

博士學位論文審査要旨

学位申請者氏名	栗原大輝
論文題目	分子ツールを駆使した糖タンパク質品質管理機構の化学的研究
審査委員 (職名・氏名・印)	
主査	准教授 戸谷希一郎
審査委員	教授 原 節子
	教授 久富 寿
	教授 松尾一郎
論文審査結果 (合 否)	合 格
論文審査の要旨	<p>本論文は、生命機能を制御する糖タンパク質の細胞内品質管理機構を、多様な分子ツールを駆使して化学的に解明した研究成果に関するものである。本論文は5章で構成され、第1章に緒論、第2章および第3章に研究結果、第4章に総括、第5章に実験編を記載している。</p> <p>生命機能を司るタンパク質の基本構造は、多様なアミノ酸同士が特有の配列で連結したポリペプチド構造である。このポリペプチド構造が正しくフォールディングした高次構造を獲得すると、タンパク質は固有の機能を発揮するようになる。すなわちタンパク質のフォールディング過程と生命機能は密接に関係している。一方、新生タンパク質の約3割は、根本的に正しい高次構造を獲得できない不良品である。不良品タンパク質の細胞内蓄積は、フォールディング病に総称されるアルツハイマー病やパーキンソン病、プリオン病などの発症原因となる。したがって生体恒常性の担保には、不良品タンパク質をフォールディング完成品タンパク質と正しく選別し、適切に分解する機構が不可欠である。これに対し全タンパク質の7割以上を占める糖タンパク質上の糖鎖が、糖タンパク質のフォールディング促進や選別、分解過程の制御タグとして機能する糖タンパク質品質管理機構の存在が明らかになりつつある。本品質管理機構を分子レベルで理解することは、生命機能発現の根幹を明確にする学術的意義に加え、フォールディング病の発症原因の解明や新たな治療戦略の提供に代表される工学的成果にも繋がるものと考えられる。とくに糖タンパク質の完成品と不良品の選別に関わる固有の糖鎖シグナル産生経路の解明や、不良品糖タンパク質の分解に先立つ脱糖鎖反応のペプチド特異性の解明は、本品質管理機構を分子レベルで理解するために残された命題である。本論文は、これらの命題に構造が確実な化合物を駆使して取り組んだものであり、糖タンパク質品質管理の理解を大きく進展させるものである。以下に本論文の構成と各章の詳細な内容を記す。</p> <p>第1章「緒論」</p> <p>まず糖タンパク質の生合成経路について概説した上で、本研究で解明を目指す糖タンパク質品質管理機構について、[1] 小胞体におけるフォールディング促進、フォールディングチェック、フォールディング完成品の輸送、フォールディング不良品の輸送に関与する各糖鎖シグナルの産生とそ</p>

論文審査の要旨（続）

これらのシグナルを認識する機能性タンパク質群、および [2] 細胞質に輸送されたフォールディング不良品の分解に関与する変換経路、について記述している。またそれらの経路における未解明な点について問題提起している。続いて糖タンパク質品質管理機構と細胞恒常性や疾患との関係を詳細に述べ、生物学／生理学／病理学分野に本品質管理機構の解明が与える意義を説明している。さらに糖タンパク質品質管理機構に関する既存の研究アプローチを紹介し、それぞれの利点を比較した上で、本論文で取り扱う化学的な研究アプローチの意義について述べている。最後に本研究の目的として [1] 糖タンパク質品質管理機構の上流に関わる、糖タンパク質の分泌／分解経路への輸送シグナル産生経路の解明、および [2] 本品質管理機構の下流に関わる、不良糖タンパク質に対する脱糖鎖酵素の特異性解析、について記述している。

第2章「小胞体における分泌／分解糖鎖産生経路の解明」

糖タンパク質を分泌経路や分解経路に輸送するシグナルとして、糖タンパク質上の三分岐高マンノース型糖鎖から位置特異的にマンノース残基が切断された糖鎖が使い分けられていることを概説している。続いて、これらのシグナル糖鎖産生に関与する α -1,2-mannosidase 類の特性に対する理解が曖昧である点を指摘している。これらの現状を踏まえ、未解明のシグナル糖鎖産生経路について、化学合成された糖鎖基質と酵素阻害剤を、マウス肝臓より抽出した小胞体画分に添加する独自の評価系を用いた詳細な実験を行なっている。まず5種類の化合物を対象として、それぞれ分泌シグナル糖鎖の産生に関わる糖鎖切断と、分解シグナル糖鎖の産生に関わる糖鎖切断に対する阻害能を比較し、いずれかの糖鎖切断反応を選択的に阻害できる化合物として、**Kifunensine** および **Deoxymannojirimycin (dMJ)** を見出している。また選択性の発現が阻害剤の立体配座やヒドロキシ基の配向性に由来することを考察している。続いて阻害剤の誘導體化が阻害効率や選択性に及ぼす影響を精査すべく、5種類の化合物を用いて阻害能の比較を行った。その結果、**Mannoimidazole** 骨格を有する化合物においては、疎水性置換基の導入による阻害選択性の向上を見出している。また **dMJ** 骨格を有する化合物においては、*N*-アルキル化が阻害の選択性に影響を与えないことを見出し、将来的な高機能化に叶う変換可能箇所の特定に成功している。さらに高い選択性を示した **dMJ** の選択性発現要因を理解すべく、4種類の類縁体に対する阻害能の比較を行った。その結果、4位ヒドロキシ基の配向性が阻害剤と酵素の結合に関与し、2位ヒドロキシ基の配向性が阻害選択性の発現に関与することを明らかにしている。また、この検討過程で、従来グルコシダーゼ阻害剤として知られていた **deoxynojirimycin (dNJ)** に、**dMJ** と相補的かつ選択的なシグナル糖鎖の産生阻害能があることを見出している。次に、これらの相補的な阻害剤の阻害様式を理解すべく速度論解析を行い、**dMJ** および **dNJ** が、それぞれ競争的阻害剤であることを明確にしている。これらの結果は、各阻害剤に対する標的酵素が異なることを示しており、少なくともシグナル糖鎖産生にまつわるマンノース切断工程の初期段階においては、複数の **1,2- α -mannosidase** が役割分担して使い分けられていることを、初めて実験的に明らかにしたものである。最後に、見出した2種類の相補的かつ選択的な阻害剤を用いて、小胞体内のマンノース切断の全容を明らかにすべく、経路解析を行っている。その結果、完成品糖タンパク質の分泌に関わるシグナル糖鎖産生経路と、不良品糖タンパク質の分解に関わるシグナル糖鎖産生経路が、互いに独立して存在することを初めて証明する結論を得ている。

論文審査の要旨（続）

第3章「キトビオースペンタペプチドを用いた PNGase のペプチド特異性解析」

小胞体内で生じる不良品糖タンパク質は、細胞質に輸送された後に PNGase による糖鎖除去工程を経て、プロテアソームによって分解されることを述べ、PNGase が不良品糖タンパク質の分解に重要な働きをすることを説明している。続いて、PNGase の活性不全が NGLY1 欠損症という重篤な疾患の発症に繋がることを述べている。細胞の恒常性を保つためには、PNGase が多様な不良品糖タンパク質に対して、特異性を持たずに広く働くことが必要であるが、細胞質 PNGase の糖鎖近傍のペプチド配列に対する特異性が不明であることを指摘している。これらの現状を踏まえ、ペプチド配列を系統的に制御して化学合成した様々なキトビオースペンタペプチドを基質として、哺乳動物のモデルである酵母由来の細胞質 PNGase、バクテリア由来の PNGase F、およびアーモンド由来の PNGase A に対するペプチド特異性解析を行っている。その結果、細胞質 PNGase は特段のペプチド特異性を持たないことを明らかにしている。この結果は、細胞質 PNGase が幅広い基質糖タンパク質に対応して、細胞恒常性に寄与していることを想起させるものである。また基質適用範囲が広い要因を明らかにすべく速度論解析を行った結果、本酵素が基質に応じて、親和性に依存した活性促進と反応速度に依存した活性促進を使い分けていると考察している。一方、PNGase F や PNGase A には、明確な基質特異性が存在し、全体として糖鎖近傍の疎水性が高い基質に対して高活性であることを見出している。以上を総合して、高等生物は進化の過程で細胞恒常性を担保すべく、PNGase が幅広い基質に対応する能力を獲得した可能性について言及している。

第4章「総括」

ここでは第2章および第3章で得られた成果をまとめ、糖タンパク質品質管理機構において未解明であった、小胞体内の糖タンパク質選別シグナル産生経路と、細胞質内で不良品糖タンパク質の分解に関わる脱糖鎖酵素のペプチド特異性を明らかにしたと結論している。

第5章「実験編」

本研究に関わる小胞体画分の抽出や酵素の発現、阻害剤評価、基質特異性解析などの実験手法について紹介している。

以上を要約すると、本論文は細胞恒常性に寄与する糖タンパク質品質管理機構に残された未解明問題に対して、構造が明確な化合物を駆使する化学的な手法を基軸として研究した成果をまとめたものである。その結果、小胞体内で完成品糖タンパク質と不良品糖タンパク質の選別に関与するシグナル糖鎖の産生経路を初めて明らかにしている。また細胞質において不良品糖タンパク質の分解に関与する脱糖鎖酵素 PNGase が、他の生物種由来の PNGase 類とは異なり、幅広い基質糖タンパク質に活性を示すことを見出している。これらの成果は生命の根幹に関わるタンパク質の生合成と分解に対する学術的進展への寄与に加え、将来的なフォールディング病の診断や治療に資するものであり、その理工学的意義は極めて大きい。よって、本審査委員会は本論文を博士（理工学）の学位に値するものと認める。

なお、これらの成果は申請者が筆頭著者となる2編の学術論文としてまとめられ、いずれも国際学術雑誌に掲載されている。とくに、そのうちの1編は、論文審査委員に高く評価され「Very Important Paper」および「Inside Cover」に選出されたことを付記する。 (以 上)