

論文内容の要旨

申請者氏名 山本 洋平

細胞内ではフォールディングに失敗した異常タンパク質が恒常的に生じている。細胞はこれらを認識して修復または分解、無毒化することにより、恒常性を維持している。小胞体で構造異常タンパク質が生じると、これらのタンパク質は小胞体からサイトゾルへと逆行輸送された後、プロテアソーム系で分解される。この過程は小胞体関連分解(ER-associated protein degradation; ERAD)と呼ばれている。構造異常膜タンパク質の分解に関しては、出芽酵母において ER 膜に局在する DnaJ タンパク質である Hlj1 が基質の分解を促進することが報告されていた。しかし、高等真核生物で膜タンパク質の分解に関与する DnaJ family タンパク質は同定されていなかった。私は、その候補として DNAJB12 に着目した。このタンパク質は、酵母からヒトまで保存されているが、その機能は不明であった。トポロジー解析、免疫染色実験、及び免疫沈降実験から、DNAJB12 は小胞体に局在する II 型の一回膜貫通タンパク質であり、自身の J-domain を介して、Hsc70 (サイトゾルの Hsp70 ファミリータンパク質) と結合することが判明した。次に、DNAJB12 の過剰発現及び siRNA を用いた、ノックダウン法により小胞体の構造異常膜タンパク質の分解に及ぼす影響をパルスチェイス実験で調べた。その結果、DNAJB12 はこのようなタンパク質に対して、著しい分解促進能を持つことが明らかになった。

さらに、DNAJB12 の細胞内における更なる機能解析をするために、質量分析法を用いて DNAJB12 の相互作用因子の探索を行った。その解析の結果、DNAJB12 の相互作用因子として p62 (Sqstm1/A170) が同定された。p62 は高等動物のサイトゾルに局在するタンパク質であり、アポトーシスなどの様々なシグナル伝達や選択的オートファジーに関与していることが報告されている。その過程において細胞内で p62 の存在量が制御されることが、細胞の恒常性維持に重要であることも報告されている。このことから私は DNAJB12 が小胞体膜上で p62 を分解し、アポトーシスをはじめとするシグナル伝達を制御しているのではないかと予想した。実験の結果、細胞内で p62 の一部は DNAJB12 依存的にプロテアソーム系で分解促進されることが明らかになった。さらに、DNAJB12 依存的な p62 の分解は、どのような生理的な意義を持つか調べる目的で、DNAJB12 の発現抑制が細胞のアポトーシスにおよぼす影響を検証した。アポトーシス誘導条件下、DNAJB12 のノックダウンをおこなうと、アポトーシスを起こしている細胞の割合が著しく上昇した。この結果から、DNAJB12 はアポトーシスの制御にも重要であることが示唆された。本研究から、p62 の量を適切なレベルに保つために、小胞体の膜タンパク質 DNAJB12 が重要な役割を果たしているという新知見を得た。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 山本 洋平

細胞内では構造異常タンパク質が常に生じており、これらのタンパク質が分解される事で細胞内の恒常性が保たれている。さらに、タンパク質分解はシグナル伝達物質などの分解を通して細胞内プロセスの制御に関わっていることも知られている。構造異常膜タンパク質の分解に関しては、出芽酵母において小胞体膜に局在する DnaJ タンパク質である Hlj1 が基質の分解を促進することが報告されていた。しかし、高等真核生物で膜タンパク質の分解に関与する DnaJ family タンパク質は同定されていなかった。

申請者は、哺乳動物細胞の小胞体膜に局在する新規の膜タンパク質である DNAJB12 が、小胞体内の可溶性の構造異常タンパク質の分解には関与しないが、小胞体膜上の構造異常膜タンパク質の分解をプロテアソーム系で促進すること、その分解には Hsc70 が関わっていることを初めて明らかにした。さらに、DNAJB12 の細胞内における更なる機能解析をするために、質量分析法を用いて DNAJB12 の相互作用因子の探索を行った。その結果、DNAJB12 の相互作用因子として p62 (Sqstm1/A170) を同定した。p62 は高等動物のサイトゾルに局在するタンパク質であり、アポトーシスをはじめとする様々なシグナル伝達の制御や選択的オートファジーに必要な分子である。一方、細胞内に p62 が過剰量存在すると、アポトーシスの異常亢進や細胞の癌化などを引き起こす事がわかっている。このことから、細胞内の p62 は適切な量に保たれる必要があると考えられる。申請者は p62 タンパク質の分解制御に、今まで報告されていたオートファジーによる分解だけでなく、DNAJB12 を介したプロテアソーム系も関与していること、DNAJB12 依存的な p62 の分解がアポトーシスの異常亢進を抑制する働きをもつことも明らかにした。このことから DNAJB12 は細胞内の恒常性を維持する上で極めて重要な役割を果たしていることが申請者の研究により初めて明らかとなった。

以上のように、本論文は哺乳動物細胞において DNAJB12 が構造異常膜タンパク質の分解だけでなく、サイトゾルにおける p62 の新たな代謝制御にも関与していることを明らかにしたもので、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。