

| | | | |
|---------|--|------|---------|
| 氏名(本籍) | ひら やま ひろ と 平 山 弘 人 (神奈川県) | | |
| 学位の種類 | 博 士 (理 学) | | |
| 学位記番号 | 博 甲 第 4686 号 | | |
| 学位授与年月日 | 平成 20 年 3 月 25 日 | | |
| 学位授与の要件 | 学位規則第 4 条第 1 項該当 | | |
| 審査研究科 | 生命環境科学研究科 | | |
| 学位論文題目 | Biological Function of O-linked Sugar Chain in Protein Quality Control (タンパク質の品質管理機構における O-結合型糖鎖の生物学的機能) | | |
| 主査 | 筑波大学教授 (連携大学院) | 農学博士 | 地 神 芳 文 |
| 副査 | 筑波大学教授 | 理学博士 | 漆 原 秀 子 |
| 副査 | 筑波大学教授 | 理学博士 | 白 岩 善 博 |
| 副査 | 筑波大学准教授 | 理学博士 | 吉 村 建二郎 |

論 文 の 内 容 の 要 旨

真核生物のタンパク質合成は、小胞体における品質管理機構 (ERQC) によって厳密に制御されている。新たに合成されたタンパク質のうち、正しい構造をとれなかったタンパク質 (ミスフォールドタンパク質) はシャペロン等の働きにより正しい立体構造へと誘導されるが、それでも正しくフォールディングできなかったタンパク質は小胞体から細胞質へ逆行輸送の後に、プロテアソームで分解を受けることが知られている。これら一連の反応は小胞体関連分解 (ERAD) と呼ばれている。

出芽酵母における唯一の O-結合型糖鎖修飾である O-マンノシル化は、小胞体内腔においてタンパク質 O-マンノース転移酵素 (Pmt1p-Pmt6p) によって開始される。出芽酵母における O-マンノシル化は、細胞壁の恒常性維持、タンパク質の安定化、タンパク質の分泌など、生育に必須なことは以前から知られていたが、Pmt1p, pmt2p によって幾つかのミスフォールドタンパク質がミスフォールド時にのみ O-マンノシル化され、ミスフォールドタンパク質の ER における凝集の緩和に寄与することが、最近、新たに報告された。しかし、これらミスフォールドタンパク質への O-マンノシル化を *PMT1*, *PMT2* 遺伝子を破壊して阻害しても、分解の遅れは殆ど見られないことから、小胞体内腔における O-マンノース転移反応と ERQC の関連については、依然不明な部分が多く残されていた。本研究は、ERQC や ERAD に関わる因子が高等生物とほぼ共通である出芽酵母を研究材料として、ミスフォールドタンパク質における O-マンノース転移反応の生理的機能を解析したものである。

N および O-結合型糖鎖、そして GPI アンカーの修飾を受けるモデル ERAD 基質 Gas1*p を用いて、ERQC における O-マンノシル化の生理的役割を解析した。まず、Gas1*p がミスフォールドタンパク質特異的な O-マンノシル化を受けているか否かを調べるため、Pmt 転移酵素群により転移された O-マンノースの量を Gas1*p と Gas1p の間で比較した。その結果、Gas1*p への O-マンノース付加量は Gas1p に比べて有意に増加しており、このことは、Gas1*p もミスフォールドタンパク質特異的な O-マンノシル化を受けていることを強く示唆している。そこで、*PMT1-PMT6* 遺伝子の単独破壊株を用いて Gas1*p への O-マンノシル化に働く Pmts を同定したところ、Gas1p の O-マンノシル化には Pmt4p と Pmt6p が関与しているが、Gas1*p の O-

マンノシル化には Pmt4p や Pmt6p だけでなく Pmt1p と Pmt2p も関与していることが明らかになった。

次に、Pmt4p, Pmt6p による Gas1p および Gas1*p への O-マンノシル化と、Pmt1p, Pmt2p による Gas1*p への O-マンノシル化の間に、生理的な機能に差があるかどうかを調べるために、種々の PMT 遺伝子破壊株上における Gas1*p の分解速度をパルスチェイス実験により解析した。その結果、野生株, *pmt1Δ pmt2Δ* 二重破壊株, *pmt4Δ pmt6Δ* 二重破壊株の間では Gas1*p の分解に差はなかったが、*pmt1Δ pmt2Δ* 破壊株上で液胞プロテアーゼをコードする *PEP4* 遺伝子を破壊した *pep4Δ pmt1Δ pmt2Δ* 三重破壊株上では Gas1*p の分解が遅れることが明らかになった。

そこで、Pmt1p, Pmt2p 欠損時に、Gas1*p は細胞内輸送経路を経て液胞まで輸送されて液胞プロテアーゼ依存的な分解を受けるかどうかを調べるため、ゴルジ体から液胞への選別輸送 (Golgi-to-vacuole sorting 経路) で重要な役割を果たしている Vps30 複合体 II の構成因子 Vps38p を Pmt1p, Pmt2p と共に欠損させた三重破壊株 (*vps38Δ pmt1Δ pmt2Δ*) を使って Gas1*p の分解速度を解析した。その結果、野生株や *vps38Δ* 株に比べて、*vps38Δ pmt1Δ pmt2Δ* では、Gas1*p の分解が有意に遅れることが明らかとなった。従って、Pmt1p, Pmt2p 欠損時に Gas1*p はゴルジ体を介した輸送経路で液胞まで輸送され、液胞プロテアーゼ依存的な分解を受けることが示唆された。

最後に、Pmt1p, Pmt2p による O-マンノシル化が Gas1*p の凝集を緩和するかどうかを検討するため、ショ糖密度勾配遠心法により GPI アンカーが付加しない Gas1*p (sol-Gas1*p) の凝集の程度を野生株, *pep4Δ* 単独破壊株, *pep4Δ pmt1Δ pmt2Δ* 三重破壊株の間で比較した。その結果、*pep4Δ pmt1Δ pmt2Δ* 株内における sol-Gas1*p は、野生株内での sol-Gas1*p に比べて、凝集する傾向にあることが示された。

審査の結果の要旨

以上の結果から、Pmt1p, Pmt2p によって過剰に O-マンノシル化された Gas1*p は、ERAD 経路を介したプロテアソーム依存的な分解を受けることが示された。一方、Pmt1p および Pmt2p の欠損により O-マンノシル化が低下した Gas1*p は、プロテアソーム依存的な分解を受けることができず、Vps30 複合体 II の働きを介した Golgi-to-vacuole sorting 経路を経て液胞へと選別輸送されて、液胞プロテアーゼ依存的な分解を受けることが示された。本研究は、O-マンノシル化が、ミスフォールドタンパク質の凝集緩和に機能するだけでなく、ERAD 経路により小胞体内腔から細胞質へと輸送されてプロテアソーム依存的な分解を受けるために必要な、何らかのシグナルとして機能している可能性を示唆するものである。

よって、著者は博士 (理学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。