

学 位 審 査 報 告 書

(ふりがな) 氏 名	すぎうら よしみ 杉浦 仁美
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) チオレドキシシン様ドメインを持つ新規小胞体膜タンパク質の機能解析	
論 文 調 査 委 員	(主査) 森 和俊 教授 青山 卓史 教授 細川 暢子 准教授

理 学 研 究 科

(続紙 1)

京都大学	博士 (理学)	氏名	杉浦仁美
論文題目	チオレドキシン様ドメインを持つ新規小胞体膜タンパク質の機能解析		
(論文内容の要旨)			
小胞体は分泌タンパク質や膜タンパク質の合成の場である。分泌タンパク質や膜タンパク質の多くは小胞体においてジスルフィド結合を形成する事で正しい立体構造へと折り畳まれる。このため小胞体はジスルフィド結合形成に適した酸化的環境にあり、これに加えて Protein disulfide isomerase (PDI) などのチオレドキシン(Trx)様ドメインを持つ、Trx スーパーファミリータンパク質が、小胞体におけるジスルフィド結合形成に関わる品質管理を行っている。哺乳動物の小胞体には、このような Trx スーパーファミリータンパク質が約 20 種類同定されており、ジスルフィド結合形成を促進する酸化酵素 PDI や、誤ったジスルフィド結合の架け替えを行う ERp57 などの異性化酵素、あるいはミスフォールドしたタンパク質のジスルフィド結合を切断し、小胞体関連分解(ERAD)を促進する還元酵素 ERdj5 などが知られているが、その多くは細胞内における機能が明らかにされていない。 本論文は、その 1 つであり、小胞体膜上に局在すると考えられている Transmembrane Thioredoxin-like Protein (TMX) ファミリータンパク質、その中でも新規性の高い TMX2、TMX4 と TMX5 の機能解析を行ったものである。 本論文により、TMX2、TMX4 は小胞体膜に局在し、TMX5 は小胞体から <i>cis</i>-Golgi にかけて局在する可能性が示唆された。TMX2 はサイトゾル側、TMX4 と TMX5 は小胞体内腔側に Trx 様ドメインを持つことを明らかにした。また、TMX2 および TMX4 の Trx 様ドメインの精製に成功し、<i>in vitro</i> における TMX2 および TMX4 の Trx 様ドメインの酸化還元酵素活性を調べると、TMX2 は不活性で、TMX4 は小胞体で還元酵素として機能する可能性が示された。TMX5 に関しては、小胞輸送に関与するタンパク質との相互作用が示唆され、初期分泌系における小胞輸送に関与する可能性が提唱された。 更に TMX4 と TMX5 に関しては、細胞内機能に関する詳細な解析が行われた。複合体解析を行ったところ、内在性の TMX4 は小胞体関連分解(ERAD)に関与するタンパク質群ではなく、小胞体のプロダクティブフォールディング複合体に含まれる可能性が示唆された。また、産業技術総合研究所との共同研究により TMX4 と相互作用するタンパク質を質量分析法により網羅的に解析したところ、TMX4 がタンパク質のフォールディングに関与する可能性が示された。この結果から、TMX4 は小胞体 Trx スーパーファミリータンパク質の中で初めてのフォールディング複合体に含まれる還元酵素であると示唆された。TMX5 については、産業技術総合研究所およびカナダ・マギル大学との共同研究による網羅的相互作用解析によって相互作用が明らかになった p24 ファミリータンパク質との関係性に着目し、詳細に解析を進めた結果、TMX5 と p24 は、安定的に相互作用する事が明らかになった、このことから、TMX5 は p24 と複合体として機能することで、小胞体、<i>cis</i>-Golgi 間に留まり、小胞輸送に関与する可能性が示唆された。			

(論文審査の結果の要旨)

小胞体膜上には、カルネキシンや ERp57 など構成されるフォールディング複合体や ERAD 複合体、そしてゴルジ体への小胞輸送に関与するタンパク質群など、タンパク質品質管理において重要な因子が数多く存在しているが、これらの因子と酸化還元（レドックス）との関係性はほとんど明らかにされていない。また、細菌類では、酸化的フォールディングの場であるペリプラズムにおいて、DsbB、DsbD、VKOR などの膜タンパク質が、膜を介した電子伝達を行い、ジスルフィド結合の品質管理機構において重要な役割を果たしている。このことから、小胞体膜に存在する Trx スーパーファミリータンパク質である TMX ファミリータンパク質の性質を明らかにする事は非常に重要であると考えられた。しかしながら、これまでに TMX ファミリータンパク質について詳細に機能解析された例は少ない。これまでの先行研究では、TMX1 と TMX3 に関する報告が数報あるのみで、いずれもその局在や酸化還元酵素活性を明らかにするものに留まっていた。このため TMX ファミリー全体として、生体内における機能についてはほとんど明らかにされていないのが現状であった。

本論文は新規の TMX ファミリータンパク質である TMX2、TMX4 および TMX5 について網羅的に解析を行っている。この研究により、(1) TMX2 が小胞体に局在し、サイトゾル側に存在する Trx 様ドメインが不活性であること、(2) TMX4 が小胞体でプロダクティブフォールディングに関与する還元酵素であること、(3) TMX5 が小胞体～*cis*-Golgi で p24 と複合体を形成して機能していることを明らかにした。

特に、(1)(2)に関しては、TMX2 および TMX4 の酸化還元酵素活性の有無を生化学的手法により明確にした。(2)に関しては、細胞内酸化還元状態の解析を行い、TMX4 の酸化還元酵素としての機能を制御する細胞内因子の可能性が示唆された。また TMX4 が還元酵素として小胞体タンパク質品質管理機構においてどのように機能しているか、という疑問点に迫る解析が行われ、TMX4 が ERAD に与える影響に関する解析や相互作用解析、およびショ糖密度勾配遠心法を用いた解析により、TMX4 が、ERAD ではなく、プロダクティブフォールディングに関与する可能性が示された。以上、TMX4 に関する結果は、アメリカ生化学・分子生物学会の会報誌である *The Journal of Biological Chemistry* 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：平成 24 年 4 月 1 日以降