

## 論文審査の結果の要旨

氏名：三浦一輝

博士の専攻分野の名称：博士（生物資源科学）

論文題名：タンパク質糖鎖修飾の逆行修飾を担う酵素に関する研究

審査委員：(主査) 教授 西尾 俊幸  
(副査) 教授 山形 一雄 教授 松藤 寛  
准教授 袴田 航

ヒト細胞で普遍的に行われているタンパク質の糖鎖修飾は、タンパク質の機能発現および制御に重要な役割を果たすタンパク質の翻訳後修飾の1つである。本論文では、これら糖鎖修飾の1つであるN結合型糖鎖修飾過程の分析から得られた仮説である「ヒト細胞ゴルジ体における不良糖鎖修飾の修復機構および糖鎖発現量の調節機構の存在を明らかとすること」を目的として、これら機構を担うと推定される逆行糖鎖修飾酵素の存在を仮定し、仮定した酵素の探索と発見した酵素の糖鎖修飾における役割解明するため、以下の研究を行なった。

### 1. 糖鎖修飾に関与する新規糖質加水分解酵素の探索

仮定した酵素を探索するため、既知糖鎖修飾酵素の活性部位構造について *in silico* 解析を行った結果、糖鎖修飾酵素は Subsite -1 および Subsite +1 を持つ *exo* 型の糖質加水分解酵素であることが示され、これら解析結果に基づいて、糖鎖修飾酵素イメージングのための蛍光基質プラットフォームを開発した。さらに、本プラットフォームを用いた蛍光基質を有機化学的手法により合成し、合成した基質を用いてこれまでに報告のない仮定したゴルジ体  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性をヒト細胞に発見した。また、本プラットフォームを用いた蛍光基質によりリソソーム  $\beta$ -N-アセチルグルコサミニダーゼ活性およびリソソーム  $\alpha$ -L-フコシダーゼ活性の細胞内蛍光イメージングにも成功した。

### 2. 新規ゴルジ体 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を持つ酵素の同定

新規ゴルジ体  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を持つ酵素を明らかとするために、免疫染色および市販の蛍光基質を用いて酵素の推定を行った。その結果、ヒト細胞内の唯一の  $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子である *GLB1 gene* から生合成される *GLB1* タンパク質が本活性を有していることが示唆された。さらに、光親和性標識法により本活性を有する酵素の単離および同定を行なった。その結果、*GLB1* タンパク質に由来するペプチド断片が高いアミノ酸配列網羅率で検出されたことから、本活性を有する酵素は *GLB1* に由来するタンパク質であることが強く示唆された。

### 3. ゴルジ体 $\beta$ -ガラクトシダーゼの細胞内機能解明を目指した特異的阻害剤の探索

発見した酵素が不良糖鎖修飾の修復機構または糖鎖発現量の調節機構に関与する酵素であるかをケミカルノックダウン法により解明するため、本酵素に対する特異的阻害剤の探索系を構築し、これら探索系を用いて公的化合物ライブラリよりゴルジ体  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を特異的に阻害する計5種類の阻害剤を同定した。

本研究は、ヒト細胞における既知のN結合型糖鎖修飾に対して新たな糖鎖修飾機構の存在を示唆する研究である。さらに、本研究で開発した糖鎖修飾酵素のための蛍光基質プラットフォームは、数多くの糖質関連酵素が関与するヒト細胞内糖鎖修飾の役割解明に大きく寄与すると考えられ、さらには、糖鎖修飾研究だけではなく、翻訳後修飾研究の発展にも大きく寄与することが可能である。

よって、本論文は、博士（生物資源科学）の学位を授与されるに値するものと認める。

以上

平成 30 年 2 月 21 日