

氏名	さいとう 齊 藤	あきら 章
学位の種類	博士（農学）	
学位記番号	甲第336号	
学位授与年月日	平成16年 3月12日	
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当	
学位論文題目	Glycosylation of $\alpha$ -lactalbumin and lysozyme using <i>Pichia pastoris</i> expression system for improving the functional properties ( <i>Pichia pastoris</i> 発現系を用いた $\alpha$ -ラクトアルブミンとリゾチームのグリコシル化)	
学位論文審査委員	(主査) 加藤 昭夫 (副査) 松富直利 森嶋伊佐夫 松田英幸 古賀大三	

## 学位論文の内容の要旨

$\alpha$ -ラクトアルブミン ( $\alpha$ -LA) はミルク中に存在するホエイ蛋白質の主要な蛋白質である。これは、14kDa の酸性蛋白質で、ラクトース合成酵素の一サブユニットとして機能しており、近年、抗癌作用や免疫力の向上等、新規な機能が報告されている。ヤギやウシ、ヒトには45位と74位にN型の糖鎖付加認識配列 Asn-X-Ser を保持しているが、ミルク中には、大部分が非糖鎖付加型として分泌しており、糖鎖付加型の $\alpha$ -LA についての知見は極めて少ない。そこで、この糖鎖付加型の性質を調べるため、酵母 *Pichia pastoris* を用いて発現分泌を試みた (Chapter I)。その結果、分泌された $\alpha$ -LA は高度に糖鎖付加が起きており、哺乳類に比べ糖鎖付加が起り易いことが示された。ここで、酵母 *P. pastoris* の発現系が糖鎖付加型を量産する上で好都合であると判断し、種々の変異体の発現分泌を試みた。興味あることに、野生型と45位を欠損した変異体 N45D や46位へ糖鎖付加部位を導入した変異体 D46Nの間には分泌量の違いが生じ、45位の糖鎖付加を阻害する変異体 N45D の分泌量は糖鎖付加型のものに比べ、およそ10倍の分泌量を示した。これらのことから、酵母の小胞体内における糖タンパク質特有のシャペロンであるカルネキシンを介した品質管理機構によって、分泌した糖鎖付加型の $\alpha$ -LA は品質管理により処理されていると推測された。分泌した $\alpha$ -LA は、マクロファージの活性化能を示し、乳癌細胞に対するアポトーシス誘導能が観察された (Chapter II)。その結果、糖鎖付加型はいずれの場合においても、市販の $\alpha$ -LA と比べ高い活性を有していた。この効果は糖鎖自身によるものというより、むしろ糖鎖付加に伴う蛋白質の構造変化によって引き起こされるものと予想された。そこで、 $\alpha$ -LA と構造で高い相同性を維持するリゾチーム (Lz) を発現分泌させ、糖鎖付加によるタンパク質の立体構造に及ぼす影響を調査した (Chapter III)。部位指定変異により作製された糖鎖付加型 Lz は、19位に糖鎖付加する R21T と49位に糖鎖付加する G49N、そして両部位へ糖鎖付加する R21T/G49N の三種類の変異体を用いた。これらの分泌量はいずれもおおよそ 30 mg/liter であり、分泌した糖鎖付加型 Lz の性質は野生型と比較すると、糖鎖付加に伴い構造安定性 ( $\Delta G$ ) が減少した。このことは $\alpha$ -LA

の場合にも糖鎖付加により不安定構造が生じることを示している。これらの糖鎖付加里ゾチームはマクロファージの活性化を示さなかった。

以上の結果から、 $\alpha$ -LA はラクトース合成酵素におけるガラクトシルトランスフェラーゼとの複合体形成にも構造の柔軟性が重要であり、糖鎖付加により、容易にモルテングロビュール様の構造形成が引き起こされ、マクロファージ活性化、抗腫瘍活性などの新規な機能が与えられると予測される。

## 論文審査の結果の要旨

$\alpha$ -ラクトアルブミン ( $\alpha$ -LA) はミルク中に存在するホエイ蛋白質の主要な蛋白質である。これは、14kDa の酸性蛋白質で、ラクトース合成酵素の一サブユニットとして機能しており、近年、抗癌作用や免疫力の向上等、新規な機能が報告されている。ヤギやウシ、ヒトには 45 位と 74 位に N 型の糖鎖付加認識配列 Asn-X-Ser を保持しているが、ミルク中には、大部分が非糖鎖付加型として分泌しており、微量存在する糖鎖付加型の  $\alpha$ -LA についての知見は極めて少ない。そこで、この糖鎖付加型の性質を調べるため、酵母 *Pichia pastoris* を用いて発現分泌を試みた (Chapter I)。その結果、分泌された  $\alpha$ -LA は高度に糖鎖付加が起きており、哺乳類に比べ糖鎖付加が起り易いことが示された。ここで、酵母 *P. pastoris* の発現系が糖鎖付加型を量産する上で好都合であると判断し、種々の変異体の発現分泌を試みた。興味あることに、野生型と 45 位を欠損した変異体 N45D や 46 位へ糖鎖付加部位を導入した変異体 D46N の間には分泌量の違いが生じ、45 位の糖鎖付加を阻害する変異体 N45D の分泌量は糖鎖付加型のものに比べ、およそ 10 倍の分泌量を示した。これらのことから、酵母の小胞体内における糖タンパク質特有のシャペロンであるカルネキシンを介した品質管理機構によって、45 位糖鎖付加型の  $\alpha$ -LA は品質管理により処理されていると推測された。分泌した  $\alpha$ -LA は、マクロファージの活性化能を示し、乳癌細胞に対するアポトーシス誘導能が観察された (Chapter II)。その結果、糖鎖付加型はいずれの場合においても、市販の  $\alpha$ -LA と比べ高い活性を有していた。この効果は糖鎖自身によるものというより、むしろ糖鎖付加に伴う蛋白質の構造変化によって引き起こされるものと予想された。そこで、 $\alpha$ -LA と構造で高い相同性を維持するリゾチーム (Lz) を発現分泌させ、糖鎖付加によるタンパク質の立体構造に及ぼす影響を調査した (Chapter III)。部位指定変異により作製された糖鎖付加型 Lz は、19 位に糖鎖付加する R21T と 49 位に糖鎖付加する G49N、そして両部位へ糖鎖付加する R21T/G49N の三種類の変異体を用いた。これらの分泌量はいずれもおおよそ 30 mg/liter であり、分泌した糖鎖付加型 Lz の性質は野生型と比較すると、糖鎖付加に伴い構造安定性 ( $\Delta G$ ) が減少した。このことは  $\alpha$ -LA の場合にも糖鎖付加により不安定構造が生じることを示している。これらの糖鎖付加里ゾチームはマクロファージの活性化を示さなかった。

以上の結果から、 $\alpha$ -LA はラクトース合成酵素におけるガラクトシルトランスフェラーゼとの複合体形成にも構造の柔軟性が重要であり、糖鎖付加により、容易にモルテングロビュール様の構造形成が引き起こされ、マクロファージ活性化、抗腫瘍活性などの新規な機能が与えられると予測される。

以上、研究内容は新規性・独創性に富むものであり、その成果は酵母での有用タンパク質のグリコシル化に関する研究分野の発展に寄与するものであり、また産業的な利用にもつながるものと判断された。よって、博士 (農学) の学位論文として十分な価値を有するものと判断した。