

氏名(本籍)	佐藤 麻衣子 (北海道)		
学位の種類	博士(医学)		
学位記番号	博甲第4781号		
学位授与年月日	平成20年3月25日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	人間総合科学研究科		
学位論文題目	thrombospondin type 1 repeat domain 上の O-Fuc 修飾に関する新規ヒト $\beta$ 1,3 グルコース転移酵素遺伝子のクローニングと機能解析		
主査	筑波大学教授	医学博士	高橋 智
副査	筑波大学准教授	博士(医学)	工藤 崇
副査	筑波大学准教授	医学博士	正田 純一
副査	筑波大学講師	博士(医学)	柴原 健

## 論文の内容の要旨

### (目的)

遺伝子から転写翻訳されたタンパク質が実際に機能するためには、糖鎖付加などの翻訳後修飾を受けることが必要である。糖鎖は小胞体 (ER) やゴルジ装置に存在する糖転移酵素によって、糖スクレオチドを糖供与体として、タンパク質あるいは受容体糖鎖に単糖が付加される反応により合成される。タンパク質のセリン (Ser) またはスレオニン (Thr) 残基に直接 Fuc が結合した O-Fuc は保存されたコンセンサス配列上に存在し、これまでに epidermal growth factor like repeat (EGF) domain と、thrombospondin type 1 repeat (TSR) domain に存在することが報告されている。EGF domain 上 O-Fuc の生合成は、ER に存在する GDP-fucose: protein O-fucosyl transferase 1 (POFUT1) により行われる。Fuc の次に N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) を付加する反応は、O-Fuc 特異的  $\beta$ 1,3-N-acetylglucosaminyl transferase である Fringe により行われる。一方、thrombospondin の TSR domain に Fuc を付加する酵素は、GDP-fucose: protein O-fucosyl transferase 2 (POFUT2) であるが、その O-Fuc に  $\beta$ 1,3 結合で Glc を付加する酵素 ( $\beta$ 3Glc-T) は、CHO 細胞で内在性の酵素活性が報告されているだけで、その遺伝子は未だ同定されていなかった。そこで本論文では、 $\beta$ 3Glc-T の遺伝子の同定と生化学的な解析を行った。

### (対象と方法)

#### 1. データベース検索と新規糖転移酵素候補遺伝子のクローニング

糖転移酵素遺伝子は、糖供与体と受容体基質の結合様式に特異的なモチーフ配列を有している。 $\beta$ 1,3 結合での糖転移酵素活性を持つ  $\beta$ 3GT ファミリーに  $\beta$ 3GT モチーフが保存されている。 $\beta$ 3GT モチーフをクエリー配列として GenBank™ database に対し検索を行った。

#### 2. $\beta$ 3Glc-T 遺伝子の酵素活性および基質特異性の解析

糖転移酵素活性を調べるために、リコンビナント酵素を作製し、糖転移酵素活性のスクリーニングを行った。さらに、大腸菌で発現させた EGF domain と、TSR domain を糖受容体として用い、 $\beta$ 3Glc-T の基質特異性を解析した。

### 3. $\beta$ 3Glc-T の細胞内局在の検討

$\beta$ 3Glc-T の細胞内局在を調べるため、 $\beta$ 3Glc-T の N 末端側のシグナル配列の直後に FLAG タグを導入し、COS1 細胞へトランスフェクションした。その細胞を抗 FLAG 抗体により免疫染色を行い、細胞内局在を検討した。

(結 果)

#### 1. データベース検索と新規糖転移酵素候補遺伝子のクローニング

$\beta$ 3GT モチーフをクエリー配列として GenBank™ database に対し検索を行ったところ、新規  $\beta$ 3GT の候補となる EST 配列を得た。この EST 配列をもとに 5'RACE 法を行って得られた配列は、N 末端側には疎水性ドメイン、C 末端側に ER 局在シグナルである KDEL 様配列を有していた。また、2 価カチオンが結合すると予測される DDD 配列が存在することから、新規ヒト糖転移酵素遺伝子であると考えられた。

#### 2. $\beta$ 3Glc-T 遺伝子の酵素活性および基質特異性の解析

糖供与体として UDP-Glc、糖受容体として Fuc- $\alpha$ -para-nitro-phenyl (*p*NP) を用いた場合のみ、有意な糖転移活性が検出できた。また、反応産物を薄層クロマトグラフィーで展開したところ、CHO 細胞内在性の  $\beta$ 3Glc-T 活性による反応産物と同じ位置にバンドが検出された。さらにこれらの反応産物は、*Trichoderma* sp. の exo-1,3- $\beta$ -Glucanase で切断された。これらの結果から、反応産物は Glc $\beta$ 1,3Fuc $\alpha$ -*p*NP であることが予想され、新規糖転移酵素は  $\beta$ 3Glc-T であると考えられた。また EGF domain と TSR domain を糖受容体として活性を測定したところ、 $\beta$ 3Glc-T は TSR domain 上の O-Fuc にのみ Glc を転移する活性を有していた。この結果から、 $\beta$ 3Glc-T は TSR domain 上の O-Fuc に特異的に Glc を付加する酵素であると考えられた。

#### 3. $\beta$ 3Glc-T の細胞内局在の検討

抗 FLAG 抗体により免疫染色を行ったところ、 $\beta$ 3Glc-T は ER に存在していることがわかった。また、C 末端側の KDEL 様配列を欠失した変異体は ER には存在せず、大部分が培養液中に分泌されていることがわかった。これらの結果から  $\beta$ 3Glc-T は分泌型の可溶性酵素であり、C 末端側の KDEL 様配列により ER に局在していることが判明した。

(考 察)

今回新たにクローニングした遺伝子は非常に珍しい糖鎖構造を合成する遺伝子である。 $\beta$ 3Glc-T は他の多くの糖転移酵素とは異なり、膜結合タンパク質ではなく、シグナル配列をもつ可溶性のタンパク質であり、また ER に局在するという特徴をもつことを明らかにした。さらに、*C. elegans*, *D. melanogaster* など種を越えて相同な遺伝子が存在し、生物学的に重要な機能を持つ可能性が高いことが推測された。

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

本論文では、O-Fuc に  $\beta$ 1,3 結合で Glc を付加する酵素 ( $\beta$ 3Glc-T) を世界で初めて同定した。その結果、 $\beta$ 3Glc-T は他の多くの糖転移酵素とは異なり、膜結合タンパク質ではなく、シグナル配列をもつ可溶性のタンパク質であり、また ER に局在するという特徴をもつことを明らかにした。また、生物種に広く保存されており、重要な生物機能を有している可能性が示唆された。本論文は糖鎖化学上の重要な発見として高く評価できる。

よって、著者は博士 (医学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。