

論文内容の要旨

申請者氏名 Sopha Pattarawut

The J-protein family is an evolutionary conserved protein group whose members share a J-domain that promotes the binding of an Hsp70 family member to unfolded proteins and enhances ATPase activity of the Hsp70 protein. The J-protein/Hsp70 teams play important roles in a variety of cellular processes, including protein synthesis, folding, and degradation.

Recent studies have shown that a mammalian ER-localized transmembrane J-protein, DNAJB12, cooperates with Hsc70, a cytosolic Hsp70 family member, to promote the degradation of misfolded ER membrane proteins in a process called ER-associated degradation (ERAD). *In silico* search of mammalian genomes has identified DNAJB14, which exhibits a high similarity to DNAJB12. In this study, I aimed to reveal the basic character and function of this protein.

I first studied the expression of *DNAJB14* by RT-PCR using total RNA from mouse tissues. Interestingly, compared with *DNAJB12* mRNA that was widely expressed in mouse tissues, *DNAJB14* mRNA was expressed more weakly, being most abundant in testis, implying its specific role in this tissue.

To characterize DNAJB14, I raised antibodies specific for the N- and C- termini of this protein. The immunostaining and proteinase K protection assay revealed that, like DNAJB12, DNAJB14 is an ER-localized, single membrane spanning protein with its J-domain in the cytosol. Further, co-immunoprecipitation showed that DNAJB14 also binds Hsc70 via its J-domain.

Next, I tested whether DNAJB14 can also accelerate the degradation of misfolded membrane proteins by performing cycloheximide chase experiments. Strikingly, the overexpression of DNAJB14 greatly enhanced the degradation of CFTR Δ F508, a misfolded polytopic membrane protein, in a manner dependent on the function of the proteasome. Similarly, DNAJB14 accelerated the degradation of T-cell receptor α subunit, a single-pass membrane protein, but failed to stimulate the degradation of null-Hong Kong (NHK) variant of α 1-antitrypsin (A1AT), a misfolded ER luminal protein. Thus, DNAJB14 resembles DNAJB12 in its architecture, and basic function.

In summary, my work has established that the mammalian ER possesses two analogous J-proteins (DNAJB14 and DNAJB12) that can promote the ERAD of misfolded transmembrane proteins. Whether they have evolved to play distinct roles *in vivo* must await further studies.

論文審査結果の要旨

申請者氏名 Sopha Pattarawut

Jタンパク質ファミリーは進化的に保存された一群のタンパク質である。その分子内には、J領域という共通配列が存在する。Jタンパク質の多くは、このJ領域を介して熱ショックタンパク質Hsp70と結合し、そのATP水解活性を高める。Jタンパク質とHsp70両者は協調して働き、細胞内のタンパク質の合成や分解、折り畳みや会合に関し重要な役割を担っている。最近、動物細胞工学研究室では、小胞体膜に局在しJ領域をサイトゾル側に向けた新規の膜タンパク質DNAJB12を見出した。DNAJB12はサイトゾルのHsc70と協調して働き、小胞体の構造異常膜タンパク質の小胞体関連分解に関することを報告した。そこで哺乳動物ゲノムを*in silico*で探索した結果、DNAJB12に非常に高い相同性をもつDNAJB14というJタンパク質を見出した。本研究はDNAJB14の構造と細胞内での生理機能を明らかにするために行ったものである。

最初に、マウスの各臓器から全RNAを抽出し、DNAJB14の発現をRT-PCRにより調べた所、DNAJB12はユビキタスに発現していたが、DNAJB14の発現量は一般的に低く、発現が一番高い臓器は精巣であった。DNAJB14の機能を調べるために、N末側、C末側領域に対する抗体を作製した。この抗体を用いて、まず、このタンパク質の細胞内局在およびトポロジーを調べたところ、DNAJB14は、DNAJB12と同様、小胞体の1型膜タンパク質であり、J領域をサイトゾル側にもっていた。また免疫共沈降実験により、DNAJB12と同様Hsc70がJ領域に結合していることが明らかとなった。

次にDNAJB14が小胞体膜の構造異常タンパク質の分解を促進するかどうかを調べた。構造異常タンパク質のモデルとして、嚢胞性線維症膜コンダクタンス制御因子(CFTR)の508番目のPheが欠失したCFTR Δ F508を用いた。DNAJB14を過剰発現すると、CFTR Δ F508は野生型に比較しより早く分解すること、この分解はプロテアソーム依存的に起こることがわかった。また別の構造異常モデル膜タンパク質として、T細胞受容体 α サブユニットを単独で発現させた所、この異常膜タンパク質もDNAJB14の過剰発現により分解が早まることが明らかとなった。一方、小胞体内腔の可溶性構造異常タンパク質である α 1-antitrypsinのヌルホンコン型変異タンパク質(NHK)の分解には、全く影響を与えることはなかった。このことは、DNAJB14は小胞体内腔の異常タンパク質の分解には関与しないが、小胞体膜にある構造異常タンパク質を特異的に分解することを示唆しており、この性質はDNAJB12と非常に似ていることがわかった。

要約すると、本論文は、小胞体膜にはJ領域をサイトゾル側に向けた1型の膜タンパク質としてDNAJB12の他に、もう1つDNAJB14が存在し、精巣で特異的に発現が高いこと、また小胞体膜の構造異常タンパク質の分解を促進する機能をもつことを明らかにしたものである。

以上のように、本論文は新規の小胞体膜タンパク質DNAJB14が小胞体膜に局在する構造異常膜タンパク質を特異的に分解促進する活性をもつことを示したもので、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。