

氏名	前田 恵
授与した学位	博士
専攻分野の名称	農学
学位授与番号	博甲第3179号
学位授与の日付	平成18年 3月24日
学位授与の要件	自然科学研究科生命分子科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	Studies on the deglycosylation mechanism of glycoproteins in plant cell and the structural features of <i>N</i> -glycans linked to pollen allergens. (植物細胞における糖蛋白質の脱グリコシル化機構と花粉アレルギーに結合する <i>N</i> -グリカンの構造特性に関する研究)
論文審査委員	教授 木村 吉伸 教授 稲垣 賢二 助教授 田村 隆

学位論文内容の要旨

分化・成長中の植物細胞には、蛋白質から遊離したと考えられるアスパラギン結合型糖鎖 (*N*-グリカン) がマイクロモル濃度で存在するが、それらの生成機構や生理学的意義については不明である。本研究では、遊離 *N*-グリカンの生成機構と生理機能を明らかにする研究の一環として、イネ培養細胞をモデル植物として用い、細胞中の遊離 *N*-グリカンの構造解析、糖鎖遊離酵素であるエンド- β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼ (endo- β -GlcNAc-ase) の精製、酵素学的諸性質の解析、遺伝子解析と発現系の構築、内在基質検索、細胞内分布解析を行った。

イネ培養細胞からは、ハイマンノース型と植物複合型構造の2種類の遊離糖鎖が得られた。ハイマンノース型糖鎖は、そのほとんどが還元末端側にGlcNAcを1残基有することから、endo- β -GlcNAc-aseの作用により、一方、複合型糖鎖は還元末端側にGlcNAcを2残基有することから、Peptide:N-glycanase (PNGase) により生成していることが分かった。これら2種糖鎖の存在量を比較すると、ハイマンノース型糖鎖が複合型糖鎖に比べて数十倍量多く存在し、前者構造が主に可溶性画分から回収されるのに対して、後者の構造は可溶性画分と細胞外環境から回収された。この結果は、植物細胞ではendo- β -GlcNAc-aseとPNGaseは局在場所と生理的意義を異にする可能性を示唆するものと考えられる。次に、endo- β -GlcNAc-ase (nEndo-OS) を精製後、得られた酵素の内部アミノ酸配列情報から、機能未知cDNA clone AK112067が本酵素遺伝子をコードしている可能性が示されたため、この遺伝子を大腸菌で発現させたところエンドグリコシダーゼ活性が確認された。組換え酵素 (rEndo-OS) とnEndo-OSは、いずれも至適pHが6.5付近に存在し、Man α 1-2Man α 1-3Man β 1-ユニットを有するハイマンノース型糖鎖に対して強い活性を示した。更に、rEndo-OSの抗体を作成し、イネ実生細胞内における本酵素の分布を蛍光抗体法により解析したところ、Endo-OSは細胞質領域に観察された。また、本酵素の内在基質を明らかにする目的で、培養細胞中の全糖蛋白質の糖鎖構造解析を行ったところ、成熟型糖蛋白質に結合する糖鎖の殆どが本酵素に抵抗性を示す植物複合型糖鎖であることから、本酵素が蛋白質品質管理系に関与し、ミスフォールディング糖蛋白質あるいはそれらから派生した糖ペプチドを基質として機能していることが示唆された。

論文審査結果の要旨

本学位論文では、分化成長中の植物細胞に存在する遊離N-グリカンの機能解明研究の一環として、(1)イネ培養細胞中の遊離N-グリカン及び糖蛋白質糖鎖の構造・分布解析、(2)糖鎖遊離を司るエンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼ (ENGase) の酵素特性・遺伝子構造解析及び遺伝子発現系の構築と酵素の細胞内分布解析を行っている。更に、抗原性植物糖鎖とアレルギー疾患との相関を明らかにする目的で、花粉アレルゲンに結合する抗原性N-グリカンの化学構造解析を行っている。本論文は緒論を含めて5章から構成されている。第2章では、イネの培養細胞が産生する遊離N-グリカンの構造解析を行い、還元末端側にGlcNAc 1残基を有するハイマンノース型糖鎖 (HMT) が数マイクロモル濃度(μM)で細胞内に存在する一方で、還元末端側にGlcNAc 2残基を有する植物複合型糖鎖(PCT)は数ナノモル濃度 (nM) で細胞外に存在することを明らかにしている。このことから、糖鎖遊離には二種類の酵素が関与し、ENGase は細胞内で糖鎖遊離機能を司っていることを明らかにした。第3章では、イネENGase を単一精製後、ESI-MS分析により内部アミノ酸配列を決定し、その情報をもとに遺伝子検索を行っている。その結果、本酵素のアミノ酸配列が、機能未知とされていた遺伝子産物と高い相同性を有することを見出し、その機能未知遺伝子の発現系を構築した。その結果、発現蛋白質が ENGase活性を示したことから、植物ENGase 遺伝子を世界に先駆けて同定することに成功している。更に、ネイティブ酵素と組換え酵素について詳細な基質特異性解析を行い、植物ENGase が HMT糖鎖のManα1-2Manα1-3Manβ1構造を特異的に認識するサブサイトを有し、特定構造の糖鎖を基質として蛋白質から糖鎖遊離を司ることを明らかにした。また、組換え酵素を用いて抗体を作成後、それを利用した蛍光抗体染色法により ENGase が細胞質で機能していることを示した。第4章では、ENGase の内在性基質同定を目的として、イネ培養細胞中に発現されている糖蛋白質糖鎖の全構造を明らかにし、ENGase の内在基質が成熟型糖蛋白質ではなく、新生蛋白質の品質管理系で生じるミスフォールディング糖蛋白質であることを示唆した。第5章では、スギ花粉アレルゲン (Cry j 1, Jun a 1) に結合する抗原性糖鎖の全構造を決定し、ルイスa エピトープの存在を初めて明らかにした。

以上の内容を持つ本論文は、博士論文として相応しい学問的意義及び価値を有するとともに、糖鎖機能を利用したバイオテクノロジー開発や花粉症治療に向けての実用価値を有するものと判定した。