

氏 名 (本 籍)	仲 <sup>なか</sup> 山 <sup>やま</sup> 賢 <sup>けん</sup> 一 <sup>いち</sup> (茨 城 県)			
学 位 の 種 類	博 士 (農 学)			
学 位 記 番 号	博 甲 第 2,048 号			
学位授与年月日	平 成 11 年 3 月 25 日			
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当			
学 位 論 文 題 目	Studies on Glycosyltransferase and Oligosaccharide Structure in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (酵母の糖転移酵素及び糖鎖構造に関する研究)			
主 査	筑波大学教授	農学博士	日下部	功
副 査	筑波大学教授	農学博士	祥 雲	弘 文
副 査	筑波大学教授	Ph. D. (理学) 博士	多比良	和 誠
副 査	筑波大学教授	農学博士	富 田	文一郎

## 論 文 の 内 容 の 要 旨

真核生物で生産される分泌蛋白質や膜蛋白質のほとんどが、糖鎖を結合した糖蛋白質である。この糖鎖は、欠損などにより種々の病変を引き起こすことなどから、重要な役割を果たしていることが分かってきている。しかしながら、糖鎖構造の多様性や絶対量が少ないことより、その活性と構造の関連の研究は進んでいないのが現状である。このため、糖鎖の機能の解析のためには、均一で大量な糖鎖の生産を行う、糖鎖工学技術の構築が必須となっている。

ところで、酵母は真核生物であり、基本的な代謝、細胞分裂、蛋白質の分泌生産などはヒトなどの高等哺乳類と同じであり、モデル系としてその研究に大きく貢献している。また、遺伝子工学の手法が容易であることや培養が簡単なことから、有用蛋白質の生産系としても用いることができる。しかしながら、糖蛋白質生産の際には、マンノース残基が50～100残基からなる糖外鎖と呼ばれる糖鎖がN-結合型糖鎖に付加していることが問題となっていた。このマンナン糖外鎖はヒトに対して大きな抗原性を持つため、糖蛋白質生産に際し、この糖外鎖付加を取り除く必要がある。そこで、この糖外鎖を除去することを目的とし、糖外鎖付加変異株である *och1* 変異株を相補する遺伝子を取得し、この遺伝子産物 Och1p の機能解析を行うことにより糖外鎖の付加機構の解明を行った。また、O-結合糖鎖においても、大きな抗原性を持つマンノースリン酸残基の付加した糖鎖の存在を確認し、あわせて、この酸性糖鎖生合成に係わる変異の解析も行った。

*och1* 変異株を相補する遺伝子 *OCH1* を単離し、塩基配列の決定を行った結果、*OCH1* 遺伝子には480アミノ酸からなる蛋白質をコードしていることが分かった。生体外の蛋白質合成・膜透過実験や、ウエスタンブロッティングの結果から、*OCH1* 遺伝子にコードされている Och1p は膜蛋白質であり、そのC末端部分は膜の内腔側に存在するII型膜蛋白質であることが分かった。このII型膜蛋白質は、すでに知られている糖転移酵素に共通してみられる特徴であったことから、Och1p も糖転移酵素ではないかと考えられた。そこで、*OCH1* 遺伝子を破壊した株から調製した細胞壁糖蛋白質を基質として、マンノース転移酵素活性の測定をしたところ、Och1p にマンノース転移酵素活性があることが分かった。さらに、Och1p の基質特異性を、さまざまな糖鎖を用いて調べた結果、Och1p は小胞体で生産される  $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$  を基質とし、マンノースを  $\alpha$ -1,6-結合で付加する糖外鎖生合成の最初に働くマンノース転移酵素であり、厳密な基質特異性を有することが分かった。従って、*OCH1* 遺伝子を破壊することにより、高等哺乳類の高マンノース糖鎖と同一の糖鎖付加を行うことのできる酵母を分子育種する

ことが可能となった。さらに、この酵母に種々の高等哺乳動物由来の糖転移酵素などの遺伝子を導入することにより、哺乳類の生産する種々の糖鎖と同一の糖鎖を生産する酵母の分子育種に道を開くことができた。これにより、*N*-結合型糖鎖をもつ糖蛋白質の生産に酵母を使用することが可能となった。

さらに、*O*-結合型糖鎖の解析の結果、マンノース3残基からなる糖鎖にマンノースリン酸残基の結合した酸性糖鎖が存在していることが明らかとなった。このマンノースリン酸残基は $\alpha$ -マンノシダーゼ消化実験やMALDI-TOFMSの解析結果より、マンノース3糖の糖鎖の中央のマンノースに結合していることがわかった。また、この*O*-結合型糖鎖のマンノースリン酸残基の結合は、*N*-結合型糖鎖のマンノースリン酸残基付加の変異である *mnx4* と *mnx6* により阻害されることも明らかとなった。これにより、*O*-結合型糖鎖をもつ蛋白質の生産の際に、抗原性の高い*O*-結合型酸性糖鎖の付加を除く手段を得ることができた。

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

これ迄に、真核生物の分泌蛋白質や膜蛋白質は、糖蛋白質であり、これらの糖鎖は、生理的に重要な種々の役割を果たしていることが知られている。しかし、それらの糖鎖は構造の多様性や複雑性、また、生産量が絶対的に少ないなどの理由により、糖蛋白質の構造と生理活性に対する相関関係には不明な点が多い。

ヒトなどの哺乳類の基本的な代謝や細胞分裂、また蛋白質の分泌生産などは、真核生物である酵母と同様である。一方、酵母は培養や遺伝子工学的手法の導入も容易であり、また、有用蛋白質の大量生産系の開発にも適用できる。

著者は、これらの利点をもつ酵母に注目し、それをモデル系として利用して研究を推進した。まず、遺伝子工学的手法によって、哺乳類の高マンノース糖鎖と同一に糖鎖付加のできる酵母の分子育種を可能にし、酵母に種々の糖転移酵素遺伝子を導入することにより、哺乳類の生産する糖鎖と同一の糖鎖を生産することを可能にした。この結果は糖鎖の量的生産を実現し、このことによって、構造解析の困難な糖鎖構造を見事に解明した。

著者が提示した一連の研究成果は、遺伝子工学的手法により糖蛋白質の生産と糖鎖の構造解析の研究発展に寄与しており、また、著者が改良した一連の研究手法は、糖鎖工学や糖質関連酵素の研究推進にも適用でき、さらに、農業分野への寄与が大きい点において高く評価できる。

よって、著者は博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。