

氏名	じょ　し　ょ　う　か 徐　　小　華
学位の種類	博士（農学）
学位記番号	甲第353号
学位授与年月日	平成16年　9月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Studies on the function of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Cne1p, a calnexin homologue (<i>Saccharomyces cerevisiae</i> のカルネキシンホモログ Cne1p の機能に関する研究)
学位論文審査委員	(主査) 加藤昭夫 (副査) 松富直利　川向　誠　松田英幸 森嶋伊佐夫

学位論文の内容の要旨

酵母 *S. cerevisiae* には真核生物に存在する糖タンパク質のフォールディングや品質管理に
関与するカルレティキュリンが存在せず、カルネキシンに相同な遺伝子 CNE1 のみが存在する。こ
のカルネキシン相同遺伝子産物である Cne1p には C 末端の細胞質領域を欠いているが、小胞体膜
に結合していることが確認されている。しかし、本酵母にはリフォールディングサイクルに関与
する糖タンパク質グルコース転移酵素 (UGGT) が存在せず、CNE1 を欠損しても表現型に顕著な違
いが見られないことから、出芽酵母のカルネキシンが機能的であるかどうかは疑問視されていた。
本研究ではこうした背景のもとに、カルネキシンホモログ Cne1p の cDNA を作成し、大腸菌で発
現分泌しその性質を調べた。

第1章では Cne1p はシャペロン活性を示すことが非特異的シャペロン基質であるクエン酸合成
酵素 (CS) を用いて明らかにされた。すなわち、Cne1p は濃度依存的に変性剤や加熱によりアン
フォールドした CS のリフォールディングを促進し、また、CS の加熱変性を抑制した。さらに、
Cne1p のシャペロン活性はそのレクチン部位に特異的に結合するモノグリコシル化オリゴサッカ
ライド (G1M9) を添加すると著しく影響を受けた。これらの結果は Cne1p が *S. cerevisiae* でシャ
ペロン分子として機能することを示していることを証明したものであり、レクチン部位に糖鎖が
結合するとシャペロン機能が大きく影響を受けることを示している。また、レクチン部位変異体
は G1M9 との結合が著しく低下し、Cne1p が糖鎖結合部位をもつことが証明され、カルネキシンと

して機能することが証明された。

第2章ではさらに詳細に Cne1p の機能を解析するために、Cne1p の糖鎖結合に関与すると考えられるレクチンドメインと機能が不明な P ドメインの cDNA を個々に作成し、各々のフラグメントの機能を調べた。P ドメイン欠損変異体は CS の加熱凝集を抑制する能力を低下し、またリフォールドの能力を著しく低下したが、糖タンパク質である IgY にも同様の影響を及ぼした。一方レクチン部位の糖鎖結合部位の変異体 (E181A, E398A) は糖タンパク質基質 IgY の凝集抑制機能を著しく低下させたが、CS に対してもシャペロン機能の低下を示した。これらの結果から Cne1p の P ドメインとレクチンドメインは共同してシャペロン機能を示すことが明らかになった。

第3章では哺乳類で知られているカルネキシンと PDI ホモログ ERp57 の相互作用が SS 結合を有するタンパク質のフォールディングに重要であることが示されているが、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* での ERp57 に相当するものが明らかにされていない。したがって、この点を明らかにするために、ERp57 ホモログと考えられる Eug1p の cDNA を作成し、大腸菌で発現分泌し、Eug1p の PDI 活性を調べ、Cne1p との相互作用を検討した。

論文審査の結果の要旨

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* には真核生物に存在する糖タンパク質のフォールディングや品質管理に関与するカルレチキュリンが存在せず、カルネキシンに相同な遺伝子 CNE1 のみが存在する。このカルネキシン相同遺伝子産物である Cne1p には C 末端の細胞質領域を欠いているが、小胞体膜に結合していることが確認されている。しかし、本酵母にはリフォールディングサイクルに関与する糖タンパク質グルコース転移酵素 (UGGT) が存在せず、CNE1 を欠損しても表現型に顕著な違いが見られないことから、出芽酵母のカルネキシンが機能的であるかどうかは疑問視されていた。本研究ではこうした背景のもとに、カルネキシンホモログ Cne1p の cDNA を作成し、大腸菌で発現分泌しその性質を調べた。

第一章では Cne1p はシャペロン活性を示すことが非特異的シャペロン基質であるクエン酸合成酵素 (CS) を用いて明らかにされた。すなわち、Cne1p は濃度依存的に変性剤や加熱によりアンフォールドした CS のリフォールディングを促進し、また、CS の加熱変性を抑制した。さらに、Cne1p のシャペロン活性はそのレクチン部位に特異的に結合するモノグリコシル化オリゴサッカライド (G1M9) を添加すると著しく影響を受けた。これらの結果は Cne1p が *Saccharomyces cerevisiae* でシャペロン分子として機能することを示していることを証明したものであり、レクチン部位に糖鎖が結合するとシャペロン機能が大きく影響を受けることを示している。また、レクチン部位変異体は G1M9 との結合が著しく低下し、Cne1p が糖鎖結合部位をもつことが証明され、カルネキシンとして機能することが証明された。

第二章ではさらに詳細に Cne1p の機能を解析するために、Cne1p の糖鎖結合に関与すると考え

られるレクチンドメインと機能が不明な P ドメイン（プロリンリッチな繰返し構造を有する）の cDNA を個々に作成し、各々のフラグメントのシャペロン機能を調べた。シャペロン基質蛋白質としての CS に加えて、糖蛋白質基質として IgY を用いた。P ドメイン欠損変異体は CS の加熱凝集を抑制する能力を低下し、またリフォールドの能力を著しく低下したが、糖タンパク基質である IgY にも同様の影響を及ぼした。一方レクチン部位の糖鎖結合部位の変異体 (E181A, E398A) は糖タンパク基質 IgY の凝集抑制機能を著しく低下させたが、CS に対しても IgY ほどではないがシャペロン機能の低下を示した。これらの結果からレクチン部位周辺にタンパク質のフォールディングに関与する領域が存在し、また Cnelp の P ドメインとレクチンドメインは共同してシャペロン機能を示すことが示唆された。

第 3 章では哺乳類で知られているカルネキシンと PDI ホモログ Erp57 の相互作用が SS 結合を有するタンパク質のフォールディングに重要であることが示されているが、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* での Erp57 に相当するものが明らかにされていない。したがって、この点を明らかにするために、Erp57 ホモログと考えられる Euglp の cDNA を作成し、大腸菌で発現分泌し、Euglp のシャペロン PDI 活性を調べ、また Euglp と Cnelp との相互作用を検討した。その結果、Euglp は SS 結合を持たない CS に対してはシャペロン活性を示さないが、SS 結合を多く含むリゾチームに対してはリフォールディング活性を示し、PDI としてのシャペロン活性を示すことを明らかにした。さらに Euglp はカルネキシンホモログ Cnelp との相互作用をすることが確認された。

本論文の結果から、これまで未知であった酵母 *Saccharomyces cerevisiae* のカルネキシンホモログ Cnelp のシャペロン機能が証明され、酵母の新生糖タンパク質の品質管理に関する研究に新規な知見を与えた。