

京都大学	博士 (医学)	氏 名	野田 尚孝
論文題目	Glucose as a Protein-Condensing Cellular Solute (タンパク質の凝集を促進する細胞内容質としてのグルコース)		
(論文内容の要旨)			
<p>【背景】</p> <p>細胞内に存在するタンパク質の多く、特に酵素は、単分子として存在し、様々な細胞機能を維持しているところまで考えられてきた。ところが近年、細胞内タンパク質機能の新たな調節機構の一つとして、細胞内におけるタンパク質の生物学的液-液相分離が注目を集めている。</p> <p>生物学的液-液相分離を引き起こす要因として、細胞ストレスや高浸透圧、あるいは低酸素条件下での細胞培養が知られている。また、生物のエネルギー通貨として働く ATP が、タンパク質の凝集抑制に関与しているとの報告がなされている。本論文では、生物の最も基本的なエネルギー源の一つであるグルコースが特定のタンパク質の凝集形成を促進することを報告した。</p> <p>【結果】</p> <p>本研究の当初の目的は、グルコースと共集合を形成する化合物の探索という、全く異なるものだった。しかし、高グルコース条件下で化合物ライブラリーをスクリーニングした結果、生理的濃度のグルコースは、特定の小分子を共集合させるのではなく、むしろ凝集させる能力を本質的に持っていることが示唆された。本研究では、この現象を塩析に喩えて「グルコース析」と呼ぶことにした。この小分子化合物の予想外の結果を発端として、タンパク質の「グルコース析」の研究を継続した。</p> <p>生理的なグルコース条件下で凝縮体を形成しやすい細胞内タンパク質が存在するかどうかを検討した。グルコースが豊富な環境下で凝集するタンパク質をプロテオームから探索するために、Hep1-6 肝細胞の抽出液を用いた。20 mM グルコースの存在下 24 時間インキュベートした後に、遠心分離を行うことで沈殿物を形成したタンパク質を取り出した。沈殿したタンパク質を SDS-PAGE で分離した後に LC/MS/MS 解析を行い、20 mM グルコース非存在下において沈殿したタンパク質と比較することにより、グルコースによって凝集体形成が促進されているタンパク質を特定した。そのうち特に顕著なタンパク質として、カルモジュリン、ポリユビキチン C、Rho GTPase 交換因子 40 を確認した。本研究では、カルモジュリンに焦点を当てた。</p> <p>カルモジュリンの肝細胞での主な役割はグリコーゲン分解の調節であることが知られている。そこで、グルコースによるカルモジュリンの凝集体形成促進がグリコーゲン分解の調節機構に関連していると考え、様々な生物学的実験を行った。HA タグ標識したカルモジュリンを細胞に発現させ、免疫染色を行った後に共焦点顕微鏡を用いて凝集体の観察を行ったところ、10 mM 以上のグルコース存在下において、カルモジュリンが 200 nm 程度の粒子を形成していることが明らかになった。また、高グルコースの存在下においてカルモジュリンが凝集体を形成することで、カルモジュリンとグリコーゲンホスホリラーゼキナーゼとの相互作用が減少していることが共免疫沈降法により示された。さらに、それに伴いグリコーゲンホスホリラーゼのリン酸化レベルが減少し、グリコーゲン分解が抑制されていることが明らかになった。</p> <p>本研究は、グルコースがタンパク質相分離の誘導因子の一つであり、細胞のホメオスタシスに重大な影響を与える可能性があることを示唆している。</p>			

(論文審査の結果の要旨)
<p>細胞内で起こる生命現象を理解する新たな視点として、生物学的相分離が注目を集めている。これまでに相分離を起こす要因として特定されたものには、細胞ストレスや高浸透圧、あるいは低酸素条件下での細胞培養がある。本論文では、グルコースが特定のタンパク質の凝集形成を促進することを報告している。</p> <p>本論文は、グルコースが特定の小分子化合物を凝集させるという予想外の発見を発端としている。グルコースによって凝集が促進されるタンパク質も存在すると申請者は仮説を立て、プロテオーム解析によりグルコースの存在下において凝集体形成が促進されるタンパク質を特定した。本論文では、その一つであるカルモジュリンに着目している。肝細胞内でのカルモジュリンの役割はグリコーゲン分解の調節であることが知られているが、グルコースによってカルモジュリンが直接調節されていることは知られていなかった。共焦点顕微鏡を用いたカルモジュリン凝集体観察、共免疫沈降法、および細胞内グリコーゲン量測定により、グルコースの存在下カルモジュリンが細胞内で凝集体を形成することで、グリコーゲンホスホリラーゼキナーゼとの相互作用が減少し、グリコーゲン分解が抑制されていること示した。</p> <p>以上の研究は、グルコースがタンパク質を凝集させる細胞内因子の一つであることを示し、細胞のホメオスタシスの分子理解に寄与するところが多い。</p> <p>したがって、本論文は博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。</p> <p>なお、本学位授与申請者は、令和4年3月25日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。</p>
要旨公開可能日： 年 月 日以降