

学位審査報告書

(ふりがな) 氏名	はぎわら まさとし 萩原 誠智
学位(専攻分野)	博士(理学)
学位記番号	理博第 号
学位授与の日付	平成 年 月 日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	理学研究科 生物科学 専攻
(学位論文題目)	小胞体還元酵素 ERdj5 の糖タンパク質 ERAD における位置付け
論文調査委員	(主査) 森 和俊 教授 大野 睦人 教授 土井 知子 准教授

理学研究科

(続紙 1)

京都大学	博士 (理 学)	氏名	萩原 誠智
論文題目	小胞体還元酵素 ERdj5 の糖タンパク質 ERAD における位置付け		
(論文内容の要旨)			
<p>小胞体は分泌タンパク質および膜タンパク質合成の場として働く重要な細胞内小器官である。分泌および膜タンパク質は複雑な立体構造形成するものが多く、小胞体で固有の立体構造を形成した後に輸送系に乗って実際の機能部位へ運ばれていく。その立体構造はシステイン残基同士を介したジスルフィド結合により安定化される。この結合は酸化反応により形成される。そのため、小胞体は他の細胞内小器官と比較しジスルフィド形成に適した酸化環境である事が知られている。しかし、遺伝的または環境的要因により、正しい立体構造形成できないタンパク質は、異常タンパク質として認識され小胞体に留められ立体構造形成を試みられる。それでも正常な構造を取る事が出来ないタンパク質に関しては、小胞体からサイトゾルに逆行輸送され、ユビキチンプロテアソーム系により分解される。この機構は小胞体関連分解 (ER-associated degradation, ERAD) 機構と呼ばれる。</p> <p>多くの分泌タンパク質、膜タンパク質は N 結合型糖鎖をもつ糖タンパク質である。糖タンパク質の品質管理は糖鎖のトリミング状態で判断される。EDEM1 は異常タンパク質の持つ糖鎖を認識し、選択的に ERAD へ導くレクチンである。</p> <p>また正しい立体構造を取る事の出来ないタンパク質に関しては、分子間ジスルフィド結合を形成し、多量体化、凝集体化する事がある。これらは逆行輸送チャンネルのポアサイズより大きい為、ERAD では分解されにくい。</p> <p>EDEM1 に結合する因子として同定された ERdj5 は、J ドメインと 4 つの活性型チオレドキシシン (Trx) 様ドメインを持つユニークなタンパク質である。ERdj5 は J ドメインで小胞体 HSP70 である BiP と結合し、また Trx 様ドメインは還元活性を持つ事が明らかにされた。また異常タンパク質間のジスルフィド結合を還元する事で、多量体化した異常タンパク質を単量体にし糖タンパク質 ERAD を促進する事が明らかにされていた。</p> <p>本研究は ERdj5 の各ドメインにおける詳細な解析、X 線結晶構造解析、更には EDEM1、BiP および ERAD 基質との経時的な相互作用を調べる事により以下の結果を得た。</p> <p>1) 4 つある活性型 Trx 様ドメインに関しては</p> <ul style="list-style-type: none">・ <i>in vivo</i> において Trx3、Trx4 ドメインで ERAD 促進、還元活性があった。・ <i>in vitro</i> において Trx1、Trx3 および Trx4 ドメインに還元酵素活性があり、酸化還元電位は Trx1 が -166mV、Trx3 が -172mV、Trx4 が -185mV であった。 <p>2) 九州大学、大阪大学との共同研究による X 線結晶構造解析において</p> <ul style="list-style-type: none">・ ERdj5 の全体構造を 2.4 Å の高解像度で得る事に成功した。・ Trxb1 と Trxb2 という 2 つの不活性 Trx 様ドメインを持つ事がわかった。・ ERdj5 は構造的に J-、Trx1、Trxb1、Trxb2、Trx2 ドメインからなる N 末端クラスターと Trx3、Trx4 ドメインからなる C 末端クラスターという 2 つのクラスター単位に分ける事ができた。 <p>3) ERdj5 と ERAD 基質、EDEM1 および BiP との関係に関して</p> <ul style="list-style-type: none">・ ERdj5 は EDEM1 および ERAD 基質と C 末端クラスターで相互作用する。・ ERdj5 は EDEM1 と複合体を形成して働き、カルネキシンから ERAD 基質を受け取る。・ EDEM1-ERdj5 複合体から BiP に ERAD 基質を受け渡す。 <p>得られた結果をまとめ、ERdj5 の『糖タンパク質 ERAD における機能的な位置づけ』を明らかにした。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

EDEM1 に結合する因子として同定された ERdj5 は、J ドメインと 4 つの活性型チオレドキシソ(Trx)様ドメインを持つユニークなタンパク質であった。ERdj5 は J ドメインで小胞体 HSP70 である BiP と結合し、また Trx 様ドメインは還元活性を持つ事が明らかにされた。また異常タンパク質間のジスルフィド結合を還元する事で、多量体化した異常タンパク質を単量体にし糖タンパク質 ERAD を促進する事が明らかにされていた。

しかしながら、ERdj5 が糖タンパク質 ERAD において、どの段階で機能しているのか、ERAD の流れにおける位置付けは明らかになっていなかった。

本研究は ERdj5 の位置付けを明らかにするため以下の 4 点に着目し研究がなされた。

(i) ERdj5 の持つ 4 つの活性型 Trx 用ドメインの *in vivo*、*in vitro*での活性

(ii) ERdj5 全長の立体構造

(iii) ERdj5 と EDEM1 および ERAD 基質との結合部位

(iv) ERdj5 とその他 ERAD に関わる因子との前後関係

そして結果として以下の事を明らかにした。

1) 4 つある活性型 Trx 様ドメインに関しては

- ・ *in vivo*において Trx3、Trx4 ドメインで ERAD 促進、還元活性があった。
- ・ *in vitro*において Trx1、Trx3 および Trx4 ドメインに還元酵素活性があり、酸化還元電位は Trx1 が -166mV 、Trx3 が -172mV 、Trx4 が -185mV であった。

2) 九州大学、大阪大学との共同研究による X 線結晶構造解析において

- ・ ERdj5 の全体構造を 2.4\AA の高解像度で得る事に成功した。
- ・ Trxb1 と Trxb2 という 2 つの不活性 Trx 様ドメインを持つ事がわかった。
- ・ ERdj5 は構造的に J-、Trx1、Trxb1、Trxb2、Trx2 ドメインからなる N 末端クラスターと Trx3、Trx4 ドメインからなる C 末端クラスターという 2 つのクラスター単位に分ける事ができた。

3) ERdj5 と ERAD 基質、EDEM1 結合部位に関して

- ・ ERdj5 は EDEM1 および ERAD 基質と C 末端クラスターで相互作用する。

4) ERdj5 と他の ERAD 因子との前後関係に関して

- ・ ERdj5 は EDEM1 と複合体を形成して働き、カルネキシンから ERAD 基質を受け取る。
- ・ EDEM1-ERdj5 複合体から BiP に ERAD 基質を受け渡す。

以上の結果をまとめる事で、ERdj5 の『糖タンパク質 ERAD における機能的な位置づけ』を明らかにした。この結果はアメリカの科学誌である「Molecular Cell」誌に発表された。

よって、本論文は博士(理学)の学位論文として価値あるものと認める。また、平成 23 年 1 月 21 日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った。その結果合格と認めた。

要旨公開可能日： 年 月 日以降