

氏名	かとうとしひこ 加藤紀彦
学位(専攻分野)	博士(生命科学)
学位記番号	生博第130号
学位授与の日付	平成19年11月26日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	生命科学研究所統合生命科学専攻
学位論文題目	線虫の細胞質における遊離糖鎖の生成および代謝機構に関する研究

論文調査委員 (主査) 教授 山本憲二 教授 小堤保則 教授 竹安邦夫

### 論文内容の要旨

真核生物の細胞質には遊離のアスパラギン結合型糖鎖が多量に存在している。この遊離糖鎖 (free oligosaccharide, FOS) は主に小胞体関連分解 (endoplasmic reticulum (ER)-associated degradation, ERAD) によって生成されることが知られているが、その詳細な生成および代謝経路については未解明の部分が多い。本研究においては、線虫 *Caenorhabditis elegans* の FOS の生成および代謝経路について解析を行った。

Peptide: N-glycanase (PNGase) は真核生物の細胞質において、misfolded glycoprotein から糖鎖を切り出して、FOS を生成する酵素であるが、本研究では、*C. elegans* の PNGase (*png-1*, F56G4.5) の遺伝子クローニングとその諸性質の解析を行った。Maltose-binding protein (MBP) との融合タンパク質として大腸菌で発現させた PNGase (MBP-PNG-1) は高マンノース型糖鎖、複合型糖鎖の両方に対して切断遊離する活性を示し、タンパク質部分が変性した糖タンパク質にのみ活性を示したことから、本酵素は細胞内において misfolded glycoprotein に対してのみ作用できることが示唆された。また N 末端側の thioredoxin-like domain が protein disulfide reductase 活性を有することを明らかにし、PNG-1 が他の生物種の PNGase とは違って、二つの異なる活性を有するユニークな酵素であることを明らかにした。

次に、*C. elegans* の細胞質の FOS について調べた。まず、wild type (N2) の FOS について HPLC および MS 分析を行って、主な FOS が Mannose を 3 - 9 残基有する高マンノース型糖鎖であることを明らかにした。全 FOS の約 94% が還元末端に 1 残基の *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) を持つ糖鎖 (FOS-GN1) で、残りの約 6% は 2 残基の GlcNAc を有する糖鎖 (FOS-GN2) であった。既に、*C. elegans* の ENG-1 (endo- $\beta$ -*N*-acetylglucosaminidase, ENGase) が高マンノース型糖鎖に高い基質特異性を有し、FOS を代謝する可能性を示唆しているが (T. Kato, *et al.*, *Glycobiology* 2002)、実際に、本酵素の欠損株 *eng-1* (*tm1208*) は FOS-GN2 を顕著に蓄積していたことから、ENGase が FOS-GN2 から FOS-GN1 への変換に関与することを初めて示した。さらに、*C. elegans* の FOS の中で最も多量に存在した糖鎖は  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_1$  の M5A' 異性体 ( $\text{Man}_\alpha 1-3$  ( $\text{Man}_\alpha 1-6$ )  $\text{Man}_\alpha 1-6$  ( $\text{Man}_\alpha 1-3$ )  $\text{Man}_\beta 1-4\text{GlcNAc}$ , prime は FOS-GN1 であることを示す) であり、哺乳類細胞に最も多く見出される M5B' 異性体 ( $\text{Man}_\alpha 1-2\text{Man}_\alpha 1-2\text{Man}_\alpha 1-2$  ( $\text{Man}_\alpha 1-6$ )  $\text{Man}_\beta 1-4\text{GlcNAc}$ ) とは異なることを見出した。そこで Golgi  $\alpha$ -mannosidase I の阻害剤である deoxymannojirimycin や kifunensin で処理した *C. elegans* より FOS を抽出し分析すると、阻害剤で処理しない場合に比べて M5A' 異性体が減少し、逆に M6' や M7' が増加しており、Golgi におけるプロセッシングを受けている可能性が示唆された。Golgi でのプロセッシングをさらに確かめるために、Golgi  $\alpha$ -mannosidase II の欠損株 (*tm1078*) について FOS の解析を行ったところ、wild type の FOS には検出されなかった  $\text{GlcNAc}_1\text{Man}_5\text{GlcNAc}_1$  の糖鎖を多量に見出した。本構造の糖鎖は Golgi に局在する  $\beta 1,2$ -*N*-acetylglucosaminyltransferase I によってのみ合成されるものであることから、*C. elegans* において misfolded glycoprotein の多くは Golgi へ輸送された後に、ERAD により細胞質で分解されることが考えられる。

本研究における *C. elegans* の FOS の構造の分析および生成・代謝に関わる酵素の解析から、FOS の生成・代謝経路に関す

る新たな知見を得ることができた。

## 論文審査の結果の要旨

真核生物の細胞質には遊離のアスパラギン結合型糖鎖が多量に見出されるが、本論文の著者は線虫*Caenorhabditis elegans*の遊離糖鎖の代謝に関する新規酵素の解析と遊離糖鎖の構造解析を通して、その生成経路を検討した。

まず、糖タンパク質のアスパラギン結合型糖鎖をタンパク質から遊離する酵素であるpeptide : N-glycanase (PNGase)を線虫より単離し、その諸性質を解析した。その結果、線虫PNGaseは変性した糖タンパク質や糖ペプチドに対してのみ糖鎖の切断活性を示し、本酵素が酵母PNGaseと同様にミスフォールドした糖タンパク質から糖鎖を切り出す働きをする小胞体関連分解に関わる酵素であることを明らかにした。この結果は線虫においては初めて見出された事実である。さらに、本酵素がthioredoxin-like domainを含むことを見出し、タンパク質ジスルフィド結合還元活性をも有する、分子内に二つの異なる活性を持つ特異な酵素であることを明らかにした。本発見は細胞質における糖タンパク質の分解機構を解明する上で重要な示唆を与えるものである。

さらに著者は、線虫より抽出した遊離糖鎖の構造を詳細に解析し、その大部分が還元末端側にN-acetylglucosamineを1残基有する高マンノース型糖鎖であることを明らかにした。一方、エンド型グリコシダーゼ、endo- $\beta$ -N-acetylglucosaminidase 遺伝子 (*eng-1*) の部分欠損株では、還元末端にN-acetylglucosamineを2残基有する糖鎖が蓄積することを発見し、*eng-1*が遊離糖鎖の代謝に直接関与することを明らかにした。本発見はPNGaseによりタンパク質から遊離した糖鎖の代謝経路を明らかにするものである。また、遊離糖鎖に含まれる最も多くの糖鎖が線虫と高等動物では異なることを明らかにし、それぞれ異なる経路で遊離糖鎖が生成されることを示した。さらに、 $\alpha$ -mannosidaseの阻害剤処理やゴルジ体の $\alpha$ -mannosidase欠損株の解析から、遊離糖鎖はゴルジ体を経由した糖タンパク質に由来することを見出した。本結果は小胞体のみならずゴルジ体も糖タンパク質の品質管理において重要な役割を果たしていることを強く示唆するものであり、タンパク質の生合成という生命の根幹をなす事象のプロセスを、遊離糖鎖を介して明らかにしたということは特筆すべきことである。また、線虫から見出された遊離糖鎖は高等動物からも見出されることから、真核生物に共通の事実であると考えられ、本研究は真核生物のタンパク質あるいは糖鎖の研究において重要な意味を有するものと考えられる。

このように本論文の研究は、真核生物の細胞質糖鎖の代謝に関する酵素、および糖鎖構造について詳細な解析を行うとともに、細胞内のタンパク質生合成についての新たな現象を見出した大変有意義なものであり、細胞生物学、細胞生理学、糖鎖生物学などの基礎的分野において重要な貢献をするものである。

よって、本論文は博士(生命科学)の学位論文として価値あるものと認めた。なお、平成19年9月4日、論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。