

論文内容の要旨

申請者氏名 棚橋 亮弥

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は、高等生物のモデル生物として、また種々の発酵化学産業において重要かつ有用な微生物であるが、環境中の栄養分の変化およびエタノールなどの様々なストレスにより、その生育や発酵が抑制されている。酵母のユビキチンリガーゼ Rsp5 は、細胞膜上のタンパク質や細胞内の凝集タンパク質をユビキチン化することで、細胞の恒常性維持に関与している。しかしながら、Rsp5 による細胞膜タンパク質の品質管理機構や Rsp5 自身の活性機能調節、あるいは凝集タンパク質の分解・除去機構については未だ不明な点が多く残されている。そこで本研究では、主要なタンパク質分解経路の一つであるエンドサイトーシスにおける Rsp5 分子内の各ドメイン (C2 ドメイン、WW ドメイン、HECT ドメイン) に着目し、Rsp5 によるエンドサイトーシス制御機構の全体像を解明することを目的とした。

まず、広域アミノ酸トランスポーター Agp1 のエンドサイトーシス機構について解析した。その結果、Agp1 はその基質アミノ酸に応答して、Rsp5 のユビキチン化活性依存的にエンドサイトーシスされることが分かった。また、Rsp5 は Art ファミリータンパク質の Bull を介して、Agp1 のユビキチン化とエンドサイトーシスを誘導することを明らかにした。以上の結果から、基質アミノ酸により誘導される Agp1 のエンドサイトーシスは、Rsp5 と Bull を介したユビキチン化により引き起こされることが明らかになった。次に、広域アミノ酸トランスポーター Gap1 を用いて、機能が不明である Rsp5 の C2 ドメインについて解析した。その結果、C2 ドメインを欠損しても、Gap1 のユビキチン化は起こるが、エンドサイトーシスが抑制されることを明らかにした。また、C2 ドメインは、エンドサイトーシス関連タンパク質 Rvs167 との相互作用およびそのユビキチン化に必要であることを見出した。これらの結果から、Rsp5 は C2 ドメインを用いて Rvs167 をユビキチン化修飾し、エンドサイトーシスの進行を調節していることが示唆された。さらに、Rsp5 が細胞内の凝集タンパク質を除去するメカニズムについても解析した。まず、凝集体を形成することが知られているヒト TDP-43 タンパク質をモデル基質に用いた酵母の実験系を構築し、Rsp5 が WW ドメインの基質タンパク質認識能を介して TDP-43 の分解を促進することを明らかにした。また、エンドサイトーシス経路に重要な End3 タンパク質や液胞内プロテアーゼ Pep4 が、TDP-43 の凝集に起因する毒性から細胞を保護していることを示した。したがって、Rsp5 は WW ドメインを介して TDP-43 と結合し、エンドサイトーシス経路で除去することで、その毒性を緩和していることが示唆された。以上の結果より、Rsp5 は自身の各ドメインの機能を協調的に用いることで、基質タンパク質の選択およびエンドサイトーシスを介したタンパク質分解をユビキチン化修飾により厳密に制御することが示された。

やむを得ない事由[図書出版, 学術雑誌等への掲載, 特許・実用新案出願, 個人情報等の保護, その他 ()]により本要旨を非公表とする。

【※該当する事由に○印をすること】

論文審査結果の要旨

申請者氏名 棚橋 亮弥

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は、高等生物のモデル生物として、また発酵化学産業に広く利用される有用微生物であるが、実際の発酵生産環境では様々なストレスや環境変化によって、その生育と発酵が抑制されている。従って、酵母の環境適応機構の解明は、ストレス耐性を付与した酵母の育種技術の開発にも繋がり、基礎研究のみならず産業利用の観点でも重要である。申請者は、タンパク質分解を介して環境応答に深く関与している酵母のユビキチンリガーゼ Rsp5 に着目し、エンドサイトーシスにおける各ドメインの役割を解析することで、以下に示す新たな知見や重要な結果を得た。

- 1) 広域アミノ酸パーミアーゼ Agp1 は環境中の基質アミノ酸に応答し、Rsp5 依存的なユビキチン化を介してエンドサイトーシスされることを見出した。
- 2) Agp1 のエンドサイトーシスには、Rsp5 のアダプタータンパク質である Bull1 が必要であることを示した。
- 3) Rsp5 の C2 ドメインは、細胞膜タンパク質のユビキチン化に必須ではないが、エンドサイトーシスの進行に必要であることが判明した。
- 4) Rsp5 は C2 ドメインのフォスファチジルイノシトール結合能を介して、エンドサイトーシス関連タンパク質である Rvs167 と相互作用し、ユビキチン化することを明らかにした。
- 5) ヒト TDP-43 を凝集タンパク質のモデルとして用いて、Rsp5 が WW ドメインによる基質タンパク質の認識を介して TDP-43 の分解を促進することを示した。
- 6) Rsp5 を介したエンドサイトーシス経路が、TDP-43 の分解に重要であることが示唆された。

これらの結果から、Rsp5 がアダプタータンパク質を介して細胞膜上の基質タンパク質を正確に選択し、ユビキチン化することにより分解誘導することが示された。また、Rsp5 がユビキチンシグナルを用いることで、エンドサイトーシスの進行を調節する可能性が見出された。さらに、タンパク質の合成および分解のバランスが崩れた場合に、膜タンパク質の分解促進という本来の役割に加え、プロテアソームやオートファジーによるタンパク質分解経路を手助けするために、エンドサイトーシス経路を活性化することが示唆された。

以上のように本論文は、Rsp5 によるエンドサイトーシス制御機構の全体像解明を通じて、タンパク質分解におけるエンドサイトーシスおよびユビキチン化修飾の新たな機能や意義を見出したものであり、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があるものと認めた。

- やむを得ない事由[図書出版, 学術雑誌等への掲載, 特許・実用新案出願, 個人情報等の保護, その他 ()]により本要旨を非公表とする。

【※該当する事由に○印をすること】