

氏 名	もり と だい すけ 森 戸 大 介
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学位記番号	理 博 第 3313 号
学位授与の日付	平 成 20 年 3 月 24 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 学 専 攻
学位論文題目	囊胞性繊維症膜コンダクタンス制御因子のユビキチン化機構の研究

論文調査委員 (主 査)
教授 永田和宏 教授 七田芳則 教授 大野陸人

論 文 内 容 の 要 旨

囊胞性繊維症膜コンダクタンス制御因子 (CFTR) は囊胞性繊維症の原因遺伝子産物として同定された12回膜貫通タンパク質であり、細胞表面の塩素イオンチャネルとしてはたらく。しかし、CFTRは野生型、疾患原因変異型ともに高次構造異常を起こしやすく、そのため、構造異常タンパク質の除去機構である小胞体関連分解により分解され、大部分が細胞表面に到達しない。

CFTRの分解はサイトゾルのユビキチン/プロテアソーム系分解によることが分かっているが、これまで哺乳類培養細胞を用いた研究から、2つのユビキチン化酵素、CHIP, RMA1が、CFTRのユビキチン化に関わることが明らかにされていた。一方、酵母の遺伝学的手法を用いた研究から、酵母に exogenous に発現させたCFTRの分解には、酵母のユビキチン化酵素Hrd1pが関わるということが分かっていた。現在、酵母Hrd1pの哺乳類オルソログは2種知られており、gp78, HRD1と呼ばれている。

本研究においては、哺乳類細胞内でのCFTRの分解におけるgp78とHRD1の寄与が検討されている。

培養細胞を用いた過剰発現実験から、疾患原因変異型CFTRの分解にはgp78のみが寄与し、HRD1は寄与しないことが示された。次に、gp78とHRD1のドメイン交換実験から、gp78のCUEドメインが変異型CFTRとの結合に必要な十分であることが分かった。なお、HRD1はCUEドメインを持たないため、変異型CFTRと結合しないことが示唆された。CUEドメインはこれまでユビキチン結合ドメインとして知られていた。そこで申請者は、gp78は、他のユビキチン化酵素によって変異型CFTRに付加されたユビキチンと、CUEドメインを介して結合して、さらに追加的なユビキチン化を行う酵素であることを予想した。この仮説を検証するため、*in vitro*のユビキチン化実験が行われ、gp78はユビキチンがあらかじめ付加された基質のみを選択的に認識し、ユビキチン化する活性を持っていることが示された。

gp78が、あらかじめユビキチン化された基質を追加的にユビキチン化する酵素であったことから、細胞内でgp78に先立って変異型CFTRをユビキチン化するユビキチン化酵素の存在が予想された。そこで、申請者はRNAi法を用いてそのようなユビキチン化酵素の探索を行い、変異型CFTRをユビキチン化することがこれまでに知られていたRMA1がgp78に先立って変異型CFTRをユビキチン化する酵素であることを見出した。また、gp78とRMA1は、小胞体関連分解の関連因子であるDerlin-1を介して複合体を形成することが示唆された。

以上から、申請者は、哺乳類小胞体において、RMA1とgp78が複合体を形成し、逐次的に変異型CFTRをユビキチン化し、囊胞性繊維症の発症に寄与するというモデルを提唱した。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究の主題は、遺伝性疾患の原因遺伝子産物CFTRの分解機構の解明である。このような主題を含む本研究には二つの研究上の意義が認められる。1) 本研究により、囊胞性線維症の発症機序の理解が進んだこと、2) 本研究により哺乳類

の小胞体関連分解機構の理解が進んだこと、の二つである。

嚢胞性線維症は重篤かつ発症頻度の高い疾患であることから、研究対象として高い興味を持たれる。また、小胞体関連分解は真核生物に共通するタンパク質分解機構で、多数の因子からなる複雑な機構や、真核生物の生存に essential な役割をはたしているらしいことから、やはり研究対象として高い興味を持たれる。

本研究は、このいずれの研究分野においても重要な進捗をもたらすもので、十分に本質的な主題にそって研究が行われたものと考えられた。

本研究は、手法の上では、哺乳類培養細胞における過剰発現系と遺伝子発現抑制系、in vitro の酵素 assay 系を用いて遂行された。

本研究は、1) 変異型 CFTR の分解における二つのユビキチン化酵素の活性の比較から始まり、2) それらの酵素の構造、機能的な差異の同定、3) 同定された差異の生物学的意義の解明、4) 以上から推測された gp78 と他の因子との機能相関の解明、という順序で論理的、逐次的に展開され、破綻がない。

また、各段階で立てられた仮説の証明に適切な手法がそのつど選択され、仮説を判断する上で明瞭な結果が得られていることから、研究計画の立案、遂行の点において本研究は十分な quality を備えていると考えられた。

本研究について行われた博士学位の公聴会、試問から、申請者が、研究の背景、意義を十分に把握し、十分に自発的に研究に取り組んだと認められた。

以上から、本論文を博士学位論文として価値あるものと認め、本論文に関する試問の結果、合格と認める。