

學位審查報告書

(ふりがな)	あらき かずたか
氏 名	新木 和孝
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)	
小胞体品質管理機構の基盤としての酸化還元酵素ネットワークの解析	
論 文 調 査 委 員	(主査) 森 和俊 教授 七田 芳則 教授 藤吉 好則 教授

理 学 研 究 科

京都大学	博士（理学）	氏名	新木 和孝
論文題目	小胞体品質管理機構の基盤としての酸化還元酵素ネットワークの解析		
(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構造形成の場として、小胞体品質管理機構(ERQC)と呼ばれる精巧な品質監視システムを備えている。構造異常タンパク質が発生した場合には、小胞体関連分解(ERAD)やオートファジーなどによる分解機構によって処分する。小胞体新生タンパク質の多くは、ジスルフィド結合の付加や糖鎖修飾などの翻訳後修飾を受けることが知られている。ジスルフィド結合形成を促す酸化的フォールディングは、Ero1-PDI パスウェイを中心とする酸化酵素反応によって駆動されており、PDI 以外にも 20 種類以上の酸化還元酵素が存在している。しなしながら、それらのレドックス制御機構や生理的機能に関しては、これまでのところ分かっていないことが多かった。 酸化還元酵素の一つである ERdj5 は、ERAD に関与するレクチン様タンパク質 EDEM と相互作用する因子として同定された。本研究において ERdj5 の生化学的解析を行ったところ、ERdj5 は還元的レドックスポテンシャルを保持し、還元酵素活性を示すこと、DnaJ ドメインを介して BiP と ATP 依存的に結合し、その加水分解を促進することが明らかになった。共同研究者の研究から、ERdj5 は分解基質のジスルフィド結合を切断し、BiP と協調しながら ERAD を促進するという知見が得られており、本研究の生化学実験と合わせて、小胞体で初めての還元酵素の同定とその機能解析に成功した。 続いて、小胞体酸化還元酵素の制御機構を明らかにするため、Ero1αを中心とする酸化酵素カスケードに注目した研究を行った。その結果 Ero1αが PDI を酸化する過程で、PDI の a ドメインから a'ドメインへの分子内電子伝達機構が存在することを見出した。さらにプロテオミクス解析により Ero1αと相互作用する酸化還元酵素群を同定し、Ero1αとそれらの物理的・機能的相互作用の詳細な解析を体系的に行った。その結果、Ero1α-PDI からなる制御コンプレックスが、小胞体酸化還元酵素の活性調節に中心的な役割を果たしていること、その際には PDI の a'ドメインを介して Ero1αの酸化力が伝達されることを明らかにした。PDI family タンパク質の相互作用解析と、これらのレドックスポテンシャル値の関係からも、PDI は他の PDI ファミリー因子を酸化しうることが示唆された。PDI が Ero1αと相互作用することで、Ero1αのシャトルシステイン(Cys99)の可動性が上がり、Ero1αの活性調節と電子伝達効率が促進されるという制御コンプレックスの本質的機能も、NMR 解析により見出された。これらの研究から、小胞体酸化還元酵素の間には、Ero1α-PDI 制御コンプレックスを中心として、レドックスポテンシャルと相互作用関係に相関した、方向性のある電子伝達ネットワークが存在することが明らかになった。			

(論文審査の結果の要旨)

小胞体は、分泌タンパク質や膜タンパク質の構造形成を行うオルガネラである。そのためにタンパク質の構造形成や成熟を促進する多岐に渡る酵素を用意している。小胞体で合成される新生タンパク質の多くは、ジスルフィド結合の付加や糖鎖修飾などの翻訳後修飾を受けることが知られている。その中でもジスルフィド結合形成に関しては、タンパク質の構造安定化などに寄与することが知られ、小胞体は酸化的な環境を用意し、その反応に関わる酸化還元酵素も多数用意することでその反応を促進している。この酸化的フォールディングの中心的な役割を担っているのが **Ero1-PDI** パスウェイである、**PDI** 以外にも 20 種類以上の酸化還元酵素が同定されているが、それらの制御機構や生理的な機能に関しては、未だ多くのことが分かっていない。

まず小胞体酸化還元酵素の一つである **ERdj5** の機能解析を行った。**ERdj5** は、**ERAD** に関与するレクチン様タンパク質 **EDEM** と相互作用することから、レドックス活性依存的な **ERAD** における何らかの機能が予想された。そこでレドックス活性を保持するのかどうかを明らかにするため、**ERdj5** の生化学的機能解析を行ったところ、**ERdj5** は還元的レドックスポテンシャルを持ち、還元酵素活性をもつことが判明した。さらに **ERdj5** の **DnaJ** ドメインに関する機能解析の結果、**DnaJ** ドメインは **BiP** と **ATP** 依存的に相互作用し、その **ATP** 加水分解を促進することも明らかになった。これらの研究により、小胞体で初めての還元酵素が明らかになり、共同研究者による細胞生物学的解析と併せて、**ERdj5** の還元活性が分解基質のジスルフィド結合の切断に利用され、**BiP** とも協調しながら **ERAD** を促進するという新規のメカニズムが明らかになった。

続いて、**Ero1 α** を中心とする酸化カスケードに注目し、**Ero1 α** から **PDI** への電子伝達関係に注目した機能解析を行った。その結果、**Ero1 α** が **PDI** を酸化する過程で、**PDI** の **a** ドメインから **a'** ドメインへの分子内電子伝達機構が存在することを見出した。さらに **Ero1 α** と相互作用する酸化還元酵素群をプロテオミクス解析により同定し、これらの酸化還元酵素群と **Ero1 α** との物理的・機能的相互作用に関しての詳細な機能解析を行った。その結果、**Ero1 α -PDI** からなる制御コンプレックスがハブとなり、小胞体酸化還元酵素の活性調節に中心的な役割を果たしていること、その際には **PDI** の **a'** ドメインを介した電子伝達反応が存在することを明らかにした。また **Ero1 α** の **NMR** を用いた動態解析を行い、**PDI** と **Ero1 α** との相互作用により、**Ero1 α** のシャトルシステイン(**Cys99**)の可動性が上がることも見出した。この結果は、**PDI** が **Ero1 α** を活性化し、**Ero1 α** の分子内電子伝達効率を高めるという、**Ero1 α -PDI** の相乗効果における分子メカニズムである可能性が強く示唆された。

以上の研究から、小胞体酸化還元酵素の間には、**Ero1 α -PDI** 制御コンプレックスが中心となり、方向性のある電子伝達経路が小胞体酸化還元酵素間に存在することが明らかになった。これらの研究成果は、小胞体酸化還元酵素の制御機構の一端を示すことに繋がる重要な意義をもつものであると考えられる。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られ、平成 24 年 1 月 24 日に、論文内容とそれに関連した口頭試問を行い、その結果合格と認めた。