

## 学位論文審査の結果の要旨

氏名	伊藤一成
審査委員	主査 松富直利 (印) 副査 古賀大三 (印) 副査 柴田均 (印) 副査 森嶋伊佐夫 (印) 副査 内海敏彦 (印)
題目	Role of <i>N</i> -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 <i>N</i> 型糖鎖の役割
審査結果の要旨 (2,000字以内)	
<p>鶏卵白アルブミン(OVA)は、<i>N</i>型糖鎖を有する糖タンパク質である。OVAのアミノ酸配列から、<i>N</i>型糖鎖付加部位は2ヶ所(Asn-292, Asn-311)存在するが、鶏卵白中にはAsn-292に糖鎖が付加したモノグリコシル型のみ存在し、ジグリコシル型や非グリコシル型は存在しない。そこで本研究は、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を明らかにしようとしたもので、真核生物で高発現が期待できる酵母発現系を用いて、OVAの糖鎖の役割を解明している。</p> <p>まず、酵母 <i>Pichia pastoris</i> 発現系を用いて野生型 OVA を発現分泌させ、分子量の異なる2成分が分泌されることを示している。この2成分は、卵白中の OVA 同様に、糖鎖が1ヶ所(Asn-292のみ)に付加したモノグリコシル型と、2ヶ所に付加したジグリコシル型であることを明らかにしている。この2成分に、構造的特徴や熱安定性等に有意な差がなかったことから、Asn-311への付加的な糖鎖付加は、OVAの構造安定性には影響がないことを示している。また、糖鎖付加以外の翻訳後修飾は起こっていないことも明らかにしている。さらに、非グリコシル型は分泌されないことから、OVAの分泌にはAsn-292への糖鎖付加が必要であることを示した。併せて、OVAの合成、構造形成、成熟、及び分泌に至るいずれかの過程で、Asn-292への糖鎖付加が重要な役割を担っている事を推察している。</p> <p>酵母発現系では、Asn-311に付加的に糖鎖付加したOVAも分泌されることから、糖鎖付加部位に変異をかけた、N292Q、N311Q、及びN292/311Qを構築し、糖鎖の役割を精査している。N311Q変異体は野生型に匹敵する分泌量を示したが、N292Q及びN292/311Q変異体の分泌量は野生型に比較して激減した。また、<i>N</i>-グリコシル化阻害剤存在下では、野生型、及びN311Q変異体の分泌はほぼ完全に抑制された。一方、細胞内では、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変異体は分泌される前に大部分が分解されると考察している。また、分泌された各変異体の構造・熱安定性を精査し、N292Q及びN292/311Q変異体は、野生型と比べ構造の変化ならびに熱安定性が低下していたことを示し、Asn-292への糖鎖付加は、OVAの正確なフォールディングに重要であるという結論を導いている。</p> <p>一般に、<i>N</i>型糖鎖は、糖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、N292Q及びN292/311Q変異体の分泌が激減したことから、Asn-292の糖鎖がタンパク質の品質管理機構に関与していることを推察し、糖鎖が付加することによってミスフォールドしやすい変異体(I34N)を構築し、発現分泌を調べた。その結果、I34N変異体は分泌されなかったことから、N292Q及びN292/311Qと同様に細胞内で正しくフォールド出来ないため分解系へ送られると結論付けている。</p>	

Asn-292 への糖鎖付加が部位特異的に重要なのかを明らかにするため、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を精査している。その結果、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ことを見出し、Asn-292 への糖鎖付加が、合成後のフォールディングや分泌に必須であることを明らかにしている。

併せて、糖タンパク質の品質管理機構に関与し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* を用いて野生型や糖鎖付加変異体の発現・分泌を調べている。その結果、カルネキシン欠損株では、分泌されていた野生型と N311Q 変異体の分泌量が N292Q および N292/311Q 変異体と同様に強く低下することを示し、OVA の Asn-292 の糖鎖はカルネキシンと相互作用し、正しいフォールディングを促がすことを示している。

OVA の Asn-292 への付加糖鎖は、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、OVA の正確な構造形成に必須であることを提唱し、卵白中の OVA が、Asn-292 にのみ糖鎖付加したモノグリコシル型として存在している意味を明らかにした。

以上の結果の一部は、既に *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 及び *J. Biochemistry* に掲載されており、併せて学位論文の内容は、本人を鳥取大学大学院連合農学研究科博士科課程修了者として認め、博士（農学）の学位を与えるに十分な資格を有するものと判断した。