

# 論文審査の結果の要旨

氏名 秦 盛瑩

本論文は3部から構成されており、第1部はマレクチンと結合するタンパク質としてリボフォリンIを同定したこと、第2部ではリボフォリンIを過剰発現あるいはノックダウンした際のマレクチンの機能への影響、第3部ではリボフォリンIがミスフォールドタンパク質を認識するシャペロン活性を持つことについて述べられている。

本論文第1部において、手始めにFLAGタグを付加したマレクチンをHEK293細胞に発現させ、抗FLAG抗体でプルダウンを行った際に、一緒に共沈降する68kDaのタンパク質を見出した。このタンパク質を同定するために、電気泳動後にこのバンドを切り出してトリプシンで消化、ペプチドを回収してマトリックス支援レーザーイオン化飛行時間型質量分析計により6種類のペプチドのアミノ酸配列を決定した。これらは、いずれもヒトリボフォリンIのアミノ酸配列と一致したことから、マレクチンはリボフォリンIと細胞内で相互作用しているものと予想された。実際に抗リボフォリンI抗体で68kDaのバンドが特異的に染色されたこと、またMycタグを付加したリボフォリンIを細胞内に発現させて抗Myc抗体でプルダウンすると、逆にマレクチンと一緒に沈降することから、この2つのタンパク質が恒常的に細胞内で相互作用していることが示唆された。

マレクチンは細胞の小胞体においてミスフォールドタンパク質を選択的に小胞体内に留め、細胞外への分泌を抑制することが知られている。そこで第2章において、このマレクチンの機能に対してリボフォリンIがどのような影響を及ぼすかについて調べた。マレクチンはミスフォールドタンパク質である $\alpha 1$ アンチトリプシン変異体AT<sup>NHK</sup>を小胞体内に留めることが知られているが、この系にさらにリボフォリンIを過剰発現させるとマレクチンに結合するAT<sup>NHK</sup>の量が増加すること、逆にsiRNAを用いてリボフォリンIをノックダウンするとマレクチンと結合したAT<sup>NHK</sup>の量が減少することを見出した。これに対して、正しく折り畳まれる正常の $\alpha 1$ アンチトリプシンのはマレクチンと結合せず、リボフォリンIの

過剰発現やノックダウンによっても影響を受けなかった。また細胞外への分泌を同様に調べたところ、正常の $\alpha 1$ アンチトリプシンの分泌にはリボフォリンIの発現の増減は影響を及ぼさなかったが、AT<sup>NHK</sup>の分泌はリボフォリンIの過剰発現で抑制され、逆にノックダウンでは増強された。これら一連の結果は、リボフォリンIがマレクチンと協同でミスフォールドタンパク質を細胞内に留める機能を担っていることを強く示唆した。

上記の結果から、マレクチンそのものは糖認識タンパク質であり、ミスフォールドタンパク質そのものを認識できないことを考えると、リボフォリンIそれ自身がミスフォールドタンパク質を識別している可能性が示唆された。そこで第3部では、リボフォリンI単独でミスフォールドタンパク質を識別できるか否かについて、2つの異なる実験で検討した。

1つはANSという疎水性蛍光プローブを用いた手法であり、もう1つはマレクチンを細胞表面に発現させたレポーター細胞を用いた実験系である。ANSはタンパク質の疎水性部分に結合し蛍光を発する化合物であり、組換え体リボフォリンIと混合すると、強い蛍光を発し蛍光波長のシフトが観察された。一方、リボフォリンIを細胞表面に発現させたレポーター細胞を作成し、ミスフォールドタンパク質であるスクランブルRNase Aと正しくフォールディングされたRNase Aを用いて、リボフォリンIとの結合を $\beta$ ガラクトシダーゼの発現を指標にして調べた。その結果、リボフォリンIはスクランブルRNase Aと強く結合する一方、正しく折り畳まれたRNase Aとの結合は認められなかった。これらの結果は、リボフォリンIが単独でミスフォールドタンパク質を認識するシャペロンとしての機能を持ち、マレクチンと協同でこれらフォールディング不全な糖タンパク質を細胞内へ留め、分泌されないようにしていることが示された。

以上の一連の結果をまとめた本論文の内容は、機能未知のマレクチンの小胞体内における機能を明確に示した点で、細胞内レクチン、タンパク質品質管理機構等の研究領域において、大きなインパクトを与える成果である。また、論文提出者が主体となって全面的に実験・解析および考察を行ったものであり、論文提出者の寄与は十分であると判断する。

したがって、博士（生命科学）の学位を授与できると認める。