

( 続紙 1 )

京都大学	博士 (総合学術)	氏名	奥 勇紀
論文題目	Local Redox Imbalance Induced by Intraorganellar Accumulation of Misfolded Proteins		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>Proper folding, maturation, and stabilization of newly synthesized proteins are vital for protein function. Although newly synthesized proteins have reached the lowest free energy conformation, some of them cannot achieve the correct structure. Even after proteins attain a mature conformation, cellular stresses such as heat shock can cause proteins to misfold. These misfolded or unfolded proteins in cells, which can cause cellular toxicity, should be cleared by protein quality control systems. However, cellular stresses beyond the capacity of protein degradation system causes intracellular accumulation of these aberrant proteins, which cause cellular dysfunction and eventual cell death. And such accumulation of abnormal or aggregated proteins is implicated with the pathogenesis of various diseases such as neurodegenerative diseases and diabetes.</p> <p>Maintaining the homeostasis of redox state at cellular and subcellular organelle levels is essential for cellular survival. Cells are often exposed not only to external but also internal oxidative stresses, reactive oxygen species (ROS), due to accumulation of misfolded proteins. To deal with such oxidative stresses, cells have antioxidant mechanisms such as glutathione, catalase and peroxiredoxin. However, continuous ROS production and imbalance of the redox state are known to cause damage to cells and eventual cell death. However, due to the difficulties in assessment of redox state at subcellular level, it is not clear how the misfolded proteins accumulated in a specific organelle affect the local redox state and how such a organellar redox imbalance can be compromised. Recent development of redox probe has enabled us to follow such intracellular local redox dynamics in a spatiotemporal manner.</p> <p>This study focuses on three cases with abnormal protein accumulation inducing cellular toxicity via intraorganellar redox imbalance. In Chapter 1, the mechanism underlying neuronal cell death caused by intracellular accumulation of extracellularly added amyloid beta peptide was analyzed. Amyloid beta (A<math>\beta</math>42), the main cause of Alzheimer's disease, is prone to form aggregate and thought to induce cell death by accumulating in cells. The mechanism by which A<math>\beta</math>42 incorporated into cells leads to cell death was studied by using chemically synthesized A<math>\beta</math>42 variants. After endocytotic incorporation, the A<math>\beta</math>42 variant A<math>\beta</math>42 (E22P) accumulated in lysosomes at an earlier stage than wild-type A<math>\beta</math>42. Intracellular localization of EGFP-Galectin-3 showed that accumulation of oligomerized A<math>\beta</math>42 in lysosomes caused lysosomal membrane permeabilization (LMP). Overexpression of lysosome-localized LAMP1-fused peroxiredoxin</p>			

1 and treatment with U18866A attenuated A $\beta$ 42-mediated LMP and cell death. These showed that lysosomal ROS generation by toxic conformer of incorporated A $\beta$ 42 led to cell death via LMP. Chapter 2 describes endoplasmic reticulum (ER) redox dynamics after proteasome inhibition, which was followed by a newly developed ERroGFP S4. ER underwent reductive shift under proteasome inhibition. Pre-treatment of an inhibitor of glutathione synthesis system (BSO) and knockdown of ATF4 suppressed the reductive shift caused by proteasome inhibition, suggesting ATF4-dependent influx of reductive glutathione into the ER. And also, the amount of secreted mIns2 and h $\alpha$ 1AT proteins decreased under proteasome inhibition. These results indicated that the maintenance of ER redox state were closely related to ER associated protein degradation and protein secretion. In Chapter 3, a high-throughput screening system was established to identify “ER-redox modulators” under the accumulation of misfolded proteins in the ER. As a result, two candidate compounds capable of attenuating ER redox imbalance were identified.

(論文審査の結果の要旨)

本論文では、神経疾患や糖尿病に関連深いモデルタンパク質 A $\beta$  42 とインスリン及び、老化に関連するとされるプロテアソームの阻害条件をモデルとして、細胞内タンパク質の品質管理機構の破綻によって生じる細胞障害機構について、オルガネラにおける局所的なレドックス異常障害と関連づけて解析した。凝集性タンパク質の蓄積により、蓄積箇所における局所的なレドックス状態が変化し、細胞障害と深い関連性をもつことを、新たに開発されたレドックスプローブと、スクリーニングの結果見いだした、レドックス障害を緩和する化合物を用いた解析により明らかにした。評価すべき点として以下の 3 点を挙げる事ができる。

- 1) 細胞内に取り込まれた A $\beta$  42 の毒性発現機構を明らかにし、リソソーム膜損傷が新たな創薬の標的となりうることを示した。
- 2) 老化のモデルとして、プロテアソームを阻害した環境では、小胞体内のレドックス状態がまず酸化的となり、その後徐々に還元的となっていくこと、さらに、この細胞障害適応反応が ATF4 依存的に起こることを示した。
- 3) 小胞体内レドックス状態を可視化する蛍光プローブを用いた新たなハイスループットスクリーニング系を確立した。これにより小胞体ストレスを緩和する薬剤の開発が可能なることを示した。

以上のように本論文は、細胞内の局所的レドックス状態を可視化することで、細胞内に取り込まれた A $\beta$  42 の毒性がリソソーム膜損傷にあることを明らかにして創薬スクリーニングへの応用可能性を示した。次にプロテアソーム阻害による小胞体内レドックスの変化を発見し、その後の小胞体内レドックス機能の回復が ATF4 依存的に起こること、小胞体内レドックスを指標とした新たなハイスループットスクリーニング系を構築、これを用いて小胞体内レドックス異常を緩和する化合物の同定に成功した。これらの成果は、細胞内レドックス、特にオルガネラレベルでの恒常性維持の分子機構の解明に新たな知見を提供するとともに、ハイスループットスクリーニングによる生理活性物質の同定、創薬科学における新たな知見を提供するものであり、分子細胞生物学、化学生物学、総合生存学に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士(総合学術)の学位論文として価値あるものと認める。また、平成 31 年 2 月 7 日、論文内容とそれに関連した事項について試問した結果、合格と認めた。

なお、本論文は京都大学学位規程第 14 条第 2 項に該当するものと判断し、公表に際しては、(平成 32 年 3 月 24 日までの間) 当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

要旨公表可能日： 平成 年 月 日以降