

( 続紙 1 )

京都大学	博士 ( 理学 )	氏名	齊藤 峻介
論文題目	運動神経変性疾患の原因となる無糖鎖型 Seipin に起因する小胞体ストレスと細胞死の誘導機構の解析		
(論文内容の要旨)			
<p>小胞体内に構造異常タンパク質が蓄積する小胞体ストレス状態になった時、細胞は小胞体ストレス応答と呼ばれる進化的に保存されたシグナル伝達経路を活性化させ、小胞体内の環境改善を試みる (Mori, 2009)。しかしながら、それでも対処が不十分で小胞体ストレス状態が持続してしまう場合には細胞機能が障害され、細胞死に至る場合もある。このような小胞体ストレスが病理的な局面において発生し、病態形成に関与している可能性がある。特に神経変性疾患に関しては、家族性パーキンソン病の発症に関与するリン酸化<math>\alpha</math>-シヌクレイン (Cooper et al., 2006) や、ポリグルタミン病の原因であるポリグルタミン (Nishitoh et al., 2002)、家族性の筋萎縮性側索硬化症の原因となる SOD1 (Super Oxide Dismutase 1) (Nishitoh et al., 2008) の変異体などで、病原タンパク質が神経細胞に蓄積して小胞体ストレス応答が活性化される例がこれまでに複数報告されている。しかしながら、上記を含めて神経変性疾患の原因となるタンパク質は多くの場合、神経細胞の小胞体以外の部位 (細胞質または細胞外) に蓄積し、小胞体ストレスを含めて多岐にわたるメカニズムで細胞毒性を惹起すると考えられる。したがって、例え病原タンパク質に起因する小胞体ストレス応答の活性化を検出することができたとしても、小胞体ストレス自体が神経変性疾患の発症・進行にどの程度関与しているのかを厳密に評価することが困難であった。</p> <p>そこで本研究では、遺伝性の運動神経変性疾患である Seipinopathy の原因タンパク質である変異体 Seipin に着目した。Seipin は上記のような著名な神経変性疾患の原因タンパク質とは異なって小胞体膜に局在し、その小胞体内腔部分の相互作用を介してリング状の11量体を形成する (Yan et al., 2018)。また Seipin の小胞体内腔側には N 型糖鎖が1つ付加されており、この糖鎖が Seipin のモノマー同士の相互作用面に割り込む形で配置されることが示唆されている (Protein Data Bank: 6DS5) が、病原変異体 Seipin では N 型糖鎖の付加配列に変異が生じ、無糖鎖型 Seipin (non-glycosylated Seipin : ngSeipin) となる (Windpassinger et al., 2004)。この ngSeipin のトランスジェニックマウスの脳において小胞体ストレスが生じることが示されていたが (Yagi et al., 2011)、ngSeipin が導入された細胞の小胞体で何が起って小胞体ストレスが生じるのかについては未解明だったため、これを明らかにするべく解析を行った。</p> <p>本研究では、ショウジョウバエの Seipin が小胞体膜に存在するカルシウムイオンポンプである SERCA と結合して小胞体内へのカルシウムイオンの取り込みを促進するという知見 (Bi et al., 2014) から着想を得て、ngSeipin が小胞体膜カルシウムイオンポンプの機能に影響するかどうかを検討した。まず、ヒト大腸ガン由来の HCT116 細</p>			

胞にngSeipinを導入したところ、ngSeipinの導入量に相関して小胞体内カルシウムイオン濃度が低下すると共に、小胞体ストレスと細胞死が誘導されることがわかった。Seipin遺伝子を破壊したヒト神経芽腫由来のSH-SY5Y細胞に内在性Seipinと同程度の量のngSeipinを導入した場合にも、同様の効果が見られた。

このようなngSeipinに起因する小胞体内カルシウムイオン濃度低下が生じるメカニズムをさらに詳細に検討した。まず小胞体膜上におけるngSeipin同士の間相互作用をProximity Ligation Assay (PLA) を用いて検出したところ、ngSeipin発現細胞では野生型Seipin (wtSeipin) 発現細胞と比べて検出されるPLAシグナルが顕著に増加し、ngSeipinが小胞体膜上で凝集していることが示唆された。さらにSeipinの小胞体内腔部分を介したオリゴマー化を抑制する6種類の変異を導入したngSeipin(M6)を作製して解析したところ、ngSeipin (M6) 発現細胞ではPLAシグナルの増加は見られなかった。したがってngSeipinは小胞体内腔におけるオリゴマー化を介して凝集を引き起こすことが示唆された。このngSeipin(M6)発現細胞では小胞体内カルシウムイオン濃度が低下せず、小胞体ストレスと細胞死も誘導されなかった。次に様々な部分欠損・すげ替え変異体Seipinを作成し解析したところ、Seipinは細胞質側のC末端部分でヒト小胞体膜カルシウムイオンポンプであるSERCA2bと結合することが明らかになった。このC末端部分を欠失させたngSeipin( $\Delta$ C)は小胞体膜上で凝集するもののSERCA2bとは結合せず、その結果ngSeipin( $\Delta$ C)発現細胞では小胞体内カルシウムイオン濃度が低下せず、小胞体ストレスと細胞死も誘導されなかった。これらの結果から、ngSeipinはSERCA2bを巻き込みながら小胞体膜上で凝集する性質があり、これによりSERCA2bが不活性化されてしまうことが示唆された。

最後に、ngSeipinと共にSERCA2bを発現させ、細胞内に存在するSERCA2bの総量を増やすことでngSeipinに起因する小胞体内カルシウムイオン濃度低下を補填すると、小胞体ストレスが減弱され、細胞死も抑制されることを見出した。すなわち、ngSeipinは小胞体内カルシウムイオン恒常性維持の中核を担うSERCA2bの機能を直接阻害することで、小胞体ストレスと細胞死を誘導することを示すことができた。

これらの知見は、小胞体ストレスが神経変性疾患を引き起こすメカニズムを解明するための突破口となるのではないかと考えられる。

(続紙 2 )

(論文審査の結果の要旨)

本研究では、遺伝性の運動神経変性疾患であるSeipinopathyの原因タンパク質である無糖鎖型変異体ngSeipinに着目し、ヒト大腸ガン由来のHCT116細胞を用いて、以下の結果を得た。野生型Seipinは小胞体膜に存在し、その小胞体内腔部分の相互作用を介してリング状の11量体を形成する。一方、ngSeipinも小胞体膜に存在するが、その小胞体内腔部分の相互作用を介して凝集体を形成する。この時、ngSeipinのC末端領域が直接、小胞体膜に存在するカルシウムポンプであるSERCA2bに結合することによって、凝集体内に巻き込んでSERCA2bを不活性化する。その結果、小胞体内のカルシウム濃度が低下して小胞体ストレスが発生し、細胞死が誘導される。

この現象は、ヒト神経芽細胞腫由来のSH-SY5Y細胞に内在性Seipinと同程度の量のngSeipinを導入した場合にも観察された。これらの知見は、小胞体ストレスが神経変性疾患を引き起こすメカニズムを解明するための突破口となるのではないかと考えられる。

よって、本論文は博士（理学）の学位論文として価値あるものと認める。また、令和5年1月18日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。なお、本論文は即時全文公開とする。

要旨公表可能日：                      年                      月                      日以降