

論文内容の要旨

申請者氏名 曾川 愛守榮

近年、ペプチド鎖伸長反応においてリボソームが mRNA 上で停滞する「翻訳停止」という現象が見出されてきた。翻訳停止が起きた場合、新生ポリペプチド鎖（新生鎖）は Ribosome associated protein Quality Control (RQC) に従って分解される。RQC では翻訳停止によって生じた 60S リボソーム・新生鎖複合体に E3 ligase の Listerin が結合し、新生鎖をユビキチン化してプロテアソームによる分解を促進する。現在、RQC はサイトゾルにおいて新生鎖の凝集体形成を防ぐことに生理的意義があると考えられている。一方、RQC は小胞体膜上で停滞したリボソームに対してもはたらくが、その生理的意義は不明である。よって本研究では小胞体膜上における RQC の生理的意義を明らかにすることを目的とした。

まず哺乳動物細胞において小胞体膜上で RQC の標的となる小胞体タンパク質の作製を試みた。コンストラクトとして正電荷アミノ酸のアルギニンをもつ小胞体タンパク質 Fluc-ER[R30] を作製し、Fluc-ER[R30] が小胞体膜上で RQC の標的になるのかを解析した。ショ糖密度勾配遠心法によるポリソーム解析とジギトニン分画法による小胞体への局在を観察した結果、Fluc-ER[R30] は共翻訳的に小胞体へと局在することが明らかとなった。また Listerin のノックダウンにより Fluc-ER[R30] のタンパク量が増加し、Listerin のレスキュー実験によりタンパク量が減少したことから、Fluc-ER[R30] が小胞体膜上で RQC の標的となることを示した。

次に Listerin ノックダウンと小胞体局在型 RQC の基質の一過的発現を組み合わせると RQC 不全にした結果、分泌タンパク質の膜透過が低下していることを見いだした。さらに、Listerin をノックダウンすると小胞体タンパク質はプロテアソーム系で分解促進されていることが明らかとなった。また、Listerin ノックダウン時の UPR 活性の検証により、RQC 不全時には十分量の分泌・膜タンパク質が合成できないことも示唆された。

以上の結果は、小胞体では、RQC 不全時に長期的なリボソームの停滞によってトランスロコンが閉塞され、膜透過が阻害されることで分泌・膜タンパク質量が減少し、小胞体の恒常性が破綻することを支持している。これまで、RQC はサイトゾルでの新生鎖の凝集体形成を防ぐために必要と考えられてきたが、本研究はこれに加え、RQC は分泌・膜タンパク質の膜透過制御も担っており、小胞体の恒常性維持に重要な役割をもつという新しい知見を示した。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 曾川 愛守榮

新生鎖の品質管理機構 (RQC) は mRNA 上で停滞したりボソームの新生鎖を分解し、サイトゾルにおいて新生鎖の凝集体形成を防ぐ重要な機構であると考えられている。一方、近年 RQC は小胞体膜上でも働くことが報告されているが、小胞体膜上での RQC の生理的意義はいまだ明らかとなっていない。申請者は小胞体膜上での RQC の生理的意義として、トランスロコン上での長期的なりボソームの停滞を解消することでトランスロコンの閉塞を回避しているという仮説を立てた。本研究は、この仮説の検証を行い、小胞体膜上での RQC の生理的意義の解明を目指したものである。

これまで RQC の研究は主に酵母を用いて進められてきた。そのため申請者は最初に哺乳動物細胞における RQC の標的となる小胞体タンパク質の作成を試みた。RQC の標的となる小胞体タンパク質の候補として Fluc-ER[R30] を作製し、ショ糖密度勾配遠心法を用いたポリソーム解析とジギトニン分画による解析から、Fluc-ER[R30] は共翻訳的に小胞体へと局在すること、さらに RQC における E3-ligase である Listerin のノックダウン及びそのレスキュー実験により、Fluc-ER[R30] が Listerin によって分解促進されることを示した。これらの結果から Fluc-ER[R30] は RQC 標的小胞体タンパク質であることが明らかとなった。

ついで申請者は、Listerin ノックダウンと小胞体局在型 RQC の基質の一過的発現を組み合わせると細胞を RQC 不全にした結果、分泌タンパク質の膜透過が低下していることを明らかにした。さらに Listerin をノックダウンすると、小胞体タンパク質はプロテアソーム系で分解促進されていることが示された。また、Listerin ノックダウン時の UPR 活性の検証により、RQC 不全時には十分量の分泌・膜タンパク質が合成できないことも示唆された。以上の結果は、小胞体では、RQC 不全時に長期的なりボソームの停滞によってトランスロコンが閉塞され、膜透過が阻害されることで、分泌・膜タンパク質量が減少し、小胞体の恒常性が破綻することを示している。これまで、RQC はサイトゾルでの新生鎖の凝集体形成を防ぐために必要と考えられてきたが、本研究はこれに加え、RQC は分泌・膜タンパク質の膜透過制御も担っており、小胞体の恒常性維持に重要な役割をもつという新しい知見を示した。

以上のように、本論文はまだ未知な点が多い RQC において、哺乳動物細胞でも RQC が起こることを示しただけでなく、小胞体膜上における RQC の生理的意義について、分泌・膜タンパク質の膜透過の恒常性維持に重要な役割をしていることを初めて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。