

(続紙 1)

京都大学	博士（生命科学）	氏名	村上 克洋
論文題目	VCPの関わる酸化ストレス応答の分子機構		
(論文内容の要旨)			
<p>VCP (valosin-containing protein)はAAA (ATPase associated with various cellular activities)ファミリーに属するATPaseで、ユビキチン-プロテアソーム系タンパク分解やオートファジー、小胞体やゴルジ体における膜融合など、多彩な機能に関わる分子である。ヒトにおいては、神経変性疾患の発症に関わるVCPの遺伝子変異や、種々の癌組織におけるVCPの過剰発現などが見出されており、疾患関連タンパクとして位置付けられる。これらの背景から、VCPのさらなる機能解析を進めることによって、各種細胞内イベントの詳細な理解、さらには疾患メカニズムの基礎的な理解に貢献できることが期待される。本研究では、VCPの新規機能を明らかにすることを目的とし、各種オルガネラ局在型GFPによる細胞株モデルおよびRNAiを用いたアプローチを試みた。</p> <p>RNAiによる VCP ノックダウンに伴い、ペルオキシソーム局在型 GFP の局在変化が確認されたことから、ペルオキシソームタンパク輸送における VCP の関与が示唆された。PTS (peroxisome targeting signal)と呼ばれる N 末端あるいは C 末端のペプチド配列を付加した GFP、および内在性ペルオキシソームタンパクの局在を検証した結果、VCP はペルオキシソーム内腔タンパク、特に catalase の局在に関わることが明らかになった。また、ATPase 活性欠失変異体 VCP (K251A、K524A)の発現、或いは VCP の ATPase 活性阻害剤処理により、catalase のペルオキシソーム局在配列を付加した GFP (GFP-KANL)の局在変化が生じたことから、catalase のペルオキシソーム局在には VCP の ATPase 活性が必要であることが示唆された。</p> <p>VCP の相互作用因子を探索するための免疫沈降および質量分析による解析から、VCP とペルオキシソームを関連付ける因子として、ペルオキシソーム膜タンパク輸送因子 PEX19 が得られた。PEX19 ノックダウン細胞では VCP ノックダウンと同様に、catalase の局在変化が生じたことから、VCP は PEX19 と協調して catalase の局在に寄与している可能性が考えられた。</p> <p>CatalaseはROS ( reactive oxygen species)であるH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の分解を触媒する抗酸化酵素である。VCPノックダウン細胞において、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>処理による細胞内ROSの上昇が軽減されたことから、catalaseの局在変化は、細胞にとって防御的な意義を持つことが想定された。VCPは酸化ストレス誘導時、システイン残基の酸化修飾によりATPase活性が低下することが明らかにされている。酸化ストレス誘導剤の処理によってGFP-KANLおよびcatalaseの局在変化が生じたが、酸化修飾抵抗性変異体VCP (C522T)を発現させた細胞ではその局在変化が低減されることが明らかになった。</p> <p>以上の結果から、VCPの酸化修飾とcatalaseの局在変化を介したH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>レベル調節機構の存在が示唆された。VCPは種間で高度に保存されたタンパクであるが、522番目のシステイン残基は出芽酵母では保存されていない。この知見に合致するように、出芽酵母ではペルオキシソーム局在型および細胞質局在型の2種類のcatalaseが存在している。これらの点から、VCPは高等動物が有する酸化ストレスフィードバック機構の一端を担う因子であることが推察された。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

VCP (valosin-containing protein)は AAA (ATPase associated with various cellular activities)ファミリーに属する ATPase で、ユビキチン-プロテアソーム系タンパク分解やオートファジー、小胞体やゴルジ体における膜融合など多彩な機能に関わる。VCP は神経変性疾患の発症に関わる遺伝子変異や、種々の癌組織における過剰発現が認められる疾患関連分子であり、VCP のさらなる機能解析によって、各種細胞内イベントの詳細な理解や疾患メカニズムの基礎的な理解に貢献できることが期待される。

本論文において申請者は、RNAi による VCP ノックダウンおよび各種オルガネラ局在型 GFP による細胞株モデルを用い、VCP がペルオキシソームタンパク輸送に関わることを見出した。PTS (peroxisome targeting signal)と呼ばれる N 末端あるいは C 末端のペプチド配列を付加した GFP、および内在性ペルオキシソームタンパクの局在を検証し、VCP はペルオキシソーム内腔タンパク、特に catalase の局在に関わることを明らかにした。また、ATPase 活性欠失変異体 VCP (K251A、K524A)の発現、或いは VCP の ATPase 活性阻害剤処理により、catalase のペルオキシソーム局在配列を付加した GFP (GFP-KANL)の局在変化が生じることを確認し、catalase のペルオキシソーム局在には VCP の ATPase 活性が必要であることを示した。

次に申請者は、VCP の相互作用因子を探索するための免疫沈降および質量分析による解析から、VCP とペルオキシソームを関連付ける因子としてペルオキシソーム形成因子 PEX19 を得た。PEX19 ノックダウン細胞では VCP ノックダウンと同様に、catalase の局在変化が生じたことから、VCP は PEX19 と協調して catalase の局在に寄与している可能性を見出した。

CatalaseはROS ( reactive oxygen species)である $H_2O_2$ の分解を触媒する抗酸化酵素である。 VCPノックダウン細胞において、 $H_2O_2$ 処理による細胞内ROSの上昇が軽減され、catalaseの局在変化は、細胞にとって防御的な意義を持つことが想定された。申請者が研究を行った研究室において、VCPは酸化ストレス誘導時にシステイン残基の酸化修飾によりATPase活性が低下することが明らかにされている。申請者は、酸化ストレス誘導剤の処理によってGFP-KANLおよびcatalaseの局在変化が生じること、酸化修飾抵抗性変異体VCP (C522T)を発現させた細胞ではその局在変化が低減されることを明らかにした。VCPは種間で高度に保存されたタンパクであるが、522 番目のシステイン残基は出芽酵母では保存されていない。この知見に合致するように、出芽酵母ではペルオキシソーム局在型および細胞質局在型の 2 種類のcatalaseが存在する。申請者は以上の知見をもとに、VCPの酸化修飾とcatalaseの局在変化を介した高等動物が有する酸化ストレスフィードバック機構を提示するに至った。

以上、本論文はVCPおよびPEX19 がcatalaseのペルオキシソームへの局在化に関わるという新規の知見を明らかにすると共に、VCPの酸化修飾とcatalaseの局在変化を介した細胞内 $H_2O_2$ レベル調節機構を提唱したもので、博士 (生命科学) の学位論文として価値あるものと認めた。また、平成 25 年 7 月 10 日、論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日