

## 学位審査報告書

（ふりがな） 氏名	たかた たかひろ 高田 尚寛
学位（専攻分野）	博士（生命科学）
学位記番号	論生博第 号
学位授与の日付	平成 25 年 9 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
（学位論文題目）  ヒト疾患型 VCP の出芽酵母を用いた機能解析	
論文調査委員	（主査） 垣塚 彰 教授 豊島 文子 教授 松本 智裕 教授

(続紙 1)

京都大学	博士 (生命科学)	氏名	高田 尚寛
論文題目	ヒト疾患型 VCP の出芽酵母を用いた機能解析		
(論文内容の要旨)			
<p>VCP (<u>valosin-containing protein</u>) は様々な機能を担う必須の 6 量体 AAA<sup>+</sup>(<u>A</u>TPases associated with diverse cellular <u>a</u>ctivities)-ATPase であり、全ての細胞に豊富に含まれている。加えて、VCP のアミノ酸配列の相同性は真核生物間で高度に保存されている。これまでにヒト VCP の 1 アミノ酸変異が、IBMPFD (<u>I</u>nclusion <u>b</u>ody <u>m</u>yopathy associated with <u>P</u>aget disease of bone and <u>f</u>rontotemporal <u>d</u>ementia) とよばれる常染色体優性遺伝形式の神経変性疾患を引き起こすことが報告されていた。さらに、IBMPFD の原因となる VCP の 1 アミノ酸変異と同様の変異が、常染色体優性遺伝形式の家族性 ALS (<u>a</u>myotrophic <u>l</u>ateral <u>s</u>clerosis) の原因となることが提唱されている。したがって、これらの疾患の発症において VCP の機能変異が重要な役割を担っていることが予想されるが、その詳細は十分には解っていない。</p> <p>哺乳類 VCP の出芽酵母ホモログは、Cdc48 という細胞増殖に関与する遺伝子である。申請者は、野生型 VCP と疾患型 VCPs の差異を解明するべく、出芽酵母 <i>cdc48</i> 温度感受性株に疾患型 VCPs を発現させ、その表現型を解析した。結果、野生型 VCP よりも疾患型 VCPs の方が制限温度下における <i>cdc48</i> の温度感受性を効率的に抑圧することを見出した。また、これまで野生型 VCP は酵母 Cdc48 の欠損致死変異をレスキューできないことが報告されていた。しかし、疾患型 VCPs は <i>cdc48</i> 欠損致死変異を弱いながらもレスキューできることを見出し、疾患型 VCP で同定された変異は、何らかの機能獲得型の変異である可能性を示した。</p> <p>次に、EGFP との融合タンパク質を作成し、その局在を観察したところ、VCP-EGFP は diffuse な局在を示したのに対し、疾患型 VCPs-EGFP では foci が形成された。その foci の一部は bud に局在し、同じく bud へ極性化するアクチンと部分的に共局在することが明らかとなった。さらに、アクチン重合阻害剤の処理、あるいはアクチン制御因子の破壊によって疾患型 VCPs-EGFP の foci は沢山の小さな粒状の構造体 (punctae) となったことから、疾患型 VCPs-EGFP の foci はアクチン依存的に形成されることが示唆された。また、アクチン上のモータータンパク質である Myo2 のアクチン結合ドメインに変異のある <i>myo2-66</i> において、疾患型 VCPs の foci が punctae となっていたことから、foci の形成には Myo2 が関わることが明らかとなった。また、<i>myo2-66</i> では疾患型 VCP の punctae の bud への輸送が阻害されたことから、疾患型 VCP の foci 形成は、Myo2 により疾患型 VCP の punctae が、bud へと輸送されることによって形成されることが示された。さらに、この疾患型 VCPs の foci の形成が、<i>cdc48</i> 温度感受性の抑圧に必要であることを示した。</p>			

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

VCP は様々な機能を担う必須の 6 量体 AAA<sup>+</sup>-ATPase であり、全ての細胞に豊富に含まれている。加えて、VCP のアミノ酸配列の相同性は真核生物間で高度に保存されている。これまでにヒト VCP の 1 アミノ酸変異によって、IBMPFD とよばれる常染色体優性遺伝形式の神経変性疾患及び常染色体優性遺伝形式の家族性 ALS がひきおこされることが報告されている。したがって、これらの疾患の発症において VCP の機能変異が重要な役割を担っていることが予想されるが、その詳細は十分には分かっていない。

哺乳類 VCP の出芽酵母ホモログは Cdc48 という細胞増殖に関する遺伝子である。本論文において申請者は、野生型 VCP と疾患型 VCPs の差異を解明するべく、出芽酵母 *cdc48* 温度感受性株に野生型及び疾患型 VCPs を発現させ、野生型 VCP よりも疾患型 VCPs の方が制限温度下における *cdc48* の温度感受性を効率的に抑圧することを見出した。また、これまで野生型 VCP は酵母 Cdc48 の欠損致死変異をレスキューできないことが報告されていたが、申請者は疾患型 VCPs が *cdc48* 欠損致死変異を弱いながらもレスキューできることを見出し、疾患型 VCP が何らかの機能獲得型の変異である可能性を示した。

次に申請者は、EGFP との融合タンパク質を作成し、その局在を観察した。結果、VCP-EGFP は diffuse な局在を示したのに対し、疾患型 VCPs-EGFP は、細胞内で foci を形成してていた。その foci の一部は bud に局在し、同じく bud へ極性化するアクチンと共局在することを示した。アクチン重合阻害剤の処理、あるいはアクチン制御因子の破壊によって疾患型 VCPs-EGFP の foci は沢山の小さな粒状の構造体(punctae)となったことから、疾患型 VCPs-EGFP の foci はアクチン依存的に形成されることを示した。また、アクチン上のモータータンパク質である Myo2 のアクチン結合ドメインに変異のある *myo2-66* において、疾患型 VCPs の foci が punctae となっていたことから、foci の形成には Myo2 が関わること、疾患型 VCP の foci は、疾患型 VCPs の punctae が、Myo2 により bud へと輸送されることによって形成されることを示した。さらに、申請者は、疾患型 VCPs が、Myo2/actin 輸送系によって bud へ運ばれて foci を形成することが *cdc48* 温度感受性の抑圧に必要であることを明らかにした。

以上、本論文は、IBMPFD 及び ALS を引き起こす疾患型 VCPs と野生型 VCP の機能の違いを酵母で解析し、疾患型 VCPs が野生型 VCP には見られない機能獲得変異である可能性を示したもので、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 8 月 2 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

