

## 論文内容要旨

報告 番号	甲 創 第 82 号	氏 名	桐山 慧
学位論文題目	アミノ酸置換型 GlcNAc-1-phosphotransferase $\alpha\beta$ を用いた昆虫細胞におけるマンノース 6-リン酸型糖鎖修飾の技術構築		
<p>哺乳類細胞での、リソソーム酵素に対する N 型糖鎖末端マンノース 6-リン酸 (M6P) 修飾は、二段階のプロセスによって行われる。まずシスゴルジにて GlcNAc-1-phosphotransferase (GNPT) により、N 型糖鎖の末端マンノースへ GlcNAc-1-リン酸が転移される。その後トランスゴルジにて加水分解酵素である N-acetylglucosamine-1-phosphodiester alpha-N-acetyl-glucosaminidase (NAGPA) により末端 GlcNAc が切断されることでリン酸基が露出し M6P 糖鎖修飾が完了する。</p> <p>M6P 修飾機構はヒトを含む多くの脊椎動物において保存されているが、無脊椎動物である昆虫では機能していない。また昆虫細胞を含めた異種細胞における人工的な M6P 修飾の達成は現在まで報告されていない。本研究では、昆虫細胞における M6P 修飾に関する技術構築を検討することとした。</p> <p>各種ヒト M6P 付加酵素群およびアミノ酸置換型 GlcNAc-1-phosphotransferase <math>\alpha\beta</math> (GNPTAB) をコードする遺伝子を作成し、哺乳類細胞または昆虫細胞での発現解析を行なった。クローニングリングを用いた細胞分離法により、M6P 修飾酵素およびヒトリソソーム酵素を共発現した昆虫細胞集団を獲得した。これらの細胞にアミノ酸置換型 GNPTAB を共発現させ、その培養上清を用いてリン酸基親和性クロマトグラフィーによるリン酸化タンパク質の分離を行なった。得られた各画分のリソソーム酵素活性測定を行なった。なお本研究は徳島大学遺伝子組換え実験安全管理委員会の承認を得て行なっている。</p> <p>興味深いことに昆虫細胞では M6P 付加酵素の重要なサブユニットの 1 つである GNPTAB の細胞内発現の違いが認められた。すなわち小胞体局在性および非成熟化を確認した。そこでアミノ酸置換型 GNPTAB 遺伝子をクローニングし発現解析を行なったところ、正常型 GNPTAB に比べ有意な成熟化を確認した。また細胞内局在解析を行なったところ、アミノ酸置換型 GNPTAB は正常型 GNPTAB に比べシスゴルジへの有意な局在性も認められた。さらに計 4 種類のヒトタンパク質を発現している <math>\alpha 7</math> 集団に対し空ベクター、正常型 GNPTAB、またはアミノ酸置換型 GNPTAB をそれぞれ導入し、得られた培養上清を用いてリン酸化タンパク質の分離を行なった。結果、アミノ酸置換型 GNPTAB を共発現したサンプルでは、空ベクターや正常型 GNPTAB を共発現したサンプルに比べ、溶出画分において有意に高いリソソーム酵素活性を確認した。</p> <p>本結果から、アミノ酸置換型 GNPTAB を用いることで、昆虫細胞における局在性と成熟化に関して改善できたと判断した。また <math>\alpha 7</math> 細胞集団に対しアミノ酸置換型 GNPTAB を共発現させる過程は、昆虫細胞におけるリソソーム酵素への人為的な M6P 糖鎖修飾を実現する上で極めて重要な技術であると判断された。</p>			