ウシ胎仔肝シアル酸転移酵素の研究

後藤孝博

Studies on sialyltransferases of fetal calf liver

Takahiro GOTO

Abstract: Asialofetuin sialyltransferase from Triton X-100 extracts of fetal calf liver resolved by phosphocellulose column chromatography into two fractions, designated A and B in order of elution. Survey of the isomeric nature of sialyllactose formed and also of efficiencies of various substrates, which include asialofetuin, β -eliminated asialofetuin, asialoorosomucoid and bovine and porcine submaxillary mucins, has made it clear that fraction A contains Gal β 1 $\rightarrow$ 4GlcNAc α 2 $\rightarrow$ 6 sialyltransferase (associated with the synthesis of N-glycosidically linked sugar chains) while fraction B contains Gal β 1 $\rightarrow$ 3 GalNAc α 2 $\rightarrow$ 3 sialyltransferase (associated with the synthesis of O-glycosidically linked sugar chains). In addition, fraction A appears to contain a small amount of another sialyltransferase that transfers sialic acid α 2 $\rightarrow$ 3 glycosidically to N-glycosidically linked sugar chains, but its separation from the major α 2 $\rightarrow$ 6 enzyme has yet been unsuccessful. The chromatographic conditions shown above have been utilized to demonstrate (i) that the major sialyltransferase of the rat liver and human placenta is identical to the above-described A and B, respectively, and (ii) that even primary rat hepatoma induced by 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene contains no Gal β 1 $\rightarrow$ 3 GalNAc α 2 $\rightarrow$ 3 sialyltransferase.

Key words: fetal calf liver, sialyltransferase, rat hepatoma

緒 言

癌の重要な生物学的特性として、自律増殖、転移、浸潤性があげられるが、これらの特性にはすべて細胞膜が関与しており、癌化によりその細胞膜に何らかの変化が起きると考えられる。細胞膜の基本構造は脂質二分子層であるが、そこから外側に突出し細胞の最外側を占める

蛋白結合糖鎖が細胞膜の癌性変化に大きく関与している可能性がある。特に糖鎖の最末端に位置するシアル酸の動態が注目される。

Ambrose ら¹⁾は、癌化により細胞膜の陰性荷電が増大するが、ノイラミダーゼ処理により陰性荷電が失われることを報告し、癌化による細胞表層シアル酸残基の増加を示唆した。また Warren ら²⁾は、正常細胞とトランスフォームさせた細胞の形質膜から糖ペプチドを分離したところ、トランスフォーム細胞で対照細胞に比べ分子量のより大きい糖ペプチドが出現するが、これはノイラミダーゼ処理により、対照細胞のものと一致することを見いだした。これらの結果を彼らは癌化によって細胞膜のシアル酸含量が増加するためと解釈した。

ところが多くの癌細胞種でシアル酸含量の変化を調べると、得られる結果は必ずしも一様でない。ただ Vilarem ら³⁾は、細胞のシアル酸量としては減少がみられるような場合でも癌細胞の膜表層のシアロ糖蛋白は、対照細胞に比べ外環境への露出度が高いと報告している。したがって、膜表層のシアル酸の増加が癌化と密接していると

東北大学歯学部第1口腔外科学教室

(主任：林 進武教授)

東北大学抗酸菌病研究所生化学部門

(指導：立木 蔚教授)

The First Department of Oral Surgery, School of Dentistry, Tohoku University (Chief: Prof. Susumu Hayashi)

Biochemistry Laboratory, Research Institute for Tuberculosis and Cancer, Tohoku University (Prof. Shigeru Tsuiki)

受付日：昭和59年9月25日

いう上の推論が直ちに否定されるわけではないが、他方では、単に量的見地だけでなく、シアル酸の立体配置に大きな影響を与える可能性のあるシアル結合の質を癌と非癌とで比べる必要性も生じてくる。

癌化時における膜表層糖蛋白シアル化の動態とその機構を明らかにすることを究極の目標として、これまでシアル化に与かるシアル酸転移酵素についての基礎的研究を進めてきた。本酵素は基質である CMP-シアル酸から適当なアクセプター糖鎖にシアル酸を転移する反応を触媒するが、糖転移酵素一般の例にもれず“one enzyme-one linkage”⁴⁾の原則に従い生成するシアル結合の種類に応じて異なった酵素が存在すると考えられている。 $\alpha 2 \rightarrow 6$ シアル酸転移酵素に関しては、宮城ら⁵⁾がラット肝-肝癌系で検討を加え、いずれの組織からもただ1種類の β -ガラクトシド $\alpha 2 \rightarrow 6$ シアル酸転移酵素を単離した。そこでつぎに、 $\alpha 2 \rightarrow 3$ シアル酸転移酵素の癌性変化について解析する目的で、まだ詳細には明らかとなっていないこの酵素の種類や性状等の調査をまずウシ胎仔肝を材料として行い、その結果をもとに癌化時の変化についてラット肝-肝癌系で検討した。 $\alpha 2 \rightarrow 3$ 酵素の研究材料としてウシ胎仔肝を取り上げたのは、これが糖蛋白フェイトインの合成臓器だからである。フェイトインは糖鎖の構造研究がもっとも進んでいる糖蛋白で、この知識からすればウシ胎仔肝には 1) Gal $\beta 1 \rightarrow 4$ GlcNAc $\alpha 2 \rightarrow 6$, 2) Gal $\beta 1 \rightarrow 4$ GlcNAc $\alpha 2 \rightarrow 3$, 3) Gal $\beta 1 \rightarrow 3$ GalNAc $\alpha 2 \rightarrow 3$, 4) GalNAc $\alpha 2 \rightarrow 6$ シアル酸転移酵素の少なくとも 4 種類のシアル酸転移酵素の存在が推定される。

実験材料および方法

動物と試薬

ウシ胎仔肝、ウシ顎下腺、ブタ顎下腺は仙台市食肉衛生検査場から屠殺後 3～5 時間経過したものを、またヒト胎盤は東北大学医学部附属病院産婦人科より供与され、いずれも実験前まで -80°C で凍結保存した。ラットは正常食餌で飼育した Wistar 系成体ラット (体重 200～250 g) を用い断首脱血後肝を採取した。ラット肝癌は 3'-メチルジアミノアゾベンゼン含有食餌で Wistar 系ラットに原発性肝癌を誘発して得た。詳細は Miyagi ら⁶⁾の方法に従った。

フェイトイン (タイプ IV)、オロソムコイドはシグマ社製を用いた。ブタ顎下腺ムチンは Plonska ら⁷⁾の方法により、ウシ顎下腺ムチンは Tsuiki ら⁸⁾の方法によりそれぞれ調製した。ラクト-N-テトラオース、オロソ-N-オクタオースは福島県衛生公害研究所の小関正意博士より供与された。これらのオリゴ糖の構造式はそれぞれ以下の通りである。

基質として用いた CMP-N-アセチルノイラミン酸は、N-アセチルノイラミン酸 (半井化学薬品社製) と CTP (ペーリンガー社製) からラット脳を酵素源として⁹⁾合成し、 ^{14}C で標識した CMP-N-アセチルノイラミン酸は、New England Nuclear 社製を用いた。

ペーパークロマトグラフのスタンダードに用いた $\alpha 2 \rightarrow 3$ および $\alpha 2 \rightarrow 6$ シアルラクトースは、ウシ初乳のシアルラクトース (ペーリンガー社製) からペーパークロマトグラフィー (下記) によって分離調製した。

カラムクロマトグラフィーで用いたホスホセルロースは Whatman 社製の P 11, ヒドロキシアパタイトは BDH ケミカル社製、セファデックス G-25, G-200 はファーマシア社製、ダウエックス 1X-8 は米国ダウケミカル社製をそれぞれ用いた。

分子量測定において用いたマーカー酵素はすべてペーリンガー社製である。

アクセプターの調製

フェイトイン、オロソムコイド、ウシ顎下腺ムチン、オロソ-N-オクタオースは酸加水分解¹⁰⁾ ($0.1 \text{ N H}_2\text{SO}_4$, 80°C , 60 分) で脱シアル化し、ブタ顎下腺ムチンは Kuhn ら¹¹⁾の方法 ($1 \text{ N H}_2\text{SO}_4$, 70°C , 180 分) で脱シアル化、脱フコシル化し、透析によりシアル酸、フコースを除いた。また、アルカリ処理により O-グリコシド結合糖鎖を除いたフェイトイン¹²⁾も脱シアル化して用いた。酸加水分解後、遊離したシアル酸量を測定し、アクセプターの濃度は脱離シアル酸量で決定した。遊離シアル酸の定量は Warren¹³⁾の方法によった。

酵素の調製

以下の操作はすべて $0 \sim 4^{\circ}\text{C}$ で行った。

ウシ胎仔肝 100 g を生理食塩水で洗い、ろ紙で水分を吸い取ってから、はさみで細切、次いで材料の重量の 4 倍量の 0.25 M シュクロース - 25 mM KCl - 1 mM EDTA - 10 mM リン酸カリウム (pH 6.8) バッファー (バッファー A) を加え、テフロン-ガラス-ホモジナイザーでホモジナイズ (4 ストローク) した。これらを $600 \times \text{g}$ で 10 分間遠心して残渣を除き、その上清 (ホモジネート) をさらに $78,000 \times \text{g}$ で 70 分間遠心し、 $78,000 \times \text{g}$ 沈渣を得た。この沈渣をバッファー A 100 ml に懸濁し、トリトン X-100 を最終濃度が 2% となるように添加、これをテフロン-ガラス-ホモジナイザーで再びホモジナイズ (4 ストローク) し、 $78,000 \times \text{g}$ で 70 分間遠心してその上清を得た。これに等量の飽和硫酸溶液を加え 50% 飽和とし、 $15,000 \times \text{g}$ で 10 分間遠心し析出画分を回収した。

$0 \sim 50\%$ 硫酸画分を 50 mM リン酸カリウム (pH 6.8)

図1 ウシ胎仔肝シアル酸転移酵素のホスホセルロースカラムクロマトグラフィー

—1 mM EDTA 10 ml に溶解, 2 本のセファデックス G-25 カラム (2.5×40 cm) により脱塩し, 50 mM リン酸カリウム (pH 6.8)—1 mM EDTA—0.01% トリトン X-100—5% グリセロール (バッファー B) で平衡化したホスホセルロースカラム (1.5×7.0 cm) にアプライした。カラムはまずバッファー B で洗浄後, 食塩による直線濃度勾配 (0~0.8 M NaCl) で溶出した。溶出液を 10 ml ずつ分取, そのおのおのについてアシアロフェトインをアクセプターとしてシアル酸転移酵素の活性を測定した。

酵素活性の測定

シアル酸転移酵素活性は, CMP-[¹⁴C] シアル酸からアクセプターへの [¹⁴C] シアル酸の転移量により測定した。用いた測定系は, 0.01 μmol CMP-[¹⁴C] シアル酸, 0.1 μmol アクセプター, 5 μmol MES (pH 6.5) に酵素液を加えて全量 0.1 ml としたものである。これを 37°C で 2~3 時間インキュベート, 反応停止は蛋白質がアクセプターの場合は 1 ml の 1% ホスホタングステン酸—0.5 N 塩酸液を添加することにより, 以下の操作は Miyagi ら⁹⁾ の方法に従った。またオリゴ糖をアクセプターとした時は, -80°C 凍結により反応を停止後, 高圧ろ紙電気泳動法¹⁴⁾により反応生成物と CMP-[¹⁴C] シアル酸を分離し, 生成物部分を切り出して, 液体シンチレーションカウンターにより計測した。

シアリルラクトースの生成とその異性体の分離

シアル酸転移酵素によりシアリルラクトースを生成するときは, 0.05 μmol CMP-[¹⁴C] シアル酸, 50 μmol ラクトース (東京化成工業社製), 10 μmol MES (pH 6.5), 酵素液で全量を 300 μl とし, 37°C で 10 時間インキュベート後, 凍結により反応を止めた。これに 1.7 ml の水を加え, ダウエックス 1X-8 (PO₄²⁻ 型) カラム (0.5×5 cm) に通し, 4 ml の水で洗浄後 2 ml の 5 mM リン酸カリウムバッファー (pH 7.0) でシアリルラクトースを溶出した。溶出液を凍結乾燥後, 50 μl の水に溶解

し, オーセンティックの α 2→3, α 2→6 シアリルラクトースと共にペーパークロマトグラフィーを行った。ろ紙は「TOYO」社製 No. 514 を用い, 展開液は酢酸エチル:ピリジン:酢酸:水の 5:5:1:3 (v/v) の混合液を用いた。クロマトグラフィーは下降式とし, 室温で 50 時間行った。シアル酸はレゾルシノール法¹⁵⁾により, ラクトースは硝酸銀法¹⁶⁾により染出した。クロマトグラムを縦に二分し, その半分でシアリルラクトース異性体の部位を検出しそれぞれに相当する部分を他の半分のクロマトグラムから切り出し液体シンチレーションカウンターで計測した。

酵素反応産物としてのシアリル化糖蛋白のアルカリ処理

シアル酸転移酵素反応後, 反応液 (全量 0.1 ml) に, 0.1 ml の 0.2 N NaOH—1.6 M NaBH₄ を加え, 37°C で 24 時間インキュベートした後, 5 N 酢酸を少量ずつ発泡が止むまで滴下した。暫時静置後セファデックス G-25 カラム (0.8×30 cm) にかけて, 0.4 ml ずつ分取, この方法によってシアリル化されたアクセプター糖蛋白から, アルカリ処理によって遊離したシアリル化糖を分離した。次いで各画分から 0.1 ml ずつをろ紙にとり, 乾燥後液体シンチレーションカウンターにかけ, 残存した糖蛋白結合シアル酸の放射活性を計測した。

分子量の測定

ゲルろ過による時はセファデックス G-200 カラム (1.5×40 cm) を用い, カタラーゼ (分子量 240,000), アルコール脱水素酵素 (145,000), ペルオキシダーゼ (40,000), チトクローム C (12,400) をマーカー酵素とした。バッファーは, バッファー B に 0.2 M 食塩を含むものを用いた。

ショ糖密度勾配遠心法による時はバッファー 50 mM リン酸カリウム (pH 6.8)—1 mM EDTA—0.01% トリトン X-100—3 μM CTP を用い, ショ糖により 5~20% の直線密度勾配を作った。この 28 ml からなるこのショ糖溶液の上部に酵素液 0.45 ml とマーカー酵素液 0.05 ml の混合液を重層した。マーカー酵素はゲルろ過法と同じものを用いた。日立 RpS-25 ローターで 22,000 rpm, 36 時間遠心後, 遠心管の底部から, 14 滴ずつ取り, 66 画分を得, それぞれの画分のシアル酸転移酵素活性を測定した。

結 果

シアル酸転移酵素の細胞顆粒画分局在とその可溶性

アシアロフェトインをアクセプターとした時, ウシ胎仔肝に含まれるシアル酸転移酵素の活性は, ホモジネートを 100% とすると, 78,000×g 沈渣に 78%, その上清に 3.5% となり, 活性のほとんどは沈澱画分に回収された。この沈澱画分を 2% トリトン X-100 で処理すると,

表 1 シアル酸転移酵素Bの部分精製

	総蛋白量 (mg)	総 活 性 (ユニット)	比 活 性 (ユニット/mg)	回 収 (%)	精製度
1. ホスホセルローズ (ステップワイズ法)	8.2	78.2	9.5	100	1
2. ホスホセルローズ (グラジエント法)	3.0	48.5	16.2	62	2
3. ヒドロキシアパタイト	0.59	22.3	37.8	29	4
4. セファデックス G-200	0.10	9.2	91.5	12	10

(1ユニット＝1時間当たり1nmolのシアル酸を転移する酵素量)
アシアロフェイトインをアクセプターとして活性を測定した。

図 2 セファデックス G-200 クロマトグラフィーによるシアル酸転移酵素の分子量の測定
2 ml ずつ分取し、アシアロフェイトインをアクセプターとして活性を測定した。

沈澱画分の69.2%の活性が上清画分に回収され、可溶化された。また、トリトン X-100 は可溶化前の酵素を活性化したが、可溶化後は、逆に抑制的に作用するようになった。

可溶化酵素のカラムクロマトグラフィー

上記可溶化操作後の上清から50%硫酸飽和で沈澱させた画分を脱塩後、ホスホセルローズカラムで展開した。アシアロフェイトインをアクセプターとした時シアル酸転移酵素の活性は、二つの活性ピーク（A，B）として溶出された（図1）。それぞれのピークの大きさは材料に

より一様でなかったが、溶出部位は常に一定していた。ピークAは再クロマトグラフィーにより精製、その標品について性状を調べた。

ピークBについては表1に示すような経過で部分精製を試みた。ウシ胎仔肝100gから「実験方法」に述べたように0～50%硫酸画分を得た。脱塩後、まずバッファーBで平衡化したホスホセルローズカラム（2.5×5.0cm）にアプライし、洗浄後、0.3M食塩を含むバッファーBで溶出し、次いで1.0M食塩を含むバッファーBで溶出した（スラップ1）。この1.0M食塩溶出画分

をバッファー 50 mM リン酸カリウム (pH 6.8) - 1 mM EDTA に対して 6 時間透析し, 0.2 M 食塩を含むバッファー B で平衡化したホスホセルロースカラムにアプライした。洗浄後食塩による直線濃度勾配 (0.2~1.0 M NaCl) で展開すると, 図 1 におけるピーク B の溶出部位と同様の食塩濃度である 0.5 M 付近に単一のピークとして活性が溶出された (ステップ 2)。得られた画分を, 限外ろ過法 (PM 10, アミコン社) で濃縮し, バッ

ファー 50 mM リン酸カリウム-0.01% トリトン X-100 で 3 時間透析を加えた後, ヒドロキシアパタイトカラムクロマトグラフィー (1.5×7.0 cm) を行った。50 mM リン酸カリウム (pH 6.8) - 0.01% トリトン X-100 - 5% グリセロールで平衡化したカラムに標品をアプライし, 同じバッファーで洗浄後, 100 mM リン酸カリウム (pH 6.8) - 0.01% トリトン X-100 - 5% グリセロール, 次に 300 mM リン酸カリウム (pH 6.8) - 0.01% トリトン X-100 - 5% グリセロールで溶出した。酵素活性はほとんどが 300 mM リン酸カリウムの溶出画分に回収された (ステップ 3)。限外ろ過法 (PM 10) により標品を 3 ml に濃縮し, セファデックス G-200 カラム (1.5×40 cm) クロマトグラフィーを行った。この時, 分子量 49,000 の位置に主な活性ピークを示したが, void volume 付近にも小さいピークが認められた (ステップ 4)。以上のステップを経て, ピーク B はピーク A と分離後, 10 倍の比活性を持つ部分精製標品として得られた。

シアル酸転移酵素 A, B の分子量および反応動力学

分離, 部分精製した二種の酵素画分の諸性質を調べた。A 酵素はセファデックス G-200 によるゲルろ過では単一ピークを示し, マーカー酵素として用いたペルオキシダーゼと溶出部位が一致し, したがって分子量 49,000 と推定された。ペルオキシダーゼは本来 40,000 の分子量を持つが, ゲルろ過法では 49,000 の位置に溶出される¹⁷⁾。B 酵素はステップ 1, 2 画分をゲルろ過した時, void

図 3 ショ糖密度勾配遠心法によるシアル酸転移酵素 B の分子量の測定

マーカー酵素の沈降係数 カタラーゼ (11.3 S), アルコール脱水素酵素 (7.4 S), ペルオキシダーゼ (3.5 S), チトクローム C (1.7 S)

図 4 シアル酸転移酵素 A, B の至適 pH. アクセプターとしてアシアロフェイトインを用いた

A : --- (Δ, ○, □), B : — (▲, ●, ■), (Δ, ▲) 酢酸バッファー, (○, ●) MES : 2-(N-モルホリノ) エタンスルホン酸, (□, ■) HEPES : N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N'-2-エタンスルホン酸

volume 付近にのみ活性が検出され、高濃度の塩や表面活性剤あるいはホスホリパーゼ処理によっても分子量に変化を受けなかったが、ヒドロキシアパタイトからの溶出後は、主活性がペルオキシダーゼの溶出部位に一致して認められ、その分子量はAと同様49,000であった。シ₃糖密度勾配遠心法では、単一活性ピークを示しその沈降係数は3.6Sで Martin ら¹⁸⁾の方法に従って分子量を算定すると43,000となった(図2, 3)。

次に CMP-シアル酸に対する Km 値は、酵素Aが 0.059 mM, 酵素Bが 0.097 mM, また至適 pH は、酵素Aは 6.2, 酵素Bは 6.6 であった(図4)。なお酵素Bでは 2 mM の Mn²⁺ の添加により 20% の阻害が認められたが、酵素Aは全く影響を受けなかった。

生成するシアリル結合の同定

上の酵素画分につきラクトースをアクセプターとして

表 2 生成するシアリルラクトース異性体の同定

シアリルラクトース	シアル酸転移酵素	
	A	B
	(%)	(%)
α 2→6	71	0
α 2→3	29	100

シアリルラクトースを生成させ、ペーパークロマトグラフィーによっていずれの異性体が生成されているかを調べた。その結果は表2に示す通りであって、酵素Bはα 2→3 シアリルラクトースのみを、酵素Aは主にα 2→6

表 3 シアル酸転移酵素A, Bのアクセプター特異性

アクセプター	A	B
	(%)	(%)
アシアロフェイトイン	100	100
アシアロフェイトイン (アルカリ処理)	102	15
アシアロオロソムコイド	47	16
アシアロ顎下腺ムチン		
ブタ	6	43
ウシ	2	14
アシアロオロソ-N-オクタオース	19	7
ラクト-N-テトラオース	9	3
Gal β 1→3 GalNAcol	n.d.	2
ラクトース	2	6

(n.d.: 検出不能)

ラクト-N-テトラオース, Gal β 1→3 GalNAcol, ラクトースの濃度は 200 n mol, それ以外は 100 n mol とした。

図 5 シアル酸転移酵素A, Bによりシアリル化したアシアロフェイトインのセファデックスG-25クロマトグラフィー

—●—: アルカリ処理前, ---○---: アルカリ処理後. バッファーは 0.1 M 食塩を含む 10 mM リン酸カリウムバッファー (pH 6.8) を用いた。

図6 ウシ胎仔肝, ラット肝, ヒト胎盤シアル酸転移酵素のホスホセルロースクロマトグラフィーからの溶出パターンの比較

a: ウシ胎仔肝, b: ヒト胎盤, c: ラット肝.

シアリルラクトースを生成したが、後者についてはなお少量の $\alpha 2 \rightarrow 3$ シアリルラクトース生成もみられた。以上の結果は、すなわち酵素Bはラクトース (Gal $\beta 1 \rightarrow 4$ Glc) のガラクトース残基 C-3 位に、酵素Aは C-3 位と C-6 位にシアル酸を転移する酵素画分であることを示している。

アクセプター特異性

次に酵素A, Bについてアクセプター特異性を調べ、その結果を表3にアシアロフェテインに対する活性を100として示した。酵素Aは、アシアロオロソムコイド、アルカリ処理により O-グリコシド結合糖鎖を除いたア

シアロフェテイン等 N-グリコシド結合糖鎖を有する糖蛋白にさかんにシアル酸を転移する一方、O-グリコシド結合糖鎖のみを有するアシアロ型のブタ、ウシ顆下腺ムチンに対してはほとんど活性を示さない。これに対して酵素Bは、アシアロフェテインに対する活性がアルカリ処理後大幅に低下することや、アシアロブタ顆下腺ムチンへの高い活性から O-グリコシド結合糖鎖がアクセプターと考えられる。ただし同じ O-グリコシド結合糖鎖を有するアシアロウシ顆下腺ムチンに対する活性は、ブタのその30%以下であった。これは、このムチンに大量に含まれる N-アセチルガラクトサミン残基でなく、比較的少量しかないガラクトース残基にシアル酸が転移するためと考えられる。オリゴ糖へのシアル酸転移はA, Bのいずれでも糖蛋白と比べ低い。しかし酵素AはBに比し、アシアロオロソ-N-オクタオース, ラクト-N-テトラオースに対してより高い活性を示した。

以上の結果、特にN-, O-グリコシド結合糖鎖の区別をさらに明確にする目的で、酵素反応産物についてアルカリ処理を行った。N-, O-グリコシド結合双方を有するアシアロフェテインをアクセプターとして、酵素A, Bによりシアル酸を転移させ、反応産物にアルカリ処理を加えた。酵素Aによりシアリル化したフェテインは、アルカリ処理によってもシアリル化糖は遊離せず、シアル酸が N-グリコシド型糖鎖に転移されたことが確認された。他方酵素Bでは、アルカリ処理によりシアリル化糖は完全に遊離し、シアル酸がフェテインの O-グリコシド型糖鎖に転移されたことが最終的に明確となった(図5)。

以上生成するシアリルラクトースにおけるシアリル結合の分析、アクセプター特異性、生成するシアリル化糖蛋白のアルカリ処理の結果から、酵素Aは主に N-グリコシド結合糖鎖のガラクトース残基の C-6 位に、また酵素Bは O-グリコシド結合糖鎖のガラクトース残基の C-3 位に、それぞれシアル酸を転移する酵素であることが判った。

ラット肝とヒト胎盤における類似酵素の同定

ラット肝、ヒト胎盤をウシ胎仔肝と全く同様に処理し、可溶化されたシアル酸転移酵素のホスホセルロースカラムクロマトグラフィーを行った(図6)。アシアロフェテインをアクセプターに用いて、ラット肝は単一の活性ピークを示し、その溶出位置はウシ胎仔肝のピークAに一致した。これに対しヒト胎盤では、酵素の溶出が上のウシ胎仔肝と同じく二相性であり、溶出位置は後のピークはウシ胎仔肝の後のピーク(ピークB)と同一部位に溶出されたが、前のピークの溶出位置は上のピークAよりやや遅れていた。ラット肝の酵素についてはその主成分が Gal $\beta 1 \rightarrow 4$ GlcNAc $\alpha 2 \rightarrow 6$ シアル酸転移酵素であることがすでに宮城³⁾により精製されて明らかとなっており、ウシ胎仔肝のピークAと溶出位置が同じで

表 4 ラット肝, ヒト胎盤シアル酸転移酵素のアクセプター特異性

アクセプター	ラット肝 酵 素	ヒト胎盤 酵 素
	(%)	(%)
アシアロフェトイン	100	100
アシアロオロソムコイド	66	15
アシアロ顎下腺ムチン		
ブ タ	16	44
ウ シ	11	26

アクセプター濃度はすべて 100 n mol とした.

表 5 ウシ胎仔肝シアル酸転移酵素の性状のまとめ

	A	B
結 合 アクセプター	シアルル $\alpha 2 \rightarrow 6$ N-グリコシド 結合糖鎖の Gal $\beta 1 \rightarrow 4$ GlcNAc	シアルル $\alpha 2 \rightarrow 3$ O-グリコシド 結合糖鎖の Gal $\beta 1 \rightarrow 3$ GalNAc
ホスホセルロース カラムからの溶出 食塩濃度(M)	0.2	0.5
分 子 量 (ゲルろ過法)	49,000	49,000
Km (CMP-シアル 酸に対する)(mM)	0.059	0.097
至 適 pH	6.2	6.6

図 7 ヒト胎盤シアル酸転移酵素によりシアル化したアシアロフェトインのセファデックスG-25クロマトグラフィー

—●—: アルカリ処理前, ---○---: アルカリ処理後. バッファーは 0.1 M 食塩を含む 10 mM リン酸カリウムバッファー (pH 6.8) を用いた.

図 8 3'-MeDAB-ラット肝癌シアル酸転移酵素のホスホセルロースクロマトグラフィーからの溶出パターン

アクセプターとしてアシアロフェトインを用いた. 3'-MeDAB: 3'-メチルシアミノアゾベンゼン.

あったのはうなづける成績である. あらためて調べたホスホセルロース画分でのアクセプター特異性も, ウシ胎仔肝のA酵素によく類似していた(表4). 次に, ヒト胎盤酵素の場合は, ウシ胎仔肝B酵素とホスホセルロースカラムからの溶出態度が類似している第二のピークについてその性状をピークBと比べた. 生成するシアルル結合をラクトースをアクセプターとして調べたところ $\alpha 2 \rightarrow 6$ および $\alpha 2 \rightarrow 3$ 異性体の生成比はそれぞれ 4%, 96%であった. また, アクセプター特異性は, アシアロフ

ェトインのほか, 顎下腺ムチンに対し特に活性が高かった(表4). さらに, この酵素によりアシアロフェトインをシアル化した生成物についてアルカリ処理を行ったところ, ウシ胎仔肝酵素と同様シアルル化糖が完全に遊離された(図7). 以上の結果は, このヒト胎盤酵素がO-グリコシド結合糖鎖のガラクトース残基のC-3位にシアル酸を転移するウシ胎仔肝のB酵素とおそらく同一酵素であることを示している. またこれらのことから, 酵素源が大幅に異なるときも触媒能を同じくするシアル酸転移酵素は, ホスホセルロースカラムから同じ位置に溶出されるものと推定され, これは今後新しい臓器のシアル酸転移酵素を同定する場合に有力な手掛かりとなろう.

ラット肝癌における $\alpha 2 \rightarrow 3$ シアル酸転移酵素の調査
そこで 3'-MeDAB で誘発したラット肝癌において癌

化に伴って Gal β 1 $\rightarrow$ 3 GalNAc α 2 $\rightarrow$ 3 シアル酸転移酵素が出現したか否かをホスホセルロースクロマトグラフィーを用いて調べた。ウシ胎仔肝と同様の方法で可溶化、調製した肝癌酵素画分をホスホセルロースクロマトグラフィーにかけたところ、図8に示すように0.2 M 食塩濃度付近に溶出される単一の活性ピークを認めたのみで、0.5 M 食塩濃度付近には活性は全く検出されなかった。認められたピークについてはカラムから溶出される塩濃度だけでなく、生成するシアル結合、アクセプター特異性等もラット肝酵素と同様で Gal β 1 $\rightarrow$ 4 GlcNAc α 2 $\rightarrow$ 6 酵素であった。これらの結果は肝の癌化によって Gal β 1 $\rightarrow$ 3 GalNAc α 2 $\rightarrow$ 3 シアル酸転移酵素の新たな出現はみられないことを推定させる。

考 察

ウシ胎仔肝からホスホセルロースクロマトグラフィーによって2種類のシアル酸転移酵素を分離した。ピークAの示す Gal β 1 $\rightarrow$ 4 GlcNAc α 2 $\rightarrow$ 6 シアル酸転移酵素と、ピークBの示す Gal β 1 $\rightarrow$ 3 GalNAc α 2 $\rightarrow$ 3 シアル酸転移酵素とである。両者のおおよその性状と相互の異同とを表5にまとめた。

A画分酵素については、しかしながら、問題点が残されている。微量ではあるがこの画分が α 2 $\rightarrow$ 3 シアルラクトースを生成した点である。ホスホセルロースカラムで対称的なピークを与え、これまでのところ各種クロマトグラフィーで両活性が分離しないところから、1種類の酵素が例外的に2種類の結合を生成する可能性も完全には否定できないが、それでもなお α 2 $\rightarrow$ 3 酵素の混在を予想するのがより妥当な考え方であろう。この際、反応産物がアルカリ処理によって全くシアル化糖を遊離しないところからO-グリコシド結合糖鎖のシアル化は否定できるので、O-グリコシド結合糖鎖を α 2 $\rightarrow$ 3 結合でシアル化するB画分の混在は考えられない。N-グリコシド結合糖鎖に α 2 $\rightarrow$ 3 でシアル酸を転移するものとしては、Paulson ら¹⁹⁾がラット肝に見出した Gal β 1 $\rightarrow$ 3 (4) GlcNAc α 2 $\rightarrow$ 3 シアル酸転移酵素があり、この酵素のA酵素との共存は、A酵素がラクト-N-テトラオースに有意の活性を示したことからも支持される。ただ Priels ら²⁰⁾が1種類のフコース転移酵素が、異なる2種類の結合を生成する例を報告しており、最終的な結論を得る前に、A酵素の精製をさらに進める必要がある。また、Van den Eijnden ら²¹⁾がウシ胎仔肝にその存在を示唆している Gal β 1 $\rightarrow$ 4 GlcNAc α 2 $\rightarrow$ 3 シアル酸転移酵素との異同も、今後明らかにすべき問題である。

B画分酵素はほぼ Gal β 1 $\rightarrow$ 3 GalNAc α 2 $\rightarrow$ 3 シアル酸転移酵素と決定されたが、ホスホセルロースカラムでやや不均一な活性パターンを示した。その原因のひとつとして、この画分の分子量における不均一性が考えられ

る。B酵素はより比活性の高い精製標品においてもゲルろ過で二相性を示したが、その主活性部分のみかけの分子量は49,000であり、シ、糖密度勾配遠心法ではみかけの分子量43,000の画分のみが認められたので、これが活性最小単位であると思われる。ブタ顎下腺から同じ触媒能を持つと推定される酵素が精製²²⁾され、やはり高分子型を有して膜リン脂質等との結合が示唆されているが、このB画分酵素の分子量はホスホリパーゼ処理によっても変化を受けなかった。

ウシ胎仔肝酵素の分離に使用したホスホセルロースクロマトグラフィーを、ラット肝およびヒト胎盤酵素の解析に応用したところ、ラット肝にはウシ胎仔肝ピークAと類似の α 2 $\rightarrow$ 6 酵素、ヒト胎盤にはピークBと同一の α 2 $\rightarrow$ 3 酵素が存在することがわかった。この判断は生成するシアル結合やアクセプター特異性の検索結果をまっとう下されたもので、さらにこの判断から同一触媒能をもつシアル酸転移酵素は、種や臓器を越えて同一分子種であるという可能性が推定される。しかし最終的な結論を下す前にさらに多くの酵素例の検索が必要であろう。

本研究の最終目的は、シアル酸転移酵素の癌性変化の解明にある。そこでウシ胎仔肝の調査に用いたホスホセルロースカラムクロマトグラフィーにより α 2 $\rightarrow$ 3 酵素をラット原発性肝癌に追求したが、Gal β 1 $\rightarrow$ 3 GalNAc α 2 $\rightarrow$ 3 シアル酸転移酵素の出現を証明することはできなかった。これ以外の α 2 $\rightarrow$ 3 酵素の動向をも明らかにしたいところであるが、そのためにまずウシ胎仔肝A画分酵素に含まれ、N-グリコシド結合糖鎖に作用する α 2 $\rightarrow$ 3 酵素の完全な同定が必要である。

結 語

癌化時における細胞膜表層糖蛋白のシアル化の動態とその機構を明らかにすることを目的として、シアル化に与かるシアル酸転移酵素についての研究を行った。

ウシ胎仔肝からホスホセルロースカラムクロマトグラフィーにより2種類のシアル酸転移酵素を分離した。すなわち、細胞顆粒画分からトリトンX-100で高収率に可溶化された活性画分はアシアロフェイトインをアクセプターとして、ホスホセルロースカラムにより2種類のピーク(A, B)に分かれ、生成するシアルラクトースの異性体や、アクセプター特異性の調査から、それぞれ Gal β 1 $\rightarrow$ 4 GlcNAc α 2 $\rightarrow$ 6 酵素、Gal β 1 $\rightarrow$ 3 GalNAc α 2 $\rightarrow$ 3 酵素と 同定された。ピークAは再クロマト後もなお微量のN-グリコシド結合糖鎖に作用する α 2 $\rightarrow$ 3 酵素活性を含んでいるが、現在までは主成分である α 2 $\rightarrow$ 6 酵素からのクロマトグラフィーによる分離に成功していない。ホスホセルロースカラムクロマトグラフィーを同様条件下で施行することにより、ラット肝に Gal β 1 $\rightarrow$ 4

GlcNAc α 2 $\rightarrow$ 6 酵素が存在すること、ヒト胎盤には Gal β 1 $\rightarrow$ 3 GalNAc α 2 $\rightarrow$ 3 酵素が存在することがわかった。またラット肝—肝癌系での検索で、ラット肝には癌化後においても Gal β 1 $\rightarrow$ 3 GalNAc α 2 $\rightarrow$ 3 酵素が存在しないことが推定された。

本論文の要旨の一部は、第55、第56回日本生化学会(大阪, 1982. 福岡, 1983), 第38回日本口腔科学会総会(東京, 1984)において発表した。

稿を終えるに際し、終始ご懇篤なご指導、ご校閲を賜った東北大学歯学部林 進武教授、ならびに本研究を進めるに当たり、直接のご指導を賜った東北大学抗酸菌病研究所立木 蔚教授、宮城妙子博士に心から感謝申し上げます。そして有益なご助言、ご協力をいただきました抗酸菌病研究所生化学部門、歯学部第1口腔外科学教室の方々にも深く感謝致します。

引用文献

- 1) Ambrose, E.J., James, A.M., et al.: Differences between electrical charge carried by normal and homologous tumor cells. *Nature* 177: 576-577 1956.
- 2) Warren, L., Buck, C.A., et al.: Glycopeptide changes and malignant transformation. A possible role for carbohydrate in malignant behavior. *Biochem Biophys Acta* 516: 97-127 1978.
- 3) Vilarem, M.J., Jouanneau, J., et al.: Difference in sialic acid contents of low cancer cells, high cancer cells and normal mouse lung counterparts. *Biochem Biophys Res Commun* 98: 7-14 1981.
- 4) Hagopian, A. and Eylar, E.H.: Glycoprotein biosynthesis: Studies on the receptor specificity of the polypeptidyl: N-acetylglucosaminyltransferase from bovine submaxillary glands. *Arch Biochem Biophys* 129: 422-433 1968.
- 5) Miyagi, T. and Tsuiki, S.: Purification and characterization of β -galactoside (α 2 $\rightarrow$ 6) sialyltransferase from rat liver and hepatoma. *Eur J Biochem* 126: 253-261 1982.
- 6) Miyagi, T. and Tsuiki, S.: Studies on UDP-N-acetylglucosamine: α -mannoside β -N-acetylglucosaminyltransferase of rat liver and hepatomas. *Biochem Biophys Acta* 661: 148-157 1981.
- 7) Miriam de Salegui, Halina Plonska: Preparation and properties of porcine submaxillary mucins. *Arch Biochem Biophys* 129: 49-56 1969.
- 8) Tsuiki, S., Hashimoto, Y., et al.: Comparison of procedures for the isolation of bovine submaxillary mucin. *J Biol Chem* 236: 2172-2178 1961.
- 9) Kikuchi, K. and Tsuiki, S.: Purification and properties of UDP-N-acetylglucosamine 2'-epimerase from rat liver. *Biochem Biophys Acta* 327: 193-206 1973.
- 10) Spiro, R.G.: Studies on fetuin, a glycoprotein of fetal serum. *J Biol Chem* 235: 2860-2869 1960.
- 11) Carlson, D.M.: Oligosaccharides isolated from pig submaxillary mucin. *J Biol Chem* 241: 2984-2986 1966.
- 12) Spiro, R.G. and Bhoyroo, V.D.: Structure of the O-glycosidically linked carbohydrate units of fetuin. *J Biol Chem* 249: 5704-5717 1974.
- 13) Warren, L.: The thiobarbituric acid assay of sialic acids. *J Biol Chem* 234: 1971-1975 1974.
- 14) Bartholomew, B.A., Jourdain, G.W., et al.: Transfer of sialic acid to glycoproteins by a sialyltransferase from colostrum. *J Biol Chem* 248: 5751-5762 1973.
- 15) Jourdain, G.W., Dean, L., et al.: A periodate-resorcinol method for the quantitative estimation of free sialic acids and their glycosides. *J Biol Chem* 246: 430-435 1971.
- 16) Trevelyan, W.E., Procter, D.P., et al.: Detection of sugars on paper chromatograms. *Nature* 166: 444-445 1950.
- 17) Andrews, P.: Estimation of the molecular weights of proteins by Sephadex gel-filtration. *Biochem J* 91: 222-233 1964.
- 18) Martin, R.G. and Ames, B.N.: A method for determining the sedimentation behavior of enzymes: Application to protein mixtures. *J Biol Chem* 236: 1372-1379 1961.
- 19) Weinstein, J., de Souza-e-Silva, U., et al.: Sialylation of glycoprotein oligosaccharides N-linked to asparagine. *J Biol Chem* 257: 13845-14853 1982.
- 20) Prieels, J.P., Monnom, D., et al.: Co-purification of the Lewis blood group N-acetylglucosaminide α 1 $\rightarrow$ 4 fucosyltransferase and an N-acetylglucosaminide α 1 $\rightarrow$ 3 fucosyltransferase from human milk. *J Biol Chem* 256: 10456-10463 1981.
- 21) Van den Eijnden, D.H. and Schiphorst, W.E.C.M.: Detection of β -galactosyl (1 $\rightarrow$ 4) N-acetylglucosaminide α (2 $\rightarrow$ 3) sialyltransferase activity in fetal calf liver and other tissues. *J Biol Chem* 256: 3156-3162 1981.
- 22) Sadler, J.E., Rearick, J.I., et al.: Purification to homogeneity of a β -galactoside α 2 $\rightarrow$ 3 sialyltransferase and partial purification of an α -N-acetylglucosaminide α 2 $\rightarrow$ 6 sialyltransferase from porcine submaxillary glands. *J Biol Chem* 254: 4434-4443 1979.