

(研究題目) 遺伝子改変による β 1,4 GalNAc転移酵素の分子機能の解析。
Analysis of the molecular function of β 1,4 GalNAc transferase by modification of the gene

(研究者)

古川 鋼一	長崎大学医学部 助教授
Koichi Furukawa	Nagasaki University School of Medicine, Assoc. Prof.
山本 朗仁	長崎大学歯学部 助手
Akihito Yamamoto	Nagasaki University School of Dentistry, Assist. Prof.
古川 圭子	長崎大学医学部 助手
Keiko Furukawa	Nagasaki University School of Medicine, Assist. Prof.
ケネス O. ロイド	ニューヨークスローン・ケッタリング癌センター 部長
Kenneth O. Lloyd	Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, Chairman

Kenneth O. Lloyd Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, Chairman

By using the molecular biological technique to modify the structure, molecular function of the β 1,4 GalNAc transferase has been analyzed. Transmembrane region (TM) seemed to be essential to express the enzyme function based on the experiments with a mutant gene which lack the TM region. Three N-glycosylations on the enzyme protein were also turned out to be important for the full expression of the enzyme function possibly due to the hampered transfer of the enzyme to Golgi or disorganized Golgi retention.

研究目的

シアル酸を含む糖脂質であるガングリオシドは神経組織に豊富に発現しており、その発生と機能維持に必須と思われる。しかしながらその合成と発現の調節機構に関しては不明の点が多く、糖鎖機能の明瞭な証明にとって大きな障害となってきた。その原因の一つはガングリオシド糖鎖の合成に働く糖転移酵素の遺伝子の単離が極めて困難で、多大の努力にもかかわらず不成功に終わってきたことによる。私達は B. Seed 達の開発した真核細胞発現系を用いてガングリオシドGM2およびGD2を合成する、 β 1,4 GalNAc転移酵素 cDNA を単離した。本酵素は脳組織に特異的に発現する、a及びb経路のガングリオシド群の前駆構造を合成するために必須であり、本遺伝子産物である酵素タンパクの機能解析は、脳内ガングリオシドの合成、発現機構と生物学的意義の解明にとって核心部分とも言える。本研究では単離された β 1,4 GalNAc転移酵素遺伝子の分子生物学的手法を用いた改変により酵素タンパク分子としての構造と機能を明らかにする。主たる内容としては、

- ① 酵素タンパクの局在と、それを決定しているシグナル配列部位を同定する。
- ② 酵素活性部位および基質結合ドメインの同定。
- ③ N型糖鎖の酵素機能における意義の解明。
- ④ 可溶性酵素タンパクの合成による基質特異性の解析。
- ⑤ 発現誘導ベクターを用いた糖鎖合成のカイネティクスと発現の解析。

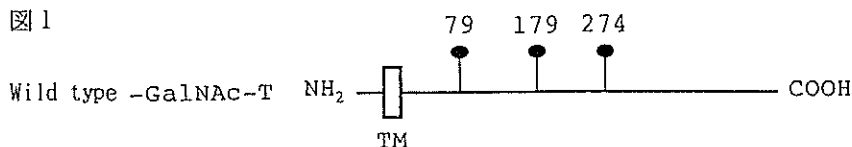
研究経過および成果

① β 1,4 GalNAc 転移酵素タンパクの局在と局在シグナル部位の同定。

現在まで解析された糖転移酵素の例では膜貫通(TM)部位とそのN末端側のcytoplasmic domain またはGolgi側の一部がGolgi膜への局在を決定していることが報告されている。当初膜貫通部の前後を含む部位を数々のアミノ酸毎に分け、各々のdeletion mutantを作製して一過性の発現系により、酵素活性の発現を糖鎖産物の発現で解析することを目指したが、その前にTM部位全体を欠失したmutant遺伝子を作成し、細胞に導入してみた。その結果、酵素機能発現の指標としてのガングリオンド発現は全く認めず、また培養液中にも酵素活性を検出できなかった。膜画分以外の細胞質画分に酵素活性が存在することを考え、トランスフェクタントを細胞の各フラクションに分画した後、酵素活性の存在を検討したが、明らかな活性はどこにも検出できなかった。TM部分を欠く変異タンパクがERに止まっているのか他の部位に存在しているのか不明であるが、TMへの局在が根本的に攪乱された結果、正しい機能発現が不能になったものと思われる。

② 3ヶ所に存在するN型糖鎖結合部位(可能性部位)を、アミノ酸の置換により変化したmutant分子を用い、酵素分子上の糖鎖の分子機能における意義につき検討した。図1に示す様に、アミノ酸79, 179, 274のAsnはAsn-X-Ser/Thrという配列を有し、N型糖鎖を結合する可能性がある。このAsnをGlnに置換することによりN型糖鎖をgeneticに欠失させるための種々のmutant cDNA遺伝子を作成し、その産物の機能を解析することにより、N型糖鎖の意義を解明した。

図1



mutant遺伝子は変異挿入primerを用いたPCRによって作成した、in vitro transcriptionによりこれらの遺伝子を鋳型にしてcomplementary RNAを作成し、それを用いたin vitro translationを行った。canine pancreas microsomeの付加、非付加などにより、wild type遺伝産物には3ヶ所にN型糖鎖が実際に付加しうることが示され、また変異遺伝子産物は意図した様に1~3ヶ所のN型糖鎖の欠失が生じていることを確認した。これらの変異遺伝子をKF3027(B16)細胞に導入した時の機能解析より、①ガングリオンド糖鎖の一過性発現には大きな差は見られない。②酵素活性ではN型糖鎖の欠失の部位数に従い30%→10%に低下した。③しかし酵素のKm値はほとんど不変であった。④酵素タンパクの局在をモノクローナル抗体を用いて、安定発現細胞で観察すると、wild typeは明瞭なGolgiパターンを示したのに対し特に79, 179 Asnの欠失ではそれが消失し、N型糖鎖が酵素タンパクの局在に重大な関わりを有することが示唆された。

- ③ プロテインAとの融合タンパクを分泌する安定発現細胞を作製し大量発現・精製を行うと共に、酵素の基質特異性を明らかにすることを意図し、proteinAのIgG結合ドメインと β 1,4 GalNAc転移酵素cDNAのcatalytic domain (アミノ酸 508ヶ) のDNAを連結した。このプラスミドをB78, またはCOS7に導入し、培養液中の酵素活性を測定したところ、高い酵素活性が得られた更に、マウスIgG結合セファロースカラムを用いて本融合酵素を精製し、基質特異性の検討に用いた。 β 1,4 GalNAc転移酵素はGM3からGM2, GD3からGD2を合成する反応と共に、lactosyl Ceramide (Lac Cer)からasialo-GM2を合成する反応にも働くか否かが争点となってきた。in vitroの酵素アッセイではGM2合成の1~3%しかasialo-GM2は合成されないが、cDNAを導入し発現させた場合は、細胞によっては十分なasialo-GM2の合成発現が見られた。重要な要因の一つは個々の細胞における、酵素のアクセプター基質の合成レベルに存在することが示唆された。
- ④ MMTV (murine mammary tumor virus)のプロモーターを有する発現ベクターに組み込んだcDNAをトランスフェクトした細胞を用いて、dexamethasoneによる発現の誘導を行った時の、新たに合成されるガングリオシド糖鎖の局在と輸送を詳細に追跡すると共に、膜発現に至るまでの動態を明らかにする目的で、発現誘導ベクターを作成したが、その後の研究はまだ進んでいない。

発表論文リスト

1. Takamiya, K., Yamamoto, A., Yamashiro, S., Furukawa, K., Haraguchi, M., Ikeda, T., Shiku, H., and Furukawa, K.: Differential regulation of β 1,4-N-acetylgalactosaminyltransferase activity in mouse thymocytes, submitted.
2. Haraguchi, M., Yamashiro, S., Furukawa, K., Takamiya, K., Shiku, H., and Furukawa, K.: Effects of site-directed removal of N-glycosylation sites in GM2/GD2 synthase on the expression of its function.