

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 笹 井 研

糖タンパク質の糖鎖修飾はゴルジ体で行われるが、糖鎖修飾酵素関連分子がゴルジ体に局在する機構は明らかにされていない。本研究では、糖蛋白質分泌の重要な過程である糖鎖修飾機構を理解することを目的に、ヒト N-アセチルグルコサミン転移酵素 V (GlcNAcT-V) について、酵素活性発現に必要な領域の同定とゴルジ体に局在する機構の解明を行ったものである。

第一章では GlcNAcT-V の酵素活性発現に必要な領域の同定を行った。ヒト GlcNAcT-V は 741 アミノ酸からなる糖タンパク質で細胞質領域、膜貫通領域、幹領域および触媒部位からなる。まず GlcNAcT-V cDNA を同酵素活性を有さない COS-1 細胞に一過性に遺伝子導入する系を用いて、酵素活性発現に必要な領域の同定を行った。C 末端側からの欠失変異体を数種作成し解析を行ったところ、わずか 12 アミノ酸を欠いた変異型で活性が消失した。一方、N 末端から 187 アミノ酸を欠く変異体は活性を有していたが、242 アミノ酸を欠いた変異体では活性が認められなかった。従って、ヒト GlcNAcT-V の酵素活性発現には、188 番目から 741 番目の領域が必要であることが明らかになった。さて、ヒト GlcNAcT-V には 6 カ所の N 型糖鎖付加可能部位が存在するが、ツニカマイシン存在下で GlcNAcT-V を発現させ解析した結果、ヒト GlcNAcT-V には N 型糖鎖が少なくとも 1 本以上付加されていること、活性発現に N 型糖鎖は関与していないことが証明された。

第二章では GlcNAcT-V のゴルジ体局在に関わる領域の同定を行った。野生型 GlcNAcT-V および N 末端 (45-187 アミノ酸) 欠損変異型 (GlcNAcT-VD1) を COS-1 細胞で発現させ、細胞懸濁液を超遠心法により、膜画分と可溶性画分とに分画し酵素活性を測定したところ、野生型の活性は膜画分に存在したのに対し、GlcNAcT-VD1 は可溶性画分にも高度な酵素活性が認められた。また、培養上清中に現れる酵素活性と、細胞内に留まる酵素活性の比を検討したところ、野生型ではほぼ 1 対 1 であったものが、GlcNAcT-VD1 では培養上清中に細胞内の約 10 倍の酵素活性がみられた。つまり、45 番目から 187 番目のアミノ酸の欠失によりゴルジ体に留まれなくなったことを示している。免疫染色法により細胞内局在を調べたところ、GlcNAcT-V はゴルジ体に局在したのに対し GlcNAcT-VD1 ではその局在は見られず、45 番目から 187 番目の領域が GlcNAcT-V のゴルジ体局在に必要な部位であると結論づけられた。

第三章では GlcNAcT-V のゴルジ体局在機構の解析を行った。ゴルジ体局在領域 (45-187) を II 型膜蛋白質で細胞表面に存在する酵素である γ -glutamyltranspeptidase (γ -GTP) に挿入したキメラ分子 (γ -GTP-G) を作成し、細胞内の局在を調べたところ、ゴルジ体へと局在を変え、GlcNAcT-V 45-187 領域は、ゴルジ体局在信号になり得ることが確認された。この領域中には 4 つの Cys 残基が存在し、3 次元構造予測から、ヘリックスの一端に疎水性アミノ酸が集中するなど、分子間相互作用を予想させた。そ

ここで、45-184アミノ酸領域を用い、酵母 Two-hybrid 法により解析した結果、この領域はホモ多量体を形成しうることが分かった。また、GlcNAcT-Vはジスルフィド架橋依存的な相互作用をしているが、GlcNAcT-VD1は、多量体化能が著しく減少していた。従って、この領域を介した多量体化が、GlcNAcT-Vのゴルジ体局在機構に関与していると予想された。また、細胞表面に存在する野生型 γ -GTPは、ジスルフィド架橋依存的な多量体を形成しないのに対して、ゴルジ体に局在したキメラ分子 γ -GTP-Gは多量体化能を獲得していることも明らかになった。

従来、膜蛋白質のゴルジ体局在に関しては、細胞質領域、膜貫通領域、幹領域の全てが重要と考えられていたが、GlcNAcT-Vのゴルジ体局在に関しては、特に幹領域が重要であることが分かった。この結果は、GlcNAcT-Vが付近にある蛋白質と相互作用することにより多量体を形成し、輸送小胞への取り込みを抑えんとする「近縁蛋白質認識仮説」を支持するものである。

以上、本論文では、GlcNAcT-Vの酵素活性発現に必要な領域を決定し、ゴルジ体局在に必須の領域が存在することも発見した。これらの発見は蛋白質のゴルジ体局在機構を理解するにあたっても重要な知見で、糖鎖生物学・細胞生物学領域に貢献しているところが少なくない。よって、審査員一同は、本論分が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。