

論文内容の要旨

申請者氏名 Indah Wijayanti

真核生物のモデルである酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は、高温やエタノールなどのストレス下で傷害を受けた異常タンパク質の修復・除去システムを備えている。当研究室では、酵母の生存に必須な唯一の HECT 型ユビキチンリガーゼ Rsp5 を介したストレス応答に着目しており、異常タンパク質を特異的に認識し、分解する分子機構の解明を目指している。これまでに、細胞膜上のアミノ酸パーミアーゼ Gap1 をモデル基質として解析を行い、機能欠損型変異 *rsp5*^{A401E} および高機能型変異 *RSP5*^{T357A} を同定しているが、他の基質タンパク質の認識や結合に重要なアミノ酸残基に関する知見は少なかった。本研究では、パーキンソン病などの神経変性疾患の原因であるヒト α -シヌクレインを新たなモデル基質として、新規 *RSP5* 変異株の単離と機能解析を行った。

まず、 α -シヌクレインの過剰発現による細胞毒性が、*rsp5*^{A401E} および $\Delta vps1$, $\Delta end3$ 変異株において増強されたことから、酵母においても α -シヌクレインが Rsp5 によるユビキチン化を介したエンドサイトーシスによって分解されることを示した。しかしながら、Gap1 に対するユビキチン化能を向上させる高機能型変異体 *Rsp5*^{T357A} は α -シヌクレインによる毒性を軽減しなかった。そこで、新たな Rsp5 変異体の取得を目指し、Ala401 や Thr357 を含み Rsp5 による基質認識に重要な WW ドメインのランダム変異導入ライブラリーをプラスミドで作製した。これを用いた遺伝学的スクリーニングの結果、Thr255Ala, Asp295Gly, Pro343Ser, Asn427Asp の 4 種類の Rsp5 変異体が、 α -シヌクレインの過剰発現による酵母の増殖遅延を抑制することを見出した。

これらのうち、*RSP5*^{D295G}, *RSP5*^{P343S}, *RSP5*^{N427D} 変異は、 α -シヌクレインの分解速度を向上させるとともに、 α -シヌクレインの過剰発現に伴う細胞内の活性酸素種 (ROS) レベルの上昇を抑制した。中でも *Rsp5*^{P343S} は、野生型 Rsp5 と比べて α -シヌクレインとの *in vivo* における相互作用を促進し、さらに α -シヌクレインのユビキチン化レベルも増加させたことから、 α -シヌクレインの認識、ユビキチン化、分解を特異的に促進させる新規な高機能型変異であると結論づけた。一方で、*RSP5*^{T255A} 変異は、酢酸に対する耐性を向上させたことから、 α -シヌクレインの過剰発現によるストレスと酢酸ストレスに共通する未知の標的タンパク質の分解を促進している可能性が考えられた。

以上の結果から、WW ドメインが Rsp5 による基質認識の特異性を生み出すことによって、ストレスにより生成する多様な異常タンパク質を選択的に認識し、分解するメカニズムの一端を明らかにすることができた。 α -シヌクレインに特異的な活性型変異は、同様のメカニズムにより α -シヌクレインを分解する哺乳類にも応用可能であり、また、*RSP5*^{T255A} 変異の同定は、木質バイオマスからのエタノール製造時に課題となる酢酸ストレスの軽減に繋がると期待される。このように本研究では、Rsp5 を標的とした酵母の分子育種が創薬開発やバイオ燃料生産にも有用である可能性が示された。

(別紙2)

論文審査結果の要旨

申請者氏名 Indah Wijayanti

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は発酵生産環境において、エタノール、浸透圧、冷凍、高温、乾燥、酸化などのストレスにより生じる異常タンパク質を選択的に認識・除去するメカニズムを有している。Nedd4 ファミリーに属する酵母のユビキチンリガーゼ Rsp5 は生育に必須であり、上記のストレス下において重要な役割を担っている。申請者は、ヒト α -シヌクレインの過剰発現による細胞毒性を緩和する新規 Rsp5 変異体の単離と機能解析を通して、以下に示す新たな結果や重要な知見を得た。

- 1) α -シヌクレインの過剰発現により誘導される酵母の増殖遅延は、既知の高機能型変異体 Rsp5^{T357A} では抑圧されず、新たに単離された Rsp5^{T255A}, Rsp5^{D295G}, Rsp5^{P343S}, Rsp5^{N427D} 各変異体によって特異的に抑圧されることを見出した。
- 2) 4種類の新規変異体のうち、D295G, P343S, N427D 変異は、過剰発現された α -シヌクレインの分解を促進することを明らかにした。また、これと矛盾することなく、D295G, P343S, N427D 変異は、 α -シヌクレインの過剰発現により誘導される活性酸素種 (ROS) の生成も低減化することを示した。
- 3) 免疫共沈実験により、P343S 変異が Rsp5 と α -シヌクレインの *in vivo* における相互作用を強化させることを明らかにした。
- 4) *In vivo* ユビキチン化アッセイの結果から、P343S 変異が Rsp5 による α -シヌクレインのユビキチン化能を向上させることを明らかにした。
- 5) アミノ酸配列比較解析により、Pro343 残基が 2 つの β -シートに挟まれたループ構造上に位置しており、当該領域が、Rsp5 による基質認識の特異性を生み出す上で重要な役割を果たす可能性を提唱した。
- 6) ストレス耐性試験の結果、T255A 変異が酵母の酢酸ストレス耐性を特異的に向上させることを見出した。

申請者は、RSP5 遺伝子上の異なるアミノ酸残基の変異が、異なる基質タンパク質のユビキチン化と分解能に影響を与え、多様なストレス応答性の表現型を生み出すことを明らかにした。 α -シヌクレインは、ヒトにおいても同様のメカニズムで Nedd4 ユビキチンリガーゼを介した分解により除去されている。本研究で得られた知見は、 α -シヌクレインにより引き起こされる神経変性疾患 (パーキンソン病など) の発症メカニズムや治療方法の確立に貢献できる可能性がある。また、T255A 変異の同定により、酢酸ストレス耐性の向上した有用な産業酵母が育種できる可能性が示された。

以上のように本論文は、申請者が作製したランダム変異導入ライブラリーを用いて新規 Rsp5 変異体を単離し、基質認識の特異性を生み出す分子メカニズムの一端を明らかにしたものであり、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。