

論文審査の結果の要旨

氏名 陳 陽

本論文は2部から構成されており、第1部はマレクチンが細胞内で新生タンパク質のフォールディングに関与していることを発見したこと、第2部ではERGIC-53が輸送する新規の糖タンパク質Mac-2BPを同定するとともに、このタンパク質の細胞内輸送メカニズムに関して詳細な解析をした。

本論文第1部において、手始めにマレクチンの糖結合能について調べ、内在性リガンドがN型糖鎖の前駆体であるGlc₂Man₉GlcNAc₂ (G2M9)であることを明らかにした。次にこのマレクチンの細胞内における機能を探る目的で、HeLa細胞にFLAGタグを付加したマレクチンを発現させ、抗FLAG抗体でプルダウンを行った。その際に、分泌タンパク質であるα1アンチトリプシン (AT)、ミスフォールドタンパク質であるα1アンチトリプシンのnull Hong Kong変異体 (AT^{NHK}) の遺伝子を同時に発現させ、且つ新生タンパク質を追跡するために³⁵S-標識システイン、メチオニンを培地に加えパルスチェイス実験を行った。その結果、マレクチンはミスフォールドタンパク質であるAT^{NHK}と特異的に結合しており、正常のATとは結合していないことが示された。このマレクチンとAT^{NHK}との結合に糖鎖が関与しているか否かを調べるために、種々のN型糖鎖生合成の阻害剤castanospermine (CST)、1-deoxynojirimycin (DNJ)、kifunensine (KIF)、swainsonine (SW)を細胞に処理し、マレクチンとAT^{NHK}との結合への影響を調べたところ、グルコシダーゼIIの阻害剤であるDNJ処理により結合量が増加した。一方、AT^{NHK}のN型糖鎖付加部位のアミノ酸AsnをGlnに置換した変異体を作成し同様の実験を行ったところ、マレクチンとAT^{NHK}との結合は消失した。またマレクチンの糖と結合に関与するアミノ酸をAlaに置換した変異体4種類は、いずれもAT^{NHK}と共沈降しなかった。これらの結果は、マレクチンがミスフォールドタンパク質と特異的に結合すること、またG2M9の糖鎖を介して両者が結合していることを示唆した。更にATの細胞外への分泌に対するマレクチン過剰発現の影響を調べたところ、ATの分泌には影響

が無かったのに対して、AT^{NHK}の分泌は顕著に阻害された。これらの結果は、マレクチンがミスフォールドタンパク質を細胞内に留めていることを示唆していた。そこで、小胞体関連分解に導くOS-9とAT^{NHK}との結合量に対するマレクチン過剰発現の影響を調べたところ、AT^{NHK}の結合量が増加していることがわかった。これらのことにより、マレクチンがミスフォールドタンパク質をシャペロン分子へ誘導し、最終的に小胞体関連分解へ導いていることを示した。

本論文第2部において、小胞体とゴルジ体の輸送を担うカーゴレセプターERGIC-53と特異的に結合する分子を、HepG2細胞由来のcDNAライブラリーから、GFPを用いたprotein fragment complementation assay (PCA)を用いてスクリーニングした。8種類の候補分子が同定された中で、最も結合の強かったMac-2結合タンパク質 (Mac-2BP) に着目し更に詳細な解析を進めた。ERGIC-53とMac-2BPを細胞内に共発現させると一緒に共沈降されること、細胞をKIF処理すると結合量が増加すること、一方、ERGIC-53の糖結合能を欠失した変異体では結合が低下することをPCA法を用いて示し、糖鎖を介してMac-2BPとERGIC-53が細胞内で結合していることを証明した。また、ERGIC-53に結合してゴルジ体へ輸送されたMac-2BPが更に細胞外へと分泌する過程を調べたところ、ERGIC-53を細胞内に過剰発現すると分泌量が増加すること、逆に糖結合能を失ったERGIC-53の過剰発現では分泌を抑制することが示された。これらの結果は、ERGIC-53がMac-2BPの糖鎖を認識して小胞体からゴルジ体を経て細胞外への分泌を制御していることを示している。

以上の一連の結果をまとめた本論文の内容は、ミスフォールドタンパク質をマレクチンが認識し細胞内に留めて分解へ導くこと、また正しくフォールディングされたタンパク質をERGIC-53がゴルジ体を経て細胞外へ分泌するという2つの過程において、新生タンパク質の糖鎖をタグとして識別されていることを*in vivo*で証明した点において、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。