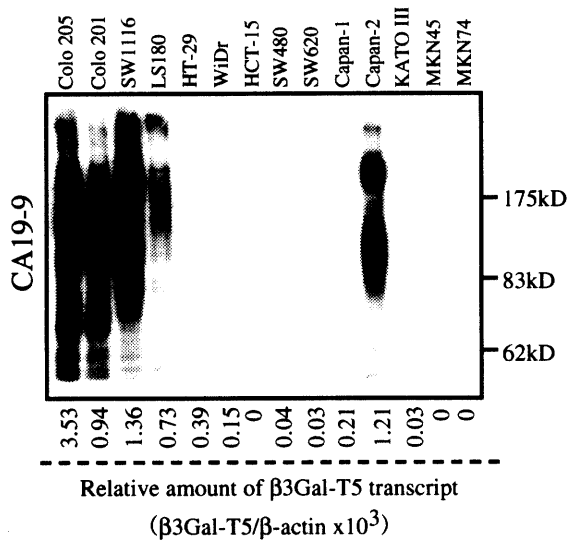
CA19-9 抗原の生合成に関与する  $\beta$ 1,3-ガラクトース転移酵素遺伝子 ( $\beta$ 3Gal-T5) のクローニングと機能解析

【序論】 CA19-9 抗原は大腸癌、胃癌、膵癌などの消化器癌の進展に伴い患者血清中に発現する腫瘍マーカーであり、その抗原決定基はシアリルルイス a (sialyl Lewis a) 抗原という糖鎖抗原である (Fig. 1)。この糖鎖抗原は接着分子セレクトインと結合することが知られており、癌転移に関与する。癌組織や患者血清中における本抗原の発現

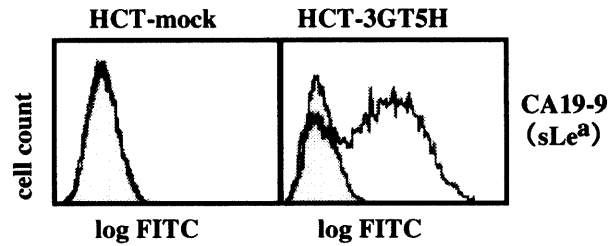
Fig. 1 Biosynthetic pathway of Lewis antigens



**Fig. 2 Correlation between the amount of CA19-9 antigens and  $\beta$ 3Gal-T5 transcript levels**



**Fig. 3 Flow cytometry analysis of  $\beta$ 3Gal-T5 transfected HCT-15 cells**

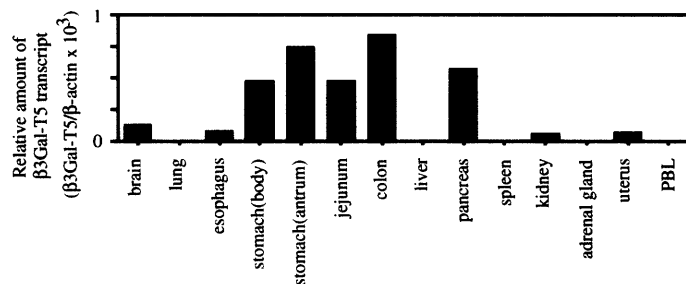


は癌の悪性度や患者の予後と相関することが報告されている。本抗原の生合成には 1 型糖鎖 (Gal $\beta$ 1-3GlcNAc-R) の合成に参与する $\beta$ 1,3-ガラクトース転移酵素( $\beta$ 3Gal-T)が必須であるが (Fig. 1)、既知の 3 種類の $\beta$ 3Gal-T 遺伝子群の癌細胞株における発現量を定量したところ、

細胞表面の CA19-9 抗原の発現量と相関を示さなかった。そこで大腸癌・胃癌・膵癌において CA19-9 抗原の合成に参与している未知の $\beta$ 3Gal-T が他に存在すると考えられた。大腸癌細胞や膵癌細胞における CA19-9 抗原の生物学的機能の解析をするにあたり、その生合成に参与している本酵素遺伝子の単離と機能解析が必須であると考えられた為、その遺伝子クローニングを行った。

**【方法・結果】** 既知の $\beta$ 3Gal-T 酵素群のアミノ酸配列をもとに degenerate primer を設計し、大腸癌細胞 Colo205 由来 cDNA ライブラリーから、既知の $\beta$ 3Gal-T 遺伝子にホモロジーを有する 310 アミノ酸からなる蛋白質をコードする新規の cDNA のクローニングに成功した。本酵素遺伝子の発現量は、大腸癌、膵癌株における CA19-9 発現量によく相関していた (Fig. 2)。また本酵素遺伝子の安定導入細胞株のフローサイトメトリー解析により細胞表面の CA19-9 抗原を合成できるようになることを確認した (Fig. 3)。この $\beta$ 3Gal-T 活性を有する新規の酵素を $\beta$ 3Gal-T5 と命名した。各 $\beta$ 3Gal-T 遺伝子の遺伝子安定導入株を作製し、その細胞抽出液を酵素源としてオリゴ糖基質 (GlcNAc $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4Glc) に対する糖転移活性測定を行った結果、 $\beta$ 3Gal-T 活性が証明され、 $\beta$ 3Gal-T5 の活性が既知の $\beta$ 3Gal-T 酵素群よりも明らかに強いことが証明された。組織発現分布をみると主に胃、大腸、小腸、膵臓、子宮などの消化器官に発現が見られた (Fig. 4)。

**【まとめ】** 発現や活性等を考えると、本研究においてクローニングに成功した $\beta$ 3Gal-T5 酵素が大腸癌・胃癌・膵癌組織あるいは癌細胞において CA19-9 抗原を合成する酵素であると結論できた。この酵素は消化器官特異的な発現をしており、癌の転移における糖鎖抗原の生理的役割と非常に関係が深いものと考えられた。今後は本遺伝子の解析により、分子レベルでのさらなる詳細な研究が可能になると考えられる。



**Fig. 4 Tissue distribution of human  $\beta$ 3Gal-T5**

## 第2章

### 糖脂質上の HNK-1 及び Lewis x 抗原発現に關与する新規 $\beta$ 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素 ( $\beta$ 3Gn-T5) 遺伝子のクローニングと機能解析

【序論】 糖脂質上の糖鎖抗原である Sulfoglucuronyl Glycolipid (SGGL, 別名 CD57 あるいは HNK-1 抗原) や Lewis x 抗原 (CD15) などは発生特異的あるいは組織特異的にその発現が制御されている。それらを含むラクト・ネオラクト系列糖鎖は、抗体での阻害実験等から神経細胞などにおける樹状突起の伸長などに関わっているとの数多くの報告がなされた。

これらの糖鎖は  $\beta$ 1,3-N-アセチルグルコサミン転移酵素 ( $\beta$ 3Gn-T) である Lactotriaosylceramide (以下  $Lc_3$ Cer) 合成酵素により合成され、この酵素によりその発現の調節がなされているとの報告がある (Fig. 5)。また、この酵素は糖脂質糖鎖の生合成において、他の系列糖鎖の発現のバランス調節においても重要であると考えられる。そこで、この  $Lc_3$ Cer 合成酵素遺伝子を単離・解析することを目的として研究を進めた。

【方法・結果】 我々が今まで報告してきた既知の  $\beta$ 3Gn-T 群も遺伝子ファミリーを形成しており、新規  $\beta$ 3Gn-T もこれらのモチーフのアミノ酸配列を有していると考えられた。データベースを検索して、既知遺伝子にホモロジーを有するラットおよびヒトの EST 配列を見出し、これを元に 378 アミノ酸からなる蛋白質をコードする新規のヒトの遺伝子を単離し、後の解析より  $\beta$ 3Gn-T5 と命名した。 $\beta$ 3Gn-T5 酵素は糖脂質基質、ラクトシルセラミド (LacCer) とパラグロボシド ( $nLc_4$ Cer) に対する強い酵素活性を示した為、この酵素は  $Lc_3$ Cer 合成酵素である可能性が推察された (Table 1)。また、ポリラクトサミン構造のオリゴ糖基質に対する活性では  $\beta$ 3Gn-T2 が最も強い活性を示していた (Table 2)。 $\beta$ 3Gn-T5 が生体内でも

Fig. 5 Biosynthetic pathways of glycolipids

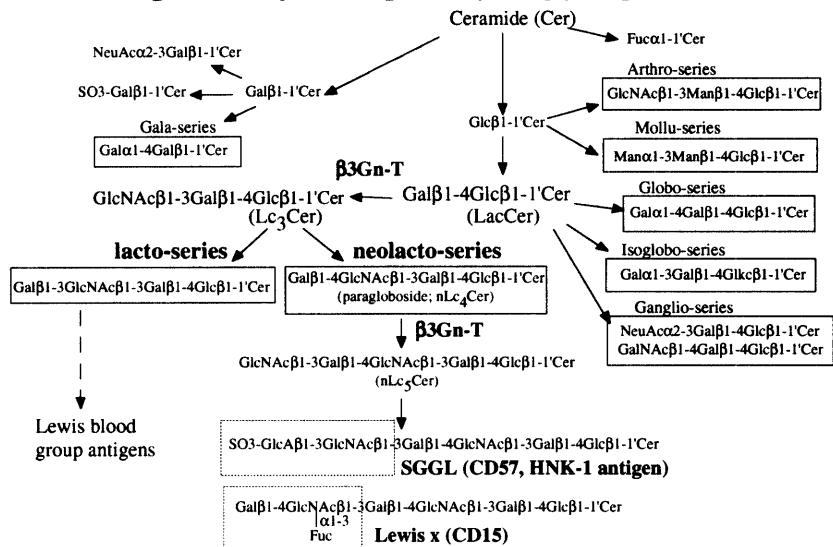


Table 1 Specific activity of recombinant  $\beta$ 3Gn-Ts towards glycolipid substrates

Substrate	Relative activity(%)			
	$\beta$ 3Gn-T5	$\beta$ 3Gn-T2	$\beta$ 3Gn-T3	$\beta$ 3Gn-T4
LacCer	100.0	0.5	0.1	ND
nLc <sub>4</sub> Cer	466.7	21.8	0.8	ND
GalCer	ND	NT	NT	NT

ND : Not Detected, NT : Not Tested

Table 2 Specific activity of recombinant  $\beta$ 3Gn-Ts towards poly-N-acetyllactosamine substrates

Substrate	Relative activity(%)			
	$\beta$ 3Gn-T5	$\beta$ 3Gn-T2	$\beta$ 3Gn-T3	$\beta$ 3Gn-T4
LNnT-2AB	38.9	100.0	2.5	ND
2LN-2AB	25.4	94.3	1.1	ND
3LN-2AB	30.8	90.4	1.8	ND
4LN-2AB	3.9	91.0	1.0	ND
5LN-2AB	4.8	85.3	2.5	ND

LN: Gal $\beta$ 1-4GlcNAc, ND : Not Detected, NT : Not Tested

Lc<sub>3</sub>Cer 合成酵素活性を示すのかを確認する為、β3Gn-T5 遺伝子安定導入細胞株から中性糖脂質画分を抽出し、その糖脂質組成を調べると Lc<sub>3</sub>Cer 酵素により合成される糖鎖構造の顕著な増加が見られた(Fig. 6)。血球系細胞の分化誘導、あるいはラットの脳の発生過程に伴い、この酵素の活性が変化することが既に報告されていたので、β3Gn-T5 遺伝子の転写産物の変化を定量した結果、β3Gn-T5 遺伝子発現の変化はこれらの報告と一致することを確認した(Fig. 7)。以上の結果より、β3Gn-T5 が Lc<sub>3</sub>Cer 合成酵素であると結論付けた。

【まとめ】 *in silico* による解析手法を効果的に用いることにより Lc<sub>3</sub>Cer 合成酵素遺伝子をクローニングすることに成功した。今後は本遺伝子を用いた解析により、糖脂質の機能、特にラクト・ネオラクト系列の糖鎖、そして HNK-1 抗原などの生物学的機能の解析をより詳細に行うことが可能になると考えられる。

### おわりに

糖鎖抗原の細胞特異的、分化段階特異的な発現を制御するこれらの酵素の重要性をさらに明確にする為の第一歩として、まず遺伝子クローニングを行い、2種類の新規の遺伝子のクローニングに成功した。本研究によりクローニングされた新規糖転移酵素遺伝子はβ1,3-結合の糖転移酵素群から形成される同じ遺伝子ファミリーに属しているが、本研究による解析によって、異なる基質特異性を有しそれぞれ特徴的な糖鎖構造を合成すること、そして生物学的に異なる機能を担っていることが明らかになった(Fig. 8)。本研究による遺伝子の単離と解析により糖鎖抗原の特異的な発現を制御するこれらの酵素の重要性をさらに明確にする為の基礎が築かれた。

将来的な展望として、クローニングされた遺伝子を用いることによって、細胞、あるいは動物個体レベルでの糖鎖リモデリングが可能となることで、糖鎖の生物学的機能をより詳細に解析できるのではないかと考えられる。

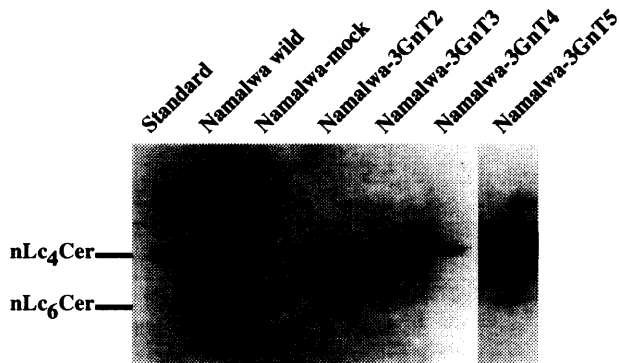
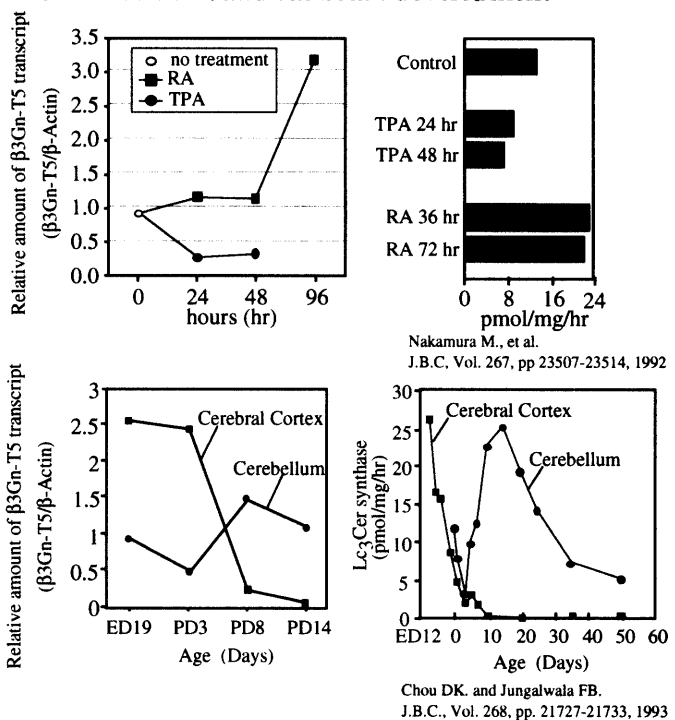


Fig. 6 HPTLC immunostaining of neutral glycolipids extracted from Namalwa cells and transfectants.

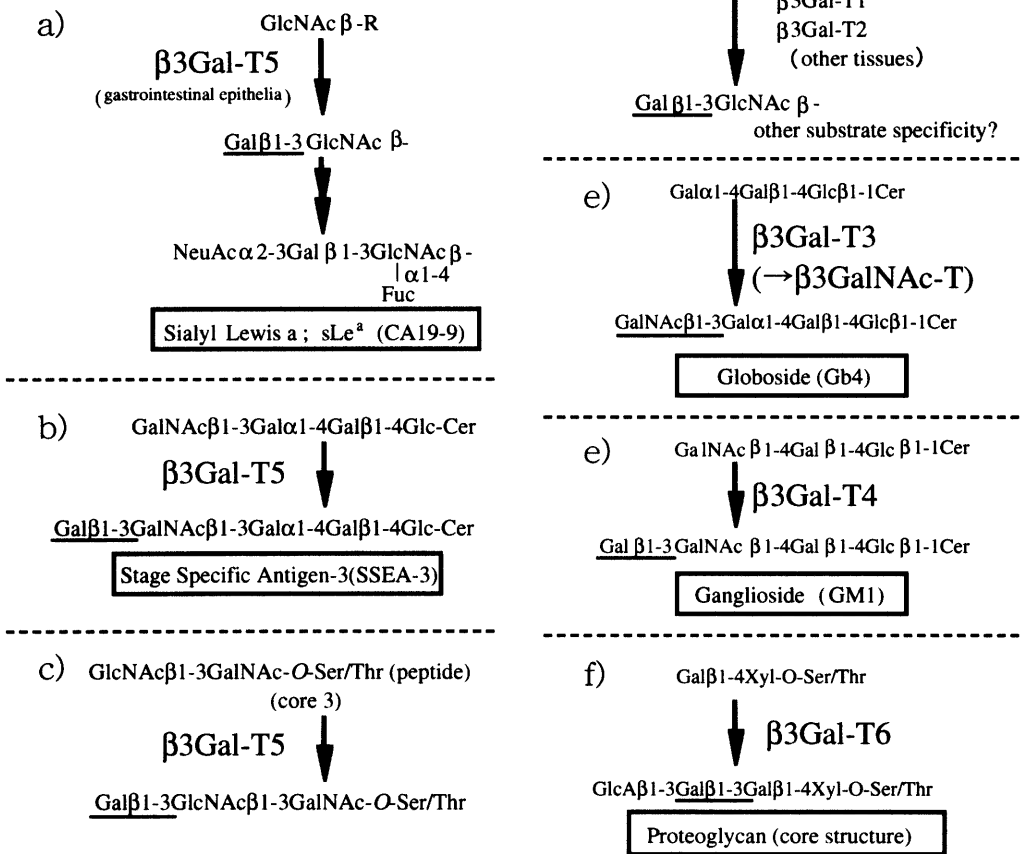
Fig. 7 Change of β3Gn-T5 transcript levels during differentiation of HL-60 cells by induction with RA or TPA, and rat brain development



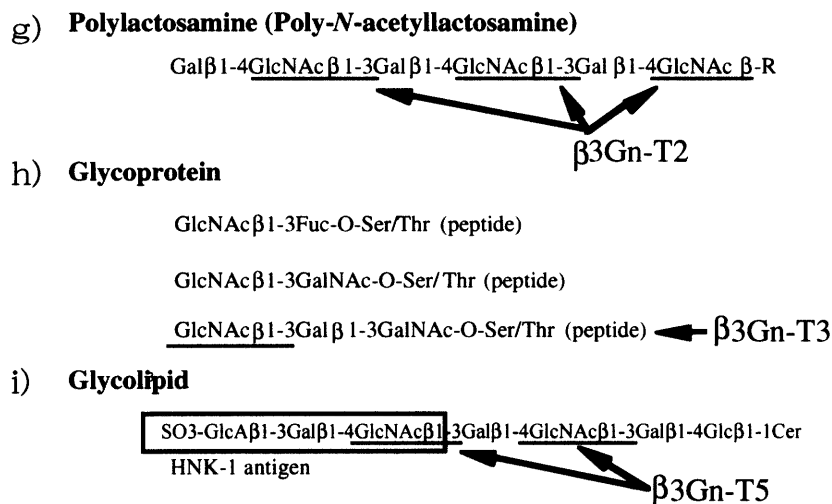
Nakamura M., et al.  
J.B.C., Vol. 267, pp 23507-23514, 1992

Chou DK, and Jungalwala FB.  
J.B.C., Vol. 268, pp. 21727-21733, 1993

## $\beta$ 3Gal-T Family



## $\beta$ 3Gn-T Family



**Fig. 8 Functions of  $\beta$ 3Gal-T and  $\beta$ 3Gn-T family.**

### 【参考文献】

- 1 • Isshiki, S., Togayachi, A., and Narimatsu, H. et al. (1999) *J Biol Chem.* 274, 12499-12507
- 2 • Shiraishi, N., Togayachi, A., and Sasaki, K. et al. (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 3498-3507
- 3 • Togayachi, A., Irimura T, and Narimatsu H. et al. (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 22032-22040