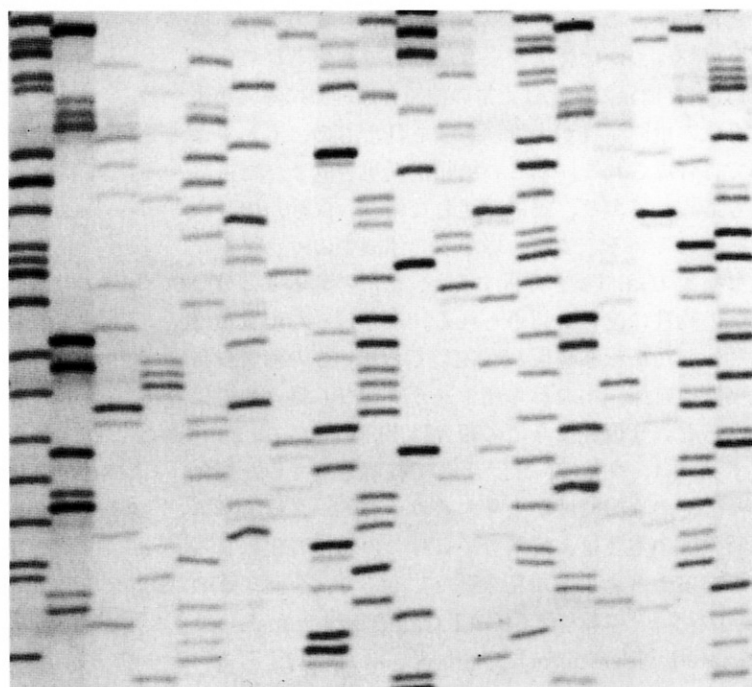


# GAT(癌関連ガラクトース転移酵素)の 遺伝子解析

Genetic analysis of  
GAT(Galactosyltransferase Associated with Tumor)

植嶋孝夫  
植村盛人  
感材生産本部  
第3開発センター



Analysis of DNA sequence

## Abstract:

A novel cancer-associated antigen, Galactosyltransferase Associated with Tumor (GAT) is presented here.

Galactosyltransferase isoenzyme II (GT-II) has been reported as a useful tumor marker for serological diagnostics previously, its characteristics had been unclear. A number of monoclonal antibodies to purified galactosyltransferase (Gal-T) were successfully prepared, and one of their monoclonal antibodies, MAb8513, was proven to be specific to GAT. Furthermore, six cDNA clones were isolated by immunoscreening of the MAb's to GAT from a newly established cDNA library. One of their clones, UG-8601, showed to encode a gene corresponding to a Gal-T. In addition, the protein expressed by UG-8601 was specifically recognized by only MAb8513 and MAb8628.

These results suggest that UG-8601 might be a tumor-associated gene derived from a Gal-T gene.

Uejima, Takao  
Uemura, Morito  
Development Center Section No.3  
Photographic Products  
Manufacturing Headquarters

# 1

## まえがき

近年の癌研究の進歩には目をみはるものがあるが、癌死亡数は依然として年々増加しており、また進行癌に対する効果的な治療が存在しない現在、予防と検診の重要性は増す一方である。現在、癌検診は主に画像診断と腫瘍マーカーによるものであるが、すでに临床上用いられている腫瘍マーカーは診断効果の点で十分満足のいくものとは言えず、より有効なマーカーの開発が待たれている。

細胞の癌化にともない、その糖鎖構造が劇的に変化することにより、これらは腫瘍関連抗原としての意義を持ち、既にいくつかは腫瘍マーカーとして利用されている。<sup>1)</sup> こういった糖鎖の変化は正常の糖鎖合成経路に障害が生じ、合成の中間産物が大量に蓄積されたもの、もしくは正常では合成されない新しい糖鎖が新規合成されたものだと考えられており、癌に関連した糖鎖合成経路の存在が示唆されている。また、癌患者の体液中のガラクトース転移酵素 (Gal-T) を分析すると、正常の酵素とは分子量などの物性に違いが認められる。こういった現象より、癌に関連した糖転移酵素が存在しており、この酵素自身が腫瘍関連抗原、すなわち癌マーカーとなり得るのではないか、という仮説よりこの研究は出発している。

まず我々は、長年GT-II<sup>2,3)</sup>として提唱されていた癌化により、その血中濃度が上昇するガラクトース転移酵素の癌特異性の本質は、酵素分子自身の癌性変化によるものであることを示す知見を得た。そこで、今回、この癌関連ガラクトース転移酵素(GAT:Galactosyl-transferase Associated with Tumor)を精製し、これに対するモノクローナル抗体(MAb: Monoclonal Antibody)を作成<sup>4)</sup>、またこの抗体を用いたスクリーニングによりGATのcDNA (complementary DNA)のクローニングに成功したので<sup>5)</sup>一連の研究の概要と今後の発展について紹介する。

# 2

## GATの精製

各種培養細胞株を調べた結果、卵巣癌由来の培養細胞株である、RMG-1細胞<sup>6)</sup>がその培養上清中にGATを分泌していることが分かった。この上清より常法に従い2段階の $\alpha$ -ラクトアルブミン アフィニティーカラムクロマトグラフィーを行なうことによって、ガラクトース転移酵素画分を精製したところ、SDS-PAGE後の銀染色で、分子量約50,000のほぼ単一のバンドを得た (Fig.1)。また、癌患者腹水中にも、GAT及びGAT様分子の存在を認めたので、前例と同様に精製したGATの部分精製を行なった。

RMG-1培養上清より精製したGAT、腹水より精製したGAT、及び、正常人血清より精製したGal-Tを、この

後の基礎的解析や免疫及びモノクローナル抗体のスクリーニングに用いた。なお、これらのタンパク質がガラクトース転移活性をもつことは、UDP- [<sup>3</sup>H] Galの放射性の卵白アルブミンへの転移量を測定することによって確認してある。

# 3 抗GATモノクローナル抗体の作成とその分類

Balb/cマウスに腹水より精製したGATをフロント完全アジュバンドとともに静注することによって免疫し、それより摘出した脾臓細胞とマウスミエローマ細胞をポリエチレングリコールによって融合させた。HAT培地による選択の後Gal-Tに対して反応性をもつ抗体を産生するクローンをELISAによって検出、限界希釈法によってクローン化し、ハイブリドーマを樹立した。マウス腹くにハイブリドーマを注射し、腹水を回収することによって得た抗体を、硫酸アンモニウムによる塩析とFast Protein Liquid Chromatography (FPLC) によって精製した。

今回得た9種のモノクローナル抗体を、抗原エpiteープの違いによってa, b, cの3種に分類した (各々のグループ中の抗体間では競争阻害がかかる) (Table 1)。

また、MAb7907を除く8種はその認識する分子がガラクトース転移活性をもつことを、各抗体を結合させたGF-2000ゲルを用いて酵素活性を測定することによって確認した (Table 1)。

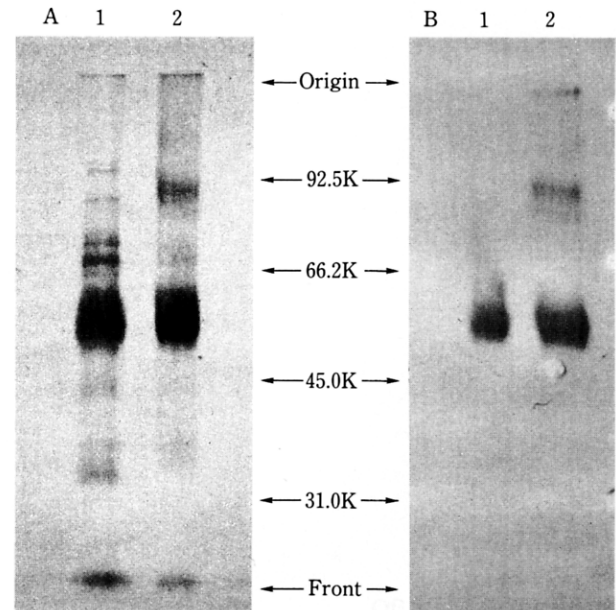


Fig. 1 SDS-PAGE of purified GAT from tumor effusion fluid and immunostaining with MAb 8628

A: Silver staining after SDS-PAGE  
B: Immunostaining with MAb 8628

Lane 1: Treated without 2-ME  
Lane 2: Treated with 2-ME

Table 1 Characterization of anti-GAT monoclonal antibodies

MAB	4880	8507	8628	7907	8513	8677	8611	8913	8919
Subclass	IgG1	IgG1	IgG1	IgM	IgM	IgG1	IgG1	IgG2b	IgG1
Enzyme activity	+++	++	+++	-	+	+	++	+	+++
Category	a	a	a	b	b	b	c	c	c

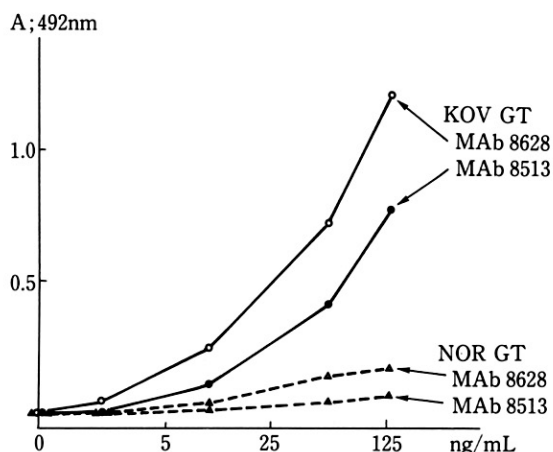


Fig.2 Affinity of MAb to GAT and normal GT

ELISA of KOV GT and normal GT with MAb 8628 and MAb 8513. purified GAT from tumor effusion fluid or Gal-T of normal serum were used for coating antigen.

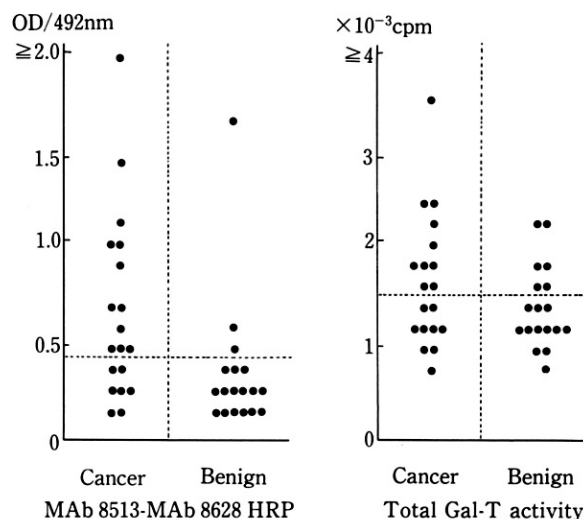


Fig.3 Serological diagnosis by anti-GAT monoclonal antibodies and total Gal-T activity

サンドイッチ法によってGATの測定を行なうため、各抗体のGATに対する親和性及び特異性（正常人由来の酵素との交差反応性）を調べ、固相抗体としてMAb 8513、標識抗体としてMAb8628を採用した。

## 4

### GATの基礎的解析

Fig.2とFig.3に示すようにMAb8513及び、MAb8628を用いたELISA法による測定では、癌患者由来のGATと正常人由来の酵素との間に抗体の反応性の明かな違いが認められる。またこれらの抗体がガラクトース転移活性をもつ分子を認識していることもまず間違いない。

SDS-PAGE後のWestern blottingの結果が示すように、抗GATモノクローナル抗体は分子量約50,000の分子、すなわち精製したGATを認識するのだが (Fig.1)、これは一般に言われている正常人由来の酵素と同一のサイズである。また精製したGATの等電点電気泳動を行なうとpH4.7からpH6.0の間に数本のバンドを検出し、しかも抗GATモノクローナル抗体によるイムノステインによっても数本のバンドが検出される (Fig.4)。試料をシアリダーゼ処理しても、これらのバンドは塩基性側に移動するだけで

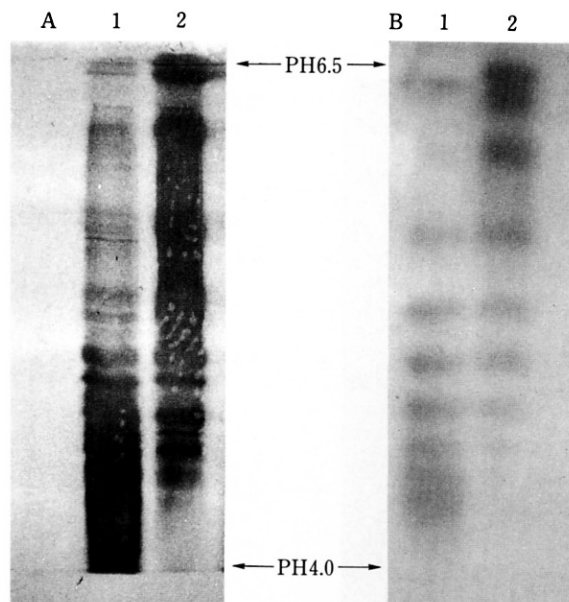


Fig.4 I.E.F. of purified GAT and immunostaining with MAb 8628

A: Silver staining after I.E.F  
 B: Immunostaining with MAb 8628  
 Lane 1: Non-treated  
 Lane 2: Treated with sialidase

決して一本にはならず、また、抗体の反応性に変化は見られない。

このようなガラクトース転移酵素の等電点による多様性は正常人由来の酵素についても言われているうえ、抗体がこれら一連のタンパク質を同様に認識しているようであり、この結果もGAT及び抗体の癌関連性を明確に示すものではない。

## 5 分子クローニングよりのアプローチ

ガラクトース転移酵素は非常に失活しやすく、RMG-1細胞が比較的少量に産生しているといっても、ごく微量しか得ることができない。また等電点電気泳動のパターンからもわかるようにGATは多様性をもつ分子であるため、完全に単一のタンパク質を用いない限りGATの癌特異性が何によるものかを明らかにすることはできない。

そこで我々はcDNA (complementary DNA) クローニングの技術を導入し、モノクローナル抗体をプローブとしたスクリーニングを試みた。cDNAが得られれば、タンパク質の一次構造の情報を得たり、完全に単一のタンパク質を発現して解析できるだけでなく、そのタンパク質に自由に変異を起こすといったことも可能となり、GATと他のガラクトース転移酵素との関係を明確にできると考えた。

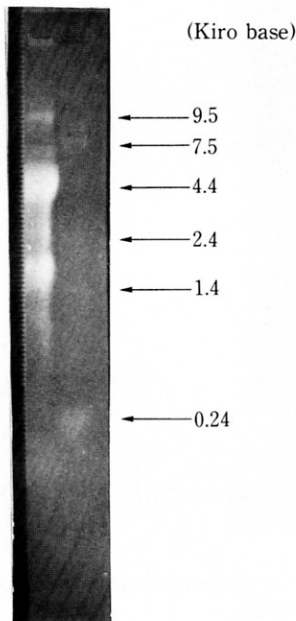


Fig.5 Total RNA extracted from RMG-1 cell line  
Electrophoresis of RNA through gels containing formaldehyde

## 6 RMG-1由来cDNAライブラリーの作成とcDNAクローニング

RMG-1よりLiCl-urea bufferを用いた塩析法<sup>7)</sup>を用いてRNAを抽出した。電気泳動のリボゾームRNAのパターン (Fig.5) 及び $\beta$ -actinのcDNAをプローブにしたNorthern blottingよりRNAの分解がほとんどないことを確認した。次にoligo dTセルロースカラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーによって、poly (A)<sup>+</sup>RNA (mRNA) を精製しこれをcDNAライブラリーの合成に用いた。10本の150mlプラスチックフラスコで培養したRMG-1細胞より8.1mgのRNAを得て、poly (A)<sup>+</sup>RNAとして150 $\mu$ gを精製した。

cDNAの合成はoligo dTをプライマーに用いて常法に従って行なった。4.0 $\mu$ gのpoly (A)<sup>+</sup>RNAより3.1 $\mu$ gのcDNAを合成し (Fig.6)、EcoRIリンカーの連結、セファロースCL-4Bカラムによるゲルろ過によってサイズ分画した後 (Fig.6)、 $\lambda$ ZAPベクター (Stratagene社) に挿入し、約 $8.5 \times 10^5$  p.f.u. (ブランク形成能) のcDNAライブラリーを作成した。

Young and Davisの方法<sup>8)</sup>を用いて抗GATモノクローナル抗体をプローブしたcDNAクローニングを行なった。MAb 8513とMAb8628を含む9種のモノクローナル抗体を混合してスクリーニングを行い、作成したRMG-1由来cDNAライブラリーより6つのcDNAクローン (UG-8601, UG-

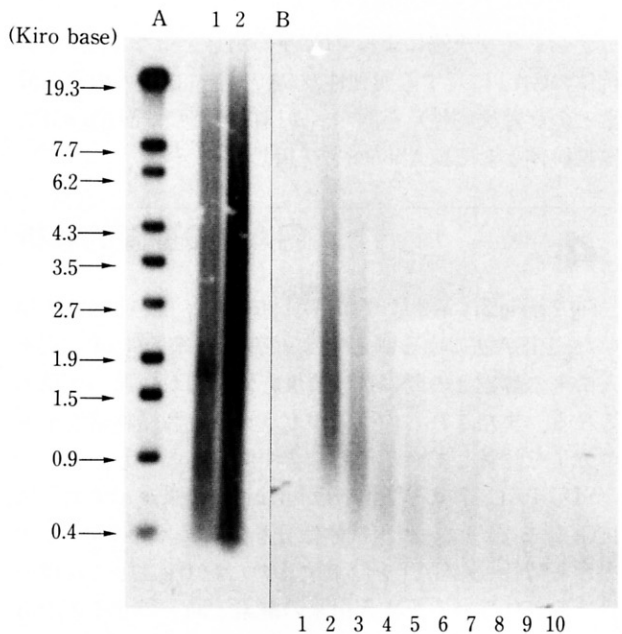


Fig.6 Synthesized cDNA and its size fractionation

A:1. Synthesized 1st-strand cDNA  
2. Synthesized 2nd-strand cDNA  
B: Gel filtration with Sepharose CL-4B

7902, UG-7903, UG-7904, UG-7905, UG-4806)を得た(Fig.7)。

## 7

### cDNAクローンの解析

各クローンを、in vivo excisionによってλDNAより Bluescript (プラスミド) の形で切り出し、精製したプラスミドをEcoRI消化することによって、cDNAの長さを決めた (table 2)。

Northern blottingは、RMG-1細胞より抽出したRNAをホルムアルデヒドを含むゲルで電気泳動することによって行ない、各cDNAをマルチプライム法によって<sup>32</sup>P-CTPでラベルしたものをプローブとして用いた (Fig.8)。UG-7902,UG-7903とUG-7904は2,400ベースのバンドが共通していた。またUG-8601,UG-7905とUG-4806は4,200ベースのバンドが共通している (table 2)。すでにクローニ

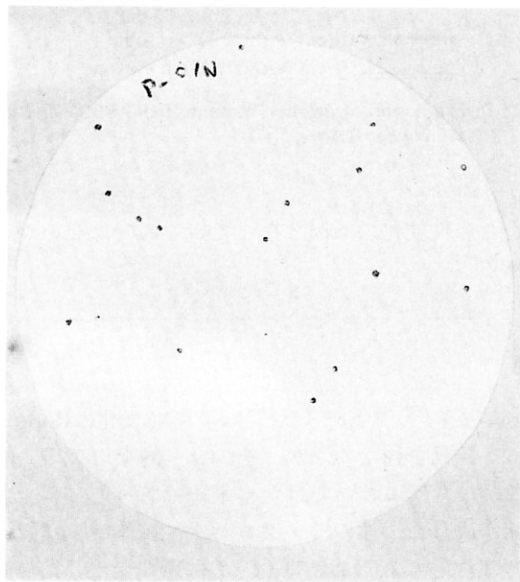


Fig.7 2nd screening of UG-7902 by immunostaining

Fusion protein of β-gal and inserted cDNA was expressed and immunostained with anti-GAT monoclonal antibodies. Konica Immunostain HRP kit was used for color development.

ングされてるヒト乳汁中のβ1-4ガラクトース転移酵素 (HM-GT:human milk-Galactose Transferase) <sup>9)</sup> の mRNAの長さも4,200ベースであり、この4つのcDNAの間に相同性が予想された。

そこで相互のクローンの相同性をハイブリダイゼーションによって確認した。<sup>32</sup>Pでラベルした各cDNAを用いたドットハイブリダイゼーションによってcDNA間の相同性を見たところ、おどろくべきことにどのcDNAの間にも相同性は見られず、唯一UG-8601だけがHM-GTのcDNAと強い相同性を示した (Fig.9)。また、このcDNAが挿入されているBluescriptがlac Zプロモーターを持っているので、β-ガラクトシダーゼとの融合タンパク質を誘導し、発現したタンパク質と各モノクローナル抗体との反応性をニトロセルロースフィルター上でのドットブロッキングやELISAプレートでのサンドイッチ法を用いて調べ

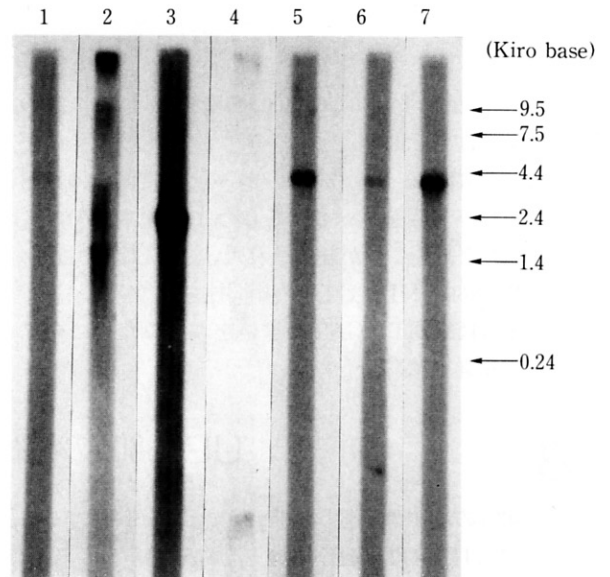


Fig.8 Northern blotting of RMG-1 total RNA

Electrophoresis of RNA through gels containing formaldehyde was transferred to nylon membrane.

Each radiolabeled cDNA was used as probe.

Lane 1:UG-8601 Lane 2:UG-7902 Lane 3:UG-7903  
Lane 4:UG-7905 Lane 5:UG-7905 Lane 6:UG 4806  
Lane 7:HM-GT

Table 2 Characterization of cDNA clones

Clones	UG-8601	UG-7902	UG-7903	UG-7904	UG-7905	UG-4806
Size (base)	450	2300	2900	400	2200	2400
Total size (base)	4200	1400 2400 3600	2400 3200	2400	4200	4200
MAb	8628 8513	7907	7907	7907	7907	4880

Size;The size of cloned cDNA

Total size;The size of mRNA that was estimated by Northern blotting (Fig 8)

MAB;MAb that interacted with the E.coli. expressed protein

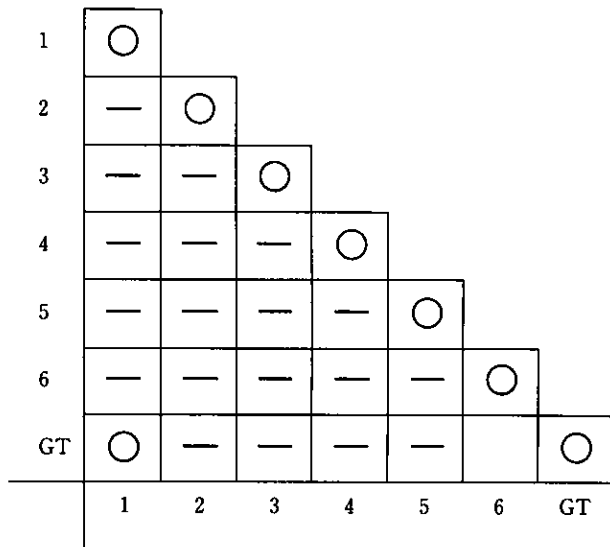


Fig. 9 Homogeneity between six cDNA clones and HM-GT cDNA

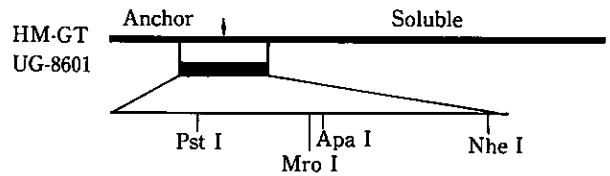


Fig. 10 Restriction map of UG-8601 and the relationship between HM-GT and UG-8601

↓; Cleavage site between anchor and soluble form

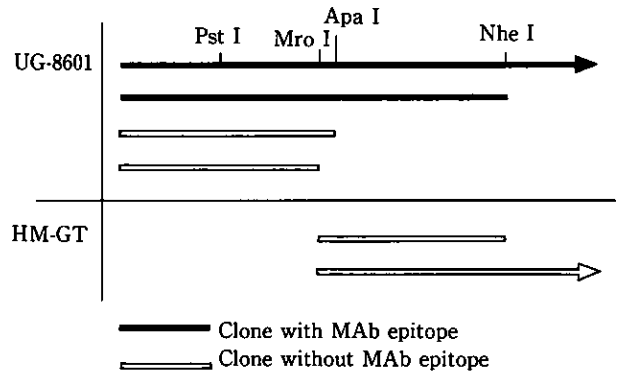


Fig. 11 Expression of deletion mutant of UG-8601 and its affinity for MAb

た。Table 2に示すようにUG-8601の産物だけが、2つの抗体との反応性を示した。

GATを認識する2つのモノクローナル抗体との反応性をもつタンパク質をコードすることより、UG-8601はGATの遺伝子であることが証明された。また先ほども述べたようにUG-8601はHM-GTとの相同性をもつクローンである。既知のHM-GTとGATの違いを調べるためこのクローンをより詳細に解析した。

## 8

### UG-8601の解析

UG-8601の制限酵素地図をFig.10に示す。5'末端から約250ベースはHM-GTのcDNAの上流約200ベースから約450ベースの部分と一致した。またUG-8601の塩基配列をSanger法によって調べたところHM-GTとほぼ一致した。

UG-8601を下流(3'方向)より欠失させ、その産物のサンドイッチ法による抗体との反応性を調べたところ、NheIサイトより上流を発現させたものは、MAb8513とMAb8628に反応するが、Apa IやMro Iより上流(HM-GTのanchor部分に相当する)を発現させても2つの抗体は反応しない(Fig.11)。すなわちGATの抗原決定部位はApa IとNhe Iの間、すなわちHM-GTが生体膜から切り出されて体液中に存在する可溶部分に相当する部分に存在する。しかしHM-GTのcDNAのMro Iより下流を(可溶部分) frameを合わせて、Bluescriptに挿入しタンパク質を発現させてもその産物と抗GATモノクローナル抗体との反応性はまったく見られない。

この結果よりほとんど同一と思われるこのcDNAの間に微小な違い(たとえばpoint mutationなど)が存在しておりその違いが抗GATモノクローナル抗体の抗原決定部位、

## 9

### 考察

癌化によるガラクトース転移酵素の物性変化はPodolskyによって発見されたのだが、その分子的な(アミノ酸レベルでの)背景については全く未知であった。

今回作成した一連のモノクローナル抗体中、a群及びb群に含まれるもの(Table 1)は、この癌性変化した酵素分子(GAT)を特異的に認識しているようであり、特にMAb8513とMAb8628HRPを用いたサンドイッチ法による血清診断は擬陽性がほとんどでない優秀な癌診断薬だと言える(Fig.3)。(一時、血清中の全ガラクトース転移酵素量が癌マーカーになると言われたが、これは擬陽性の非常に高いものであった)

しかし、実際どの様な変化が起きているのか、また、酵素としての特異性にまで変化がおきているのか、といったことは抗体だけを用いた解析では答えを得ることができなかった。

RMG-1由来cDNAライブラリーよりクローニングしたcDNAクローン、UG-8601の解析によって、GATの実体の一部を明らかにすることができた。すなわち、既知のHM-GTの遺伝子に変異がおきて(もしくは別の遺伝子座にGATの遺伝子が存在して)、アミノ酸レベルでの

変化が発生している可能性が考えられる。この変化が酵素活性などにどの様に影響しているかは、全長のcDNAをクローニングし、発現してみないと分からないが、血液型抗原の合成酵素であるN-アセチルガラクトサミン転移酵素と、 $\alpha$ 1-3ガラクトース転移酵素の違いが、たった4つのアミノ酸によるといった報告<sup>10)</sup>があり、GATの基質特異性も癌化による糖鎖構造の変化との関係で大いに興味をもたれる。

最後に、この研究を進めるにあたりRMG-1細胞を提供くださった慶応大学、野沢先生及び学問的また技術的なご指導をいただいた慶応大学、成松先生に（共同研究）感謝いたします。

●参考文献

- 1) S.Hakomori : Cancer Res.,**45**,2405-2414(1985)
- 2) M.Weiser, et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA,**73**,1319-1332 (1976)
- 3) M. Uemura, et al. : Cancer Res.,**48**,5325-5334.(1988)
- 4) M. Uemura, et al. : 投稿中
- 6) S.Nozaawa, et al. : Hum.Cell,**1**,426-434(1988)
- 7) Sakai, et al. : Genomics,**5**,309(1989)
- 8) R.A.Young,R.W.Davis : Proc.Natl.Acad.Sci.USA, **80**,1194(1983)
- 9) H.Narimatu : 投稿中
- 10) F.Yamamoto, et al. : Nature,**345**,229(1990)