

# 論文審査の結果の要旨

氏名 武田 晃

本論文は3部から構成されている。近年発見された細胞内レクチンのマレクチンについて、第1部ではオリゴ糖転移酵素 (OST) 複合体と相互作用すること、第2部ではマレクチンが OST 複合体と結合することでミスフォールドした新生タンパク質の分泌抑制に関与すること、第3部では細胞内におけるマレクチン相互作用分子のスクリーニングから新たな分子を同定し、最後にこれらに基づく新規の仮説を提唱した論文である。

第1部において、マレクチンと相互作用する分子を調べるため免疫沈降および質量分析を行った。FLAG タグを融合して発現するマレクチン安定発現細胞を作製し、抗 FLAG 抗体結合ビーズで免疫沈降した。マレクチンと共沈したタンパク質を SDS-PAGE または Nano-LC の2種類の手法で分離し、それぞれ trypsin 処理したペプチドをマトリクス支援レーザーイオン化飛行時間型質量分析計で分析し、タンパク質の同定を行った。その結果、ribophorin1、ribophorin2、OST48、STT3A が高い信頼性で同定された。これらはいずれも OST 複合体の構成分子であることから、マレクチンが OST 複合体と結合していることが示唆された。

小胞体内腔で OST により新生タンパク質に転移された  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNac}_2$  (G3M9) 糖鎖は、glucosidase I による加水分解により  $\text{Glc}_2\text{Man}_9\text{GlcNac}_2$  (G2M9) 糖鎖となる。マレクチンはミスフォールドとなった新生タンパク質の G2M9 糖鎖に結合し細胞内に留め、細胞外への分泌を抑制し分解に導くことが明らかにされている。そこで、第2部では OST 複合体と結合不能なマレクチン変異体を用いて解析し、マレクチンと OST 複合体との結合がマレクチンの上記の機能に必要なか否かを調べた。様々なマレクチンのドメイン欠損変異体と ribophorin1 について共免疫沈降法で解析したところ、両者の結合にはマレクチンの膜貫通領域が必要であることが示唆された。マレクチンの膜貫通領域及び細胞質領域を削除し、かつ C 末に小胞体滞留シグナル Lys-Asp-Glu-Leu を付加した変異体は小胞体に局在し、また ribophorin2 および OST48 とともに結合しなかったことから OST 複合体と結合不能な変異体であることが示唆された。このマレクチン変異体がミスフォールドモデル糖タンパク質  $\alpha 1$  アンチトリプシンの null Hong Kong 型 (AT<sup>NHK</sup>) と結合するか共免疫沈降法で解析したところ、マレクチン wild-type (WT) と同様にこの変異体も AT<sup>NHK</sup> と共沈し、さらに共沈した AT<sup>NHK</sup> の N 型糖鎖は endo- $\beta$ -N-acetylglucosaminidase H 処理で切断されたことから、変異体も小胞体内腔で AT<sup>NHK</sup> と結合することが示された。一方、AT<sup>NHK</sup> の細

胞外への分泌量をウェスタンブロッティングで調べると、マレクチン-WT を過剰発現させた細胞では AT<sup>NHK</sup> の分泌は顕著に抑制されるが、変異体を発現させた細胞では分泌抑制されないことが分かった。これらの結果から、マレクチンによるミスフォールド糖タンパク質の分泌抑制には OST 複合体との結合が必要であることが示唆された。

第 3 部において、マレクチンと特異的に相互作用する分子を「細胞内」で探索するため、レポータータンパク質 Venus を利用した protein-fragment complementation assay (PCA) 法でスクリーニングを試みた。HepG2 細胞株由来の cDNA についてスクリーニングしたところ、小胞体に局在する分子シャペロン、およびマレクチンのリガンドとなりうる N 型糖鎖を複数有する分泌糖タンパク質がマレクチン相互作用候補分子として多数同定された。これらの中で、全長アミノ酸配列を用いた PCA の解析を行った分子シャペロン、および分泌糖タンパク質は全てマレクチンとの相互作用が確認され、また分子シャペロンについては共免疫沈降法においても相互作用が確認された。この結果は、マレクチンが細胞内で様々な分泌糖タンパク質に結合することを示しており、また分子シャペロンと相互作用しフォールディングの促進に関与する可能性を示唆している。

この一連の研究結果は、マレクチンにより OST 複合体上でミスフォールド糖タンパク質の品質管理が行われること、ならびにマレクチンが新生タンパク質の生合成に関与することを初めて示したものであり、細胞内における新生糖タンパク質の品質管理の普遍的なメカニズムを示唆する成果である。また、本研究は論文提出者が主体となって計画・実験解析および考察を行ったものであり、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士（生命科学）の学位を授与できると認める。

以上 2000 字