

学 位 審 査 報 告 書

(ふ り が な) 氏 名	の ま けんたろう 野 間 健 太 郎
学位 (専攻分野)	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	理 博 第 号
学位授与の日付	平成 年 月 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	理学研究科 生物科学 専攻
(学位論文題目) N結合型糖鎖修飾による Kv12.2 チャネルの輸送及び活性制御の研究	
論 文 調 査 委 員	(主査) 藤吉 好則 教授 平野 丈夫 教授 森 和俊 教授

理 学 研 究 科

(続紙 1)

京都大学	博士 (理 学)	氏名	野間 健太郎
論文題目	N結合型糖鎖修飾による Kv12.2 チャネルの輸送及び活性制御の研究		
(論文内容の要旨)			
電位依存性カリウムチャネル (Kv チャネル) は、哺乳動物の神経細胞や筋細胞等の興奮性を制御する極めて多様なチャネルファミリーを形成している。その中でも、Kv12.2 は最も長い細胞外 S5-P ループを有するとともに、このループには 3 箇所の N 結合型糖鎖修飾サイトが存在する。また、Kv12.2 ノックアウトマウスで記憶力などが亢進するという報告がなされており、このチャネルが認知活動に関わることが示唆されている。N 型糖鎖修飾は、様々な Kv チャネルにおいてフォールディング、輸送、機能などに関わることも知られている。ところが、Kv12.2 の興味深い機能的特徴にも関わらず、この分子に関する報告はほとんど存在しない。 本研究では、CHO 哺乳動物培養細胞において、Kv12.2 が N 型糖鎖修飾を受けていることを確認し、これらの糖鎖修飾が Kv12.2 分子の輸送と活性を制御する機構の解析を行った。糖鎖修飾サイト置換変異体と糖鎖修飾阻害剤を用いた実験から、1 箇所だけでも糖鎖修飾サイトを持つ二重変異体は、そのサイトの位置に関わらず細胞表面に輸送されるのに対して、糖鎖修飾サイトを持たない三重変異体は細胞表面に輸送されないことが明らかになった。これらの結果から、Kv12.2 の細胞膜への輸送には少なくとも 1 箇所の糖鎖修飾サイトが必要であることが示唆された。また、酵素処理によって N 型糖鎖を除去すると、電流量は変化しなかったが、Kv12.2 の活性化カーブは脱分極側に 30 mV シフトした。Shaker 型チャネルでも糖鎖による同様のシフトが報告されており、このチャネルでは糖鎖中に存在する負に帯電したシアル酸の静電的効果によってそのシフトが説明されている。しかしながら、Kv12.2 に関しては、シアル酸の除去が活性化カーブに影響を与えないことから、別の機構がはたらいっていると考えられる。以上の CHO 細胞を用いた実験から N 型糖鎖修飾は Kv12.2 の適切な輸送と活性に重要な役割を果たすことが明らかになった。それゆえ、次に生体内において Kv12.2 が脳特異的に発現していることを確認した。さらに、マウスの発育に従って、Kv12.2 の発現量は増加し、小脳、脳幹に比べて、嗅球、大脳皮質、海馬での発現量が多いなど、タンパク質発現量には部位依存性が見られることが明らかになった。しかしながら、糖鎖修飾状態にはほとんど差異が見られず、どの発育段階、脳部位においても、主として成熟した糖鎖修飾を有する分子種が発現しており、非糖鎖修飾型は観察されなかった。非糖鎖修飾型が CHO 細胞において細胞膜へ輸送されないことも考慮すると、生体内においては成熟した糖鎖修飾を有する Kv12.2 のみが細胞膜で利用されていると考えられる。			

(論文審査の結果の要旨)

神経細胞等における主役はイオンチャネルと考えられるが、特に電位依存性カリウムチャネル (Kv チャネル) は、神経細胞や筋細胞等の興奮性を制御する極めて多様なチャネルタンパク質ファミリーを形成している。その中でも、Kv12.2 は最も長い細胞外 S5-P ループを有するとともに、このループには 3 箇所の *N* 結合型糖鎖修飾サイトが存在する。最近、このチャネルのノックアウトマウスで記憶力などが亢進するという報告がなされおり、認知活動に関わることが示唆されている。申請者は、Kv12.2 分子の特徴的ループに *N* 型糖鎖修飾を受けていること、その糖鎖修飾がこの分子の輸送と活性を制御する機構を解析した。糖鎖修飾サイト置換変異体と糖鎖修飾阻害剤を用いた実験から、1 箇所だけでも糖鎖修飾サイトを持つ二重変異体は、そのサイトの位置に関わらず細胞表面に輸送されるのに対して、糖鎖修飾サイトを持たない三重変異体は細胞表面に輸送されないことを明らかにした。これらの結果から、Kv12.2 の細胞膜への輸送には少なくとも 1 箇所の糖鎖修飾サイトが必要であることが示された。また、酵素処理によって *N* 型糖鎖を除去すると、電流量は変化しないが、Kv12.2 の活性化カーブは脱分極側に 30 mV シフトすることを発見した。Shaker 型チャネルでも同様のシフトが報告されており、糖鎖中に存在する負に帯電したシアル酸の静電的効果によってそのシフトが説明されていた。しかしながら、Kv12.2 に関しては、シアル酸の除去が活性化カーブに影響を与えないことを明らかにし、別の機構がはたらいていることを示した。これら CHO 細胞を用いた実験から *N* 型糖鎖修飾は Kv12.2 の適切な輸送と活性に重要な役割を果たすことを明らかにするだけでなく、生体内における Kv12.2 の糖鎖修飾の解析も行った。すなわち、生体内において Kv12.2 は脳特異的に発現していることを確認するとともに、マウスの発育に従って、Kv12.2 の発現量が増加し、小脳、脳幹に比べて、嗅球、大脳皮質、海馬での発現量が多いなど、タンパク質発現量の部位依存性があることを明らかにした。さらに、これらの Kv12.2 を解析した結果、糖鎖修飾状態にはほとんど差異が見られず、どの発育段階、脳部位においても、主として成熟した糖鎖修飾を有する分子種を発現しており、非糖鎖修飾型は観察されないことを明らかにした。CHO 細胞において、Kv12.2 は糖鎖修飾されないと細胞膜へ輸送されないことも考慮すると、生体内においては成熟した糖鎖修飾を有する Kv12.2 のみが細胞膜で利用されていること示した。神経細胞等における重要なイオンチャネルである電位依存性カリウムチャネル (Kv チャネル)、中でも特徴的な長い細胞外 S5-P ループを有する Kv12.2 チャネルの *N* 型糖鎖修飾とその輸送及び活性制御機構の解明を行って注目すべき成果を得た。

以上のように、本論文は博士 (理学) の学位論文として十分に価値あるものと認める。また、平成 22 年 1 月 20 日論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。

要旨公開可能日： 年 月 日以降