

## 論文の内容の要旨

|  |   |
|--|---|
| 論文提出者氏名  | 藤 原 麻 衣 子   |
| 論文審査担当者  | 主 査 樋 口 京 一<br>副 査 佐 々 木 克 典 ・ 森 泉 哲 次  |
| 論 文 題 目  | <p>Expression of long-form <i>N</i>-acetylglucosamine-6-<i>O</i>-sulfotransferase 1 in human high endothelial venules<br/>(ヒト高内皮細静脈における長鎖型 <i>N</i>-アセチルグルコサミン 6-<i>O</i> 硫酸転移酵素 1 の発現)</p> |
| <p>(論文の内容の要旨)</p> <p>〔背景と目的〕 <i>N</i>-アセチルグルコサミンの 6 位の炭素に硫酸基を転移する <i>N</i>-アセチルグルコサミン 6-<i>O</i>-硫酸転移酵素 (GlcNAc6ST) はヒトでは 5 種類がクローニングされており、そのうち GlcNAc6ST-1 と GlcNAc6ST-2 はリンパ節、扁桃、パイエル板などの二次性リンパ性臓器に存在する高内皮細静脈 (high endothelial venule: HEV) に発現している。この 2 つの酵素は HEV 内腔面に発現している 6-硫酸化シアリルルイス X (6-sulfo sLeX) の生合成に排他的に関与し、L-セレクトリンを介したリンパ球ホーミングにおいて重要な役割を演じている。ヒト GlcNAc6ST-1 cDNA の読み枠の長さは 1,593 bp であるが、その 5' 末端には翻訳開始メチオニンコドンが 141 bp 離れて 2 個存在している。これら 2 つの翻訳開始メチオニンコドンから転写が始まると、長鎖型と短鎖型の 2 種類の GlcNAc6ST-1 が合成されることになる。これまでの多くの研究は短鎖型の GlcNAc6ST-1 を対象にしており、長鎖型に対する解析は行われていない。また、長鎖・短鎖型に拘わらず、これまでヒト GlcNAc6ST-1 の内因性蛋白発現については確認されていない。本研究の目的は、ヒト GlcNAc6ST-1 における 2 個の翻訳開始メチオニンコドンの間に存在するアミノ酸残基を認識する抗体を作製し、長鎖型 GlcNAc6ST-1 がヒトの組織において内因性に発現しているか否かを明らかにし、さらに、長鎖型および短鎖型 GlcNAc6ST-1 の細胞内局在や酵素活性の違いを明らかにすることである。</p> <p>〔対象と方法〕 長鎖型ヒト GlcNAc6ST-1 を特異的に認識する抗体である Anti-GlcNAc6ST-1-N を作製し、その反応特異性を確認した。長鎖型および短鎖型 GlcNAc6ST-1 をコードする発現ベクター (それぞれ pcDNA1-GlcNAc6ST-1 M#1、pcDNA1-GlcNAc6ST-1 M#2) およびそれぞれの C 末端に FLAG を付けたベクター (それぞれ pcDNA1-GlcNAc6ST-1 M#1-FLAG、pcDNA1-GlcNAc6ST-1 M#2-FLAG) を作製し、HeLa 細胞に遺伝子導入した。この一連の遺伝子導入 HeLa 細胞と Anti-GlcNAc6ST-1-N 抗体、抗 FLAG 抗体である M2 抗体を用いたウェスタンブロットティングと蛍光二重免疫染色を行い、長鎖型と短鎖型の細胞内局在の違いを調べた。さらに細胞内における長鎖型と短鎖型 GlcNAc6ST-1 の酵素活性の違いを調べるために、発現ベクター pcDNA1-GlcNAc6ST-1 M#1 と pcDNA1-GlcNAc6ST-1 M#2 をそれぞれ HeLa 細胞に遺伝子導入し、6-硫酸化シアリル <i>N</i>-アセチルラクトサミン (6-sulfo sialyl LacNAc) を認識する S2 単クローン抗体を用いて Cell-ELISA を行った。長鎖型及び短鎖型 GlcNAc6ST-1 の蛋白の発現レベルの違いを調べるため、それぞれ FLAG 付きのベクターを遺伝子導入した HeLa 細胞とそれに対する M2 抗体を用いて FACS 解析を行った。また、mRNA の発現レベルの違いを調べるために半定量的分析 RT-PCR を行った。また、長鎖型 GlcNAc6ST-1 がヒトの組織で内在性に発現しているか否かを調べるため、ヒトのリンパ節組織切片に Anti-GlcNAc6ST-1-N 抗体と、HEV で発現している 6-sulfo sLeX に対する特異抗体の MECA-79、ゴルジマーカである抗 GM130・抗 GS27・抗 Rab8 抗体を用いた蛍光免疫染色を行った。</p> <p>〔結果〕 遺伝子導入した HeLa 細胞のウェスタンブロットティングと蛍光免疫染色で、Anti-GlcNAc6ST-1-N 抗体は長鎖型 GlcNAc6ST-1 を特異的に認識した。また、長鎖型 GlcNAc6ST-1 は核周囲に点状に存在し、これは短鎖型 GlcNAc6ST-1 においても同様であった。短鎖型、長鎖型 GlcNAc6ST-1 の細胞内酵素活性を Cell-ELISA により解析したところ、GlcNAc6ST-1 は両者と</p> |   |

も GlcNAc6ST-2 より有意に高い酵素活性を示したが、両者間で有意差は認められなかった。また、FACS 解析では長鎖型 GlcNAc6ST-1 に比べて短鎖型の方が蛋白の発現が高く、半定量的分析 RT-PCR では短鎖型の方が mRNA 発現も高かった。さらに、Anti-GlcNAc6ST-1-N 抗体と各種ゴルジマーカを用いたヒトリンパ節組織の蛍光二重免疫染色では、ヒトの長鎖型 GlcNAc6ST-1 は HEV を構成する内皮細胞の trans-Golgi network (TGN) に発現していた。

〔結論〕 Anti-GlcNAc6ST-1-N 抗体は長鎖型 GlcNAc6ST-1 を特異的に認識し、免疫組織染色にも使用できることを示した。また、長鎖型及び短鎖型のヒト GlcNAc6ST-1 の細胞内における局在はほぼ同じであり、両者における細胞内酵素活性は同等であることが示唆された。さらに、ヒトリンパ組織には長鎖型 GlcNAc6ST-1 が内在性に発現しており、その大部分は HEV を構成する内皮細胞の TGN に局在していることを示した。