



Title	CHARACTERIZATION OF THE HUMAN MAN9-MANNOSIDASE EXPRESSED IN MICROBIAL CELLS
Author(s)	Moran, Daniel Garcia
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41468
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	MORAN DANIEL GARCIA モラン ダニエル ガルシア
博士の専攻分野の名称	博 士 (工 学)
学 位 記 番 号	第 14154 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 10 年 9 月 30 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 工学研究科 酸酵工学専攻
学 位 論 文 名	CHARACTERIZATION OF THE HUMAN MAN ₉ -MANNOSIDASE EXPRESSED IN MICROBIAL CELLS (ヒト型 MAN ₉ -MANNOSIDASE の微生物細胞における発現とその機能解析)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 吉田 敏臣 (副査) 教 授 関 達治 教 授 菅 健一 教 授 室岡 義勝 教 授 山田 宙靖 教 授 卜部 格 教 授 小林 昭雄 教 授 原島 俊

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は、ヒト型糖タンパク修飾酵素の遺伝子を酵母に導入して、その糖鎖修飾系を改変する方法の開発と得られた糖鎖修飾酵素の機能を解析した結果をまとめたもので、以下の 5 章から構成されている。

第 1 章では、本研究の背景として、生理機能上重要な細胞成分である糖タンパク質の糖鎖修飾に関する研究の現状を総括することによって、多様な酵素による複雑な過程によって行われる糖鎖の変換がほ乳類動物と酵母など微生物との間でどのように異なるかを示し、ヒト型糖鎖を有する酵素タンパクを酵母など微生物細胞を用いて生産する方法の開発を目標として酵母にヒト型糖タンパク糖鎖修飾酵素を導入しようとする本研究の目的を示すとともに得られた研究結果の概略について述べている。

第 2 章では、PCR 法を援用してヒト腎臓の Man₉-mannosidase の遺伝子を分離し、当該遺伝子を活性画分 N 末端における開始コドンと C 末端に 6 ヒスチジン残基のコドンを加えて修飾することによって *Escherichia coli* での発現が可能になり、得られた酵素タンパクを容易に精製できることを示した。さらに得られた酵素が MAN₉GlcNAc₂ オリゴ糖から 3 残基のマンノースを遊離し得ることを示している。

第 3 章では、微生物細胞を利用することによってヒト型の Man₉-mannosidase を大量に生産し得ることを示すとともに、本酵素の詳細な機能解析をはじめて行い、本研究で得られたヒト型酵素がブタやウシの肝臓から得られた同種酵素と物理化学的ならびに生化学的性質が類似しており、クラス I の mannosidase に属することを明らかにしている。

第 4 章では、酵母の N 結合型糖鎖修飾系改質の第一歩としてヒト腎臓 Man₉-mannosidase を *Saccharomyces cerevisiae* にクローニングした。酵母内で発現された酵素タンパクをアフィニティクロマトグラフィにより部分精製し、得られた酵素が、*E. coli* で発現したものと同様に MAN₉GlcNAc₂ オリゴ糖から 3 残基のマンノースを遊離し得ることを示している。また、*E. coli* ならびに *S. cerevisiae* で得られた同酵素が基質特異性の面でもブタ肝臓の Man₉-mannosidase と類似していることを明らかにしている。

第 5 章では、以上の結果を総括し、微生物細胞を用いるヒト型糖鎖を有するタンパクの多様的な合成を可能にする

技術の展開における第一歩として本研究の意義を明示しその発展について考察するとともに、生理学的に重要なヒト型タンパクの大量生産に向けての今後の課題について述べている。

論文審査の結果の要旨

近年、糖タンパク質の生理的機能が注目されており、動物起源の糖タンパク質の微生物や植物の細胞を用いる大量生産が考えられているが、生物種によって異なるタンパク質の糖鎖修飾に関する情報が十分とはいえない状況にある。そこで、本論文は、多様な酵素による複雑な過程によって行われる糖鎖の変換がほ乳類動物と細菌や酵母など微生物との間でどのように異なるかを明らかにし、ヒト型糖鎖を有するタンパクを酵母など微生物細胞を用いて生産する方法の開発を目標として、ヒト型糖タンパク修飾酵素の遺伝子を酵母に導入して、その糖鎖修飾系を改変する方法の開発と得られた糖鎖修飾酵素の機能解析を行った研究の結果をまとめたもので、以下に要約するようにいくつかの新しい知見を得ている。

- (1) 糖鎖修飾酵素の一つである $\text{Man}_9\text{-mannosidase}$ の遺伝子を、ヒト腎臓より取得したのち、当該遺伝子を微生物細胞内で発現させる方法について検討し、酵素タンパクの精製が容易にならしめるため C 末端に 6 残基のヒスチジン残基のコドンを加えるなど、活性画分の両端に修飾を加えて、*Escherichia coli* 細胞で活性のある酵素タンパクとして発現させている。このようにヒト型糖鎖修飾酵素遺伝子を微生物細胞で発現させ、酵素活性を確認したことは新しい成果である。
- (2) 上記の方法で得られたヒト型酵素タンパクについて、物理化学的ならびに生化学的諸性質を検討し、酵素の機能解析を行い、他種動物から得られている同種酵素の諸性質と比較検討した結果、既知の動物由来酵素と類似した性質を有することを確認している。これまで、ヒト型 $\text{Man}_9\text{-mannosidase}$ の性質は調べられておらず、この研究によってはじめて、酵素学的諸性質が明らかとなり、mannosidase としての分類的位置づけが可能となつた。
- (3) *E. coli* 細胞での成果をもとに、ヒト腎臓由来の $\text{Man}_9\text{-mannosidase}$ 遺伝子を *Saccharomyces cerevisiae* で発現させることに成功し、さらに得られた酵素タンパクの諸性質を検討し、*E. coli* で得られたものと同様、動物組織で得られている酵素と類似の性質が得られることを確認している。このように、糖タンパクを合成し、糖鎖修飾酵素系を有する微生物である *S. cerevisiae* でヒト型の糖鎖修飾酵素を合成させることを可能にした本研究は、微生物細胞内でヒト型糖鎖ならびに新しいタイプの糖鎖を合成することのできる新規糖鎖修飾系の構築を可能にする技術の基盤を与えるものとして評価される。

以上のように、本論文は新しい糖鎖修飾系開発に必要な基盤技術について価値ある知見を得ており、生物工学、特に糖鎖工学ならびに分子育種の分野に貢献するところが大きい。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。