

学 位 論 文 要 旨

氏名: 伊 藤 一 成

題目: Role of *N*-glycosylation of hen egg ovalbumin on quality control of protein
 タンパク質の品質管理機構における鶏卵白アルブミンの*N*型糖鎖の役割

鶏卵白アルブミン(OVA)は、アセチル基、リン酸基及び*N*型糖鎖を付加している。特に糖鎖に関して、OVAは*N*型糖鎖付加部位を2ヶ所(Asn-292, Asn-311)持っているがAsn-292にのみ糖鎖が付加したモノグリコシル型として存在し、そのジグリコシル型や非グリコシル型は存在しない。OVAの糖鎖の役割や、何故Asn-292のみに糖鎖が付加しているのかという事は不明である。本研究では真核生物で高発現が期待できる酵母を使用して、OVAの翻訳後修飾、主に糖鎖の役割を解明することを目的とした。

野生型OVAを酵母*Pichia pastoris*で発現させると、分子量の異なる2成分が分泌された。これは、卵白中のOVA同様に、糖鎖が1ヶ所(Asn-292のみ)付加したモノグリコシル型と、両方に付加したジグリコシル型であった。この2成分に特徴的な差はなかったため、Asn-311への糖鎖付加はOVAには影響がないと考えられた。糖鎖付加以外の翻訳後修飾は起こっておらず、リン酸基がOVAの安定性に関与していることが示唆された。また、非グリコシル型は分泌されず、Asn-292には必ず糖鎖が付加していた。そのため、Asn-292の糖鎖が合成から構造形成、成熟、分泌に至るいずれかの過程で重要な役割を担っている事が予想された。

酵母では、卵白中に存在しないAsn-311に糖鎖付加したのもも分泌されたため、OVAの糖鎖の役割を調べるには非常に都合が良い。糖鎖の役割を詳細に調べるため、糖鎖付加部位に変異をかけた、N292Q, N311Q, N292/311Qを作成した。N311Qは野生型と匹敵する分泌量を示したが、N292Q, N292/311Qの分泌量は激減した。また、*N*-グリコシル化阻害剤を加えると、分泌していた野生型、N311Qともに分泌が抑制された。細胞内発現を調べたところ、全ての変異体は野生型と同程度に発現されており、培養時間経過とともに減少したため、合成後、N292Q及びN292/311Qは分泌される前に大部分が分解されることを示した。また、分泌された各変異体の構造・熱安定性を精査した結果、N292Q及びN292/311Qは野生型と比べ構造の変化ならびに熱安定性の低下を示した。これらの結果から、Asn-292の糖鎖がOVAの正確なfoldingに重要であるという事が示唆された。

糖タンパク質の*N*型糖鎖は、タンパク質の品質管理機構において、重要な役割を果たしている事が報告されている。OVAの場合、Asn-292の糖鎖が存在しなければ、正確な構造形成が起こりにくく、タンパク質の品質管理機構に捕捉され、その大部分が分解系へ送られてしまうと考えられた。この推測を裏付けるように、misfoldingする変異体(I34N)は全く分泌されなかったため、同様にほとんど分泌されなかったN292Q及びN292/311Qも細胞内で正しいfoldingが出来ないため分解系へ送られると結論付けられた。

Asn-292の糖鎖が部位特異的に重要なのか調べるため、新たに*N*型糖鎖付加部位を様々な位置(Ser-168, Ser-236, Ile-371)に導入した変異体を構築し、これらの変異体の分泌の有無を確認した。いずれの糖鎖付加配列を導入した変異体も、Asn-292に糖鎖が付加されなければ分泌量が低下する結果となり、Asn-292に糖鎖付加されることが、合成後のfoldingや分泌に重要であることが分かった。

タンパク質の品質管理機構で働いている分子シャペロンのカルネキシンを欠損させた酵母*Saccharomyces cerevisiae*でも発現・分泌を試みたところ、カルネキシン欠損株では、分泌していた野生型とN311Qの分泌がN292Q, N292/311Q並みに抑制された。このためAsn-292の糖鎖はタンパク質の品質管理機構に関与しており、この糖鎖がカルネキシンと相互作用し、正しいfoldingを促進すると考えられた。

OVAのAsn-292の糖鎖は、タンパク質の品質管理機構で重要な役割を果たしており、その正確な構造形成に必須であることが示された。この理由のため、卵白中のOVAは、Asn-292にのみ糖鎖付加しているのではないかと考えられた。