

学 位 審 査 報 告 書

(ふ り が な) 氏 名	にながわ さとし 蜷 川 暁
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) 小胞体関連分解構成因子 Derlins、SEL1L および EDEM ファミリータンパク質の解析	
論 文 調 査 委 員	(主査) 森 和俊 教授 阿形 清和 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	蛭川 暁
論文題目	小胞体関連分解構成因子 Derlins、SEL1L および EDEM ファミリータンパク質の解析		
(論文内容の要旨)			
小胞体では、新規合成された分泌タンパク質や膜タンパク質の品質管理が行われており、正常構造をとったタンパク質のみが分泌経路へと進む。異常構造のタンパク質は小胞体に留められ、どうしても構造をとれない場合は小胞体関連分解 (ERAD) によって分解される。ERAD の特徴は、小胞体内腔の異常タンパク質が、細胞質に逆行輸送され、ユビキチン-プロテアソーム経路で分解されることである。本研究では、酵母に比べて複雑化した高等動物 ERAD の分子メカニズムを解析した。 第 1 章では、ERAD 構成因子 Derlin-1 及び Derlin-2 結合タンパク質として新規に同定した Derlip-1 (Derlin interacting protein-1) の機能を解析した。Derlip-1 は、小胞体内腔でタンパク質の folding に関わる酵母 Emc1 とホモログであった。Derlip-1 は異常タンパク質 NHK と、正常タンパク質 α1-PI の両方に結合した。Derlip-1 を knockdown しても NHK の分解には影響がなかったが、α1-PI の分泌が遅れた。Derlip-1 を knockdown して分泌タンパク質全体への影響を調べると、いくつかのタンパク質で分泌が遅れていた。Derlip-1 は分泌に関与し、シャペロン様の機能をもっているのではないかと推測される。Derlip-1 は、Derlin へと基質をリクルートすることが考えられる。 第 2 章では、相同組換え効率の高いニワトリ DT40 細胞に着目して、高等動物 ERAD を逆遺伝学的に解析する実験系の確立を目的とし、ERAD 構成遺伝子 SEL1L の knockout 細胞作製とその表現型の解析を行った。哺乳動物における知見と同様に、ニワトリ SEL1L は可溶性の異常タンパク質である NHK、NHK-QQQ の分解に必要であったが、膜タンパク質として存在する NHK_{BACE}、CD3 δ の分解には必要なかった。また哺乳動物 SEL1L を SEL1L knockout 細胞に導入すると、表現型が回復し、哺乳動物とニワトリの種間で遺伝子の機能が代替可能なほどに保存されていることがわかった。これらの結果は、逆遺伝学を用いた解析のできる DT40 細胞が高等動物 ERAD メカニズム解析の強力なツールになることを示している。 第 3 章では、DT40 細胞を用いて ERAD 構成遺伝子 EDEM1, 2, 3 のシングル、ダブル、トリプル knockout 細胞の解析を行った。それぞれの EDEM シングル knockout 細胞では、NHK の分解に顕著な影響は見られなかったが、EDEM トリプル knockout 細胞では、NHK の分解が遅れた。また EDEM トリプル knockout 細胞では、N 型糖鎖のトリミングが抑制されていた。野生型 DT40 細胞と EDEM トリプル knockout 細胞の糖鎖プロファイリングを比較すると、EDEM が Man8B 型糖鎖、Man7A 型糖鎖、Man6 型糖鎖の産生に関わっていることがわかった。EDEM トリプル knockout 細胞で、適切な糖鎖のトリミングが起こっていなかったことが原因で NHK の分解が遅延したと考えられる。			

(論文審査の結果の要旨)

小胞体内の構造異常タンパク質は、細胞質へ逆行輸送され、ユビキチン・プロテアソームシステムにより分解される。この小胞体関連分解の分子機構は、遺伝学的解析が可能な出芽酵母を用いて解明されてきた。一方、高等動物における小胞体関連分解の分子機構の理解は遅れている。その理由として、マウスを用いた遺伝子破壊には多大な労力と経費を要することがあげられ、このため、多くの実験成果はノックダウン法の結果に基づいている。しかしながら、ノックダウン法では、オフターゲット効果(標的遺伝子以外の遺伝子産物に影響を与えている可能性)や残存タンパク質の貢献を考慮しなければならない上に、酵母では1つしか存在しない遺伝子が高等動物では複数存在することがしばしば見られ、このような重複によってノックダウン効果が顕著にあらわれない可能性が考えられる。

蜷川は、この問題に取り組むため、例外的に遺伝子組換え効率が高く、6種類の選択マーカーを使用できるため、多重変異株さえ比較的容易に作成することができるニワトリ DT40 細胞に着目して解析した。

まず、酵母～ニワトリ～マウス～ヒトにおいて1種類ずつしか存在しない SEL1L を DT40 細胞で破壊した。その結果、哺乳動物細胞で示されているように、可溶性の異常タンパク質の場合は糖鎖が付いていても付いていなくても破壊株で分解が抑制されるが、膜貫通型の異常タンパク質の分解は影響を受けないことを示した。本結果は、DT40 細胞が高等動物小胞体関連分解の分子機構を解明する上で、極めて有用なモデルとなることを初めて示したものである。

次に、酵母では1種類であるが、ニワトリ～マウス～ヒトにおいては3種類ずつ存在する EDEM ファミリータンパク質(EDEM1、EDEM2、EDEM3)の解析を行った。その結果、EDEM1、EDEM2、EDEM3 を欠くトリプルノックアウト細胞では、膜貫通型の異常タンパク質や糖鎖が付いていない可溶性の異常タンパク質の分解は影響を受けないが、糖鎖が付いた可溶性の異常タンパク質の分解が有意に遅れることを見いだした。この原因を解明するため、異常タンパク質の大きさを調べたところ、トリプルノックアウト細胞ではアスパラギン残基に共有結合しているN型糖鎖のプロセッシングが阻害されていることがわかった。さらに、ミクロソーム画分を用いて、糖鎖のプロファイリングを調べたところ、マンノースが8～6個付いた糖鎖の割合が減少し、マンノースが9個付いた糖鎖の割合が顕著に増加していた。本結果は、EDEM ファミリータンパク質が糖鎖のトリミングを行うマンノシダーゼ活性をもち、EDEM ファミリータンパク質によるマンノースのトリミングが異常糖タンパク質の分解に重要であることを初めて示すものである。

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る。また、平成23年10月13日に論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。