

論文内容の要旨

申請者氏名 細田 章

真核細胞において多くの膜タンパク質や分泌タンパク質は、小胞体内で糖鎖付加やジスルフィド結合などの翻訳後修飾を受け、正しく折りたたまれる。細胞質などと同様に小胞体内のタンパク質濃度は非常に高いために、新たに生合成されたポリペプチドは、分子シャペロンや折りたたみ反応を触媒する酵素の助けなしには正しい立体構造をつくりあげることができない。また、立体構造不全を起こしたタンパク質は再び正しい形に折りたたまれたり、分解のために細胞質へ移送されたりするが、これらの過程にも分子シャペロンが密接にかかわっている。このように小胞体に局在する分子シャペロンや折りたたみ反応を触媒する酵素は、小胞体の品質管理機構に非常に重要な役割を果たしている。これら分子シャペロンに代表される小胞体内腔に局在する可溶性タンパク質は、その C 末端に特徴的な KDEL またはその派生型の小胞体保持シグナルを持つものが多い。当研究室では、この KDEL モチーフをコードする塩基配列を *in silico* プローブとしたマウス EST データベース検索により、数種の新規遺伝子断片を取得している。本論文で私は、そのうちの 1 つである DnaJ ドメインとチオレドキシンモチーフの両方を持つ新規小胞体タンパク質 JPDI の同定と機能解析について報告する。

JPDI は 793 アミノ酸からなり、一次構造解析から N 末端に小胞体へのシグナル配列とそれに続く DnaJ ドメイン、さらに 4 つのチオレドキシンモチーフを持つおよそ 87KDa のタンパク質であることが判明し、ヒト及び線虫のデータベースに相同性の高いタンパク質の存在が確認された。ノザンプロット解析から JPDI はほとんどの組織で発現していること、また、小胞体ストレス条件下でも転写量に変化がないことが確認された。エピトープタグを融合させた JPDI を発現させた培養細胞において、免疫染色では JPDI は小胞体内腔に存在する PDI と同一の染色像を示した。また JPDI は小胞体型である N 結合型糖鎖修飾を受けており、マイクロソーム画分を用いたプロテアーゼプロテクションアッセイでは、界面活性剤非存在下において JPDI はプロテアーゼによる消化から守られた。これらのことから JPDI は小胞体内腔に局在するタンパク質であることが確認された。リコンビナントタンパク質を用いた *in vitro* の解析から、JPDI の DnaJ ドメインは小胞体分子シャペロン BiP/GRP78 と ATP 依存的に結合し、BiP の ATPase 活性を促進することが示された。チオレドキシンモチーフの機能に関して、ジスルフィドイソメラーゼ活性や、チオールリダクターゼ活性を示すことはできなかったが、*in vitro* でインスリンに対して凝集防止効果が見られたことから JPDI がシャペロン活性を持つ可能性が示唆された。JPDI は BiP と協調したポリペプチドの効率的な折りたたみや、立体構造不全を起こしたタンパク質の解きほぐしに関与しているのではないかと考えている。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 細田 章

動物細胞の小胞体には、分泌タンパク質や膜タンパク質のフォールディングを助けるための分子シャペロンや酵素が存在する。これらのタンパク質の多くは、C末側に小胞体に保持されるための -KDEL あるいはその類似配列をもつ。新規小胞体シャペロン遺伝子を単離する目的で、この KDEL モチーフをプローブにマウス EST データベースを検索した結果、いくつかの新規遺伝子を取得することができた。本研究は、その中の JPDI と名付けた新規遺伝子についてその機能を解析したものである。

JPDI は 793 アミノ酸からなる新規のタンパク質で、一次構造解析から N 末端に小胞体へのシグナルペプチド、続いて DnaJ ドメイン、さらに 4 つのチオレドキシンモチーフをもつ興味深いタンパク質である。データベースサーチからヒト及び線虫にも相同性の高いタンパク質が保存されていることがわかった。ノザンブロット解析から JPDI は各種の臓器でユビキタスに発現しており、小胞体ストレスによる転写レベルでの誘導はほとんど認められなかった。細胞内での局在を、N 結合型の糖鎖修飾、プロテアーゼプロテクションアッセイ、蛍光抗体法の 3 方法により調べ、小胞体内腔に局在するタンパク質であることを明らかにした。組換えタンパク質を用いた *in vitro* の解析から、JPDI の DnaJ ドメインは小胞体分子シャペロン BiP と ATP 依存的に結合すること、また BiP の ATPase 活性を促進する機能をもつことが明らかとなった。チオレドキシン様ドメインに関しては、予想されるジスルフィドイソメラーゼ活性やチオールレダクターゼ活性を検出することは今のところできていない。これらの結果から、JPDI は BiP と協調して新規に合成されてくるポリペプチドの効率的なフォールディングや、立体構造不全を起こしたタンパク質のときほぐしに関与する新規の小胞体コシャペロンと考えられる。

以上のように、本研究は、動物細胞小胞体内腔で BiP と協調して働くと考えられる新規の DnaJ ドメインをもつコシャペロン JPDI について初めて解析したものであり、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（バイオサイエンス）の学位論文として価値あるものと認めた。