

# 論文審査の結果の要旨

氏名 山口 大介

本論文は1章（序論、材料と方法、結果、考察）構成になっており、その中で二つのテーマであるXTP3-BのERADへの関与とXTP3-BのMRHドメインの糖結合活性および糖結合特異性の解明について述べられている。糖タンパク質のN型糖鎖は、小胞体で14糖からなる大きな糖鎖がペプチドのAsnXSer/Thrという配列に転移され、その後、ゴルジ体で分解されて新たに作り直されるが、なぜそのような不利なプロセスを経るかは古くから疑問であった。N型糖鎖が糖タンパク質品質管理のタグとして機能していることが明らかになったのは、つい最近のことである。この品質管理とは、ペプチドを正しくフォールディングすること、フォールディングが上手く行かなかったタンパク質を分解すること、そして、正しくフォールディングされたタンパク質を輸送・選別することである。現在、フォールディングに関わるカルネキシン、カルレティキュリン、そして細胞内輸送に関わるERGIC-53, VIP36, VIPLという膜型のレセプターについて、解析がなされてきた。一方、フォールディングに失敗をしたタンパク質を積極的に分解する小胞体関連分解(ERAD)については、それに関わる分子すら明らかにされていなかった。山口は、マンノース6リン酸レセプターと相同のドメイン(MRHドメイン)を二つもち、小胞体に局在する可溶性タンパク質 XTP3-Bを見出し、この分子がフォールディング不全の糖タンパク質をERADに導く鍵となる分子そのものであることを明らかにした。

XTP3-BのERADへの関連性を調べるために、ミスフォールドタンパク質のモデル分子である $\alpha$ 1-アンチトリプシン(AT<sup>WT</sup>)と、そのNull Hong Kong変異体(AT<sup>NHK</sup>)との相互作用を免疫沈降法により検証した。N末端にFLAGエピトープを付加したXTP3-B(FLAG-XTP3-B)とAT<sup>WT</sup>もしくはAT<sup>NHK</sup>を293T細胞に共発現させ、抗FLAG抗体と抗AT抗体で沈降させたものをSDS-PAGE、ウェスタンブロットで解析した結果、XTP3-BはAT<sup>WT</sup>と沈降せず、AT<sup>NHK</sup>と特異的に沈降した。これは、XTP3-BがERAD基質であるAT<sup>NHK</sup>と選択的に相互作用していることを示唆している。さらにMRHドメインを欠失させた変異体を用いて同様の実験を行ったところ、XTP3-B $\Delta$ 1はAT<sup>NHK</sup>と相互作用したが、XTP3-B $\Delta$ 2は相互作用しなかったことから、XTP3-BはMRHドメイン2を介してAT<sup>NHK</sup>と相互作用していることを明らかにした。

MRHドメイン2との相互作用がAT<sup>NHK</sup>に修飾されたN型糖鎖との結合を介しているか否かを検討するため、XTP3-BのC末端にヒトIgG1(hIgG1)のFc領域を融合させたもの、およびMRHドメイン1、MRHドメイン2をそれぞれ欠損した変異体を作成した。これらをプローブとして細胞表面糖鎖との結合をフローサイトメトリーで解析したところ、CHO細胞由来のレク

チン耐性変異株 Lec1に強く結合した。Lec1細胞表面に発現する糖鎖構造は、主に Man5GlcNAc2であることからXTP3-BはMan5GlcNAc2糖鎖に結合する可能性が示唆された。次に、種々の合成糖鎖を用いて結合阻害実験を行ったところ、3,6-マンノペンタオースおよびMan  $\alpha$  1-6Manで濃度依存的に結合が阻害されたことから、XTP3-Bは、高マンノース型糖鎖や混成型糖鎖に共通のbranched Man5構造を認識しており、その構造の中でもMan  $\alpha$  1-6Man構造がその結合に必須であることが示唆された。また、Man  $\alpha$  1-2Manでは結合が阻害されないことから、高マンノース型糖鎖Cアームの非還元末端がMan  $\alpha$  1-2Manによってマスクされている高マンノース型糖鎖には結合できず、XTP3-Bによる認識にはCアームのトリミングが必要であることが示された。このことから、AT<sup>NHK</sup>などのミスフォールドタンパク質は、EDEMにより糖鎖のCアームがトリミングを受け、細胞質に運ばれるというタンパク質品質管理機構の全貌が明らかになった。

この一連の研究成果は、糖タンパク質糖鎖の生理的機能の一つを明らかにしたばかりでなく、細胞にとって普遍的なタンパク質品質管理機構に明確な答えを与えた重要なものである。論文提出者が一貫して主体となって立案計画、実験解析、検証を行ったものであり、論文提出者の寄与によってなされた成果そのものであると判断する。従って、博士（生命科学）の学位を授与できると認める。