

論文審査の結果の要旨

氏名 胡 丹

本論文は大きく2つから構成されており、前半はマンノース6リン酸レセプターホモロジドメイン (MRH ドメイン) をもつ glucosidase II β サブユニット、後半はマレクチンについて、それぞれレクチンとしての糖結合活性の有無の検討、糖結合特異性の決定、それぞれの機能に及ぼすレクチン活性の意義について述べられている。さらに、これら解析の結果を踏まえて、細胞内の小胞体における糖タンパク質品質管理機構における、これら2つの分子の意義、および協調的な機能について議論されている。

本論文第1章では、glucosidase II β サブユニットのMRHドメインを可溶性四量体として大腸菌で発現させ、細胞表面糖鎖に対する結合を指標に糖結合活性の検討を行った。その結果、高分子量の高マンノース型糖鎖に強い親和性を示すことを明らかにした。さらに、フロントアルフィニティクロマトグラフィーによる解析によって、非還元末端に α 1,2Man残基をもつ側鎖に特異性を持っていること、また、これら側鎖の数が多いほど強い結合を示し、特にC-armという側鎖に最も強い親和性を示すことを明らかにした。このことは、C-armの α 1,2Manがglucosidase IIの作用を受ける鍵となる残基であり、これが除去されるともはやglucosidase IIの作用を受けなくなることを示唆していた。次に、このMRHドメインの糖結合に関与するアミノ酸残基を特定し、それらの変異体を作成することにより、糖結合活性が消失すること、さらにこの変異体を用いてglucosidase II β サブユニットのMRHドメインのレクチン活性がglucosidase活性に及ぼす影響について調べた。glucosidase IIは酵素活性を担う触媒サブユニットである α 、および機能未知の β サブユニットのヘテロ二量体である。 β サブユニットのMRHドメインの糖結合活性を消失させた変異体は、野生型と同様に α サブユニットと複合体を形成すること、また、人工基質である

-ニトロフェニル α グルコシドを基質として酵素活性を測定すると、wild-typeの β サブユニットと変異体の β サブユニットとの間に、glucosidase活性の差は見られなかった。一方、内在性の基質であるGlc₁Man₉GlcNAc₂ (G1M9)を基質として酵素の活性を測定すると、その結果は人工基質とは異なり、 β サブユニットのレクチン活性を消失した酵素は、glucosidase活性が顕著に低下していた。この結果は、従来の仮説では説明できない結果であり、MRHドメインのレクチン活性がその酵素活性に大きく寄与していることを示す重要な発見であった。

第2章では、マレクチンという小胞体内に局在する新規のレクチン様分子について検討を行った結果をまとめている。この分子はアフリカツメガエルでその存在が報告されている以外は、何の情報もない。胡丹はこのヒトホモログ遺伝子を探索し、この分子を大腸菌で発現させて、さまざまな解析を試みた。まず、糖結合活性の有無を検討するために、上記で確立した可溶性四量体を作成し、細胞表面との結合を調べた。その結果、デオキシノジリマイシンを細胞に処理し α グルコシダーゼ I および II を阻害することにより、細胞表面に G2M9、G3M9 糖鎖の発現を誘導すると、マレクチンが結合するようになることを見出した。この結果は、フロンタルアフィニティクロマトグラフィーによる解析によっても詳細に検証され、マレクチンが G2M9 特異的レクチンであることを示した。これまで、このような特異性をもつレクチンの存在が知られていなかっただけでなく、N 型糖鎖前駆体が、全ての生物種において、G3M9 という構造をもつ生物学的意義を解明するための有力な手がかりを得た意味で大きな成果であった。また、マレクチン変異体を作成し、糖結合に寄与するアミノ酸を同定、これに変異を導入しレクチン活性が消失すること、グルコシダーゼとの競合によりカルネキシンサイクルへの制御が行われている可能性についても検討した。これらの結果は、小胞体内のレクチン分子の解析を通して、N 型糖鎖をタグとして新生糖タンパク質の品質管理を行っていることを明確にした点で、大きな意義のある成果である。

なお、本論文の第1章は、神谷由紀子、戸谷希一郎、神谷大貴、山口大介、松尾一郎、松本直樹、伊藤幸成、加藤晃一、山本一夫との共同研究であるが、論文提出者が全面的に主体となって実験・解析および考察を行ったものであり、提出者の寄与が十分であると判断する。

従って、博士（生命科学）の学位を授与できると認める。