

(続紙 1)

京都大学	博士 (理学)	氏名	池田 知世
論文題目	メダカにおける飢餓誘導性脂肪肝発症ならびにレトロトランスロコン構成因子欠失による発症促進の分子機構解析		
(論文内容の要旨) <p>分泌タンパク質や膜タンパク質は、小胞体で小胞体シャペロンタンパク質の介助を受けながら正しい立体構造に折り畳まれて成熟する。正しい立体構造を取れなかった構造異常タンパク質は、出芽酵母から高等動物まで保存された機構である小胞体関連分解により処分される。小胞体関連分解において、タンパク質は小胞体膜に局在する逆向き輸送チャンネル (レトロトランスロコン) を介して細胞質側に送り出され、レトロトランスロコンを通過する際に付加されたユビキチンを目印としてプロテアソームにより分解される。出芽酵母のレトロトランスロコンの一つとしてHrd1複合体が知られている。Hrd1はE3活性のあるRING fingerドメインを細胞質側に持つ小胞体膜タンパク質であり、同じく小胞体膜貫通タンパク質であるHrd3と二量体を形成してレトロトランスロコンの中心を形成する。線虫や硬骨魚類、哺乳類には、酵母Hrd1のホモログとしてHRD1とgp78が、酵母Hrd3のホモログとしてSEL1Lが存在し、哺乳類細胞での解析からHRD1とSEL1LがコアとなったHRD1複合体とgp78を中心とするgp78複合体がそれぞれレトロトランスロコンを形成し、それぞれの複合体が特異的に分解するタンパク質が報告されている。</p> <p>遺伝子破壊マウスでの解析から、小胞体関連分解がマウスの正常な発生に重要であることが明らかになっている。しかし、マウスの胎生期の肝臓は造血機能を担うため、仮に肝臓に重篤な異常が生じる場合には致死となる可能性が高い。そこで、マウスを用いた詳細な解析の難しさを改善するために、本研究ではモデル生物としてメダカを導入した。硬骨魚類の胚性期の造血機能は肝臓以外の組織で行われるため、マウスで見られる致死性を克服した解析が可能になることを期待した。また、メダカは卵生で胚が透明であるため外部からの観察を実施しやすい利点もある。本研究では、メダカを用いてレトロトランスロコン構成因子の生体における機能を明らかにすることを目的とした。</p> <p>第一章では、孵化したメダカ稚魚を飢餓条件で飼育し続けると、孵化後7日目には肝臓が黒くなるという変化に着目した。オイルレッドOでの染色実験から、黒い肝臓は中性脂肪が蓄積した脂肪肝の状態であり、この肝臓の変化は飢餓誘導性の脂肪肝発症であることが明らかになった。そこで、この現象のメカニズムを解明するために、メダカ稚魚をグルコースありの条件、あるいはグルコースなしの条件で飼育した際の肝臓を用いて、2DICALシステムでのプロテオミクス解析を実施した。2DICALシステムでは、サンプル間で同一ペプチドの発現量を相対発現量として解析できる。得られたメダカペプチドデータをヒト遺伝子データに変換して、代謝に関連するタンパク質</p>			

の発現量を解析した。その結果、飢餓条件において、アミノ酸異化の上昇、脂肪酸 β 酸化の上昇、トリグリセリド合成の増加傾向、コレステロール合成の低下、コレステロールやトリグリセリドの輸送低下が明らかになった。小胞体シャペロンの発現量に変化は見られなかった。これらの変化による代謝の不均衡の結果、肝細胞内に遊離トリグリセリドが増加して輸送が低下することで、トリグリセリドが蓄積して脂肪肝を誘導する可能性が示唆された。

第二章では、レトロトランスロコン構成因子であるHRD1、SEL1L、gp78の遺伝子破壊メダカをそれぞれ作出した。それらの遺伝子破壊メダカは期待したように致死とはならず、いずれも成魚まで生育した。HRD1ノックアウトメダカ、SEL1Lノックアウトメダカでは成魚の体長が有意に短かった。また、HRD1/gp78ダブルノックアウトメダカも致死とはならず、成魚まで成育した。HRD1/gp78ダブルノックアウトメダカも成魚の体長が有意に短かった。メダカ胚から各遺伝子型のメダカ培養細胞を樹立し、哺乳類において小胞体関連分解モデルタンパク質として知られる、内在性ATF6 α ならびに外来性mCD3 δ -HAの分解速度を調べた。その結果、内在性ATF6 α はHRD1-SEL1L経路で分解され、gp78は寄与しないことが明らかになった。一方、mCD3 δ の分解についてはHRD1-SEL1L経路とgp78経路の両方が寄与する結果となり、HRD1経路とgp78経路の機能の重複が示唆された。また、これらの解析からメダカHRD1、SEL1L、gp78がそれぞれ、哺乳類と同等の機能を備えたレトロトランスロコン因子であると示唆された。

次に、飢餓誘導性の脂肪肝発症に着目してレトロトランスロコン構成因子の機能を調べた。HRD1ノックアウト、SEL1Lノックアウト、gp78ノックアウトメダカ稚魚をグルコースあり条件またはグルコースなし条件で飼育し、4日目と7日目に脂肪肝を発症しているのかをどうかを観察した。その結果、グルコースあり条件においても、HRD1ノックアウト、gp78ノックアウトメダカは有意に脂肪肝を発症しやすく、HRD1/gp78ダブルノックアウトメダカはシングルノックアウトよりさらに脂肪肝を発症しやすかった。一方、SEL1Lノックアウトメダカは脂肪肝を発症した個体はいたものの、有意な脂肪肝発症促進は観察されなかった。またグルコースなし条件においても、HRD1、gp78、SEL1Lそれぞれのノックアウトメダカは有意に脂肪肝を発症しやすい結果となり、HRD1/gp78ダブルノックアウトはシングルノックアウトよりさらに脂肪肝を発症しやすかった。これらの解析から、メダカ肝臓の恒常性維持において小胞体関連分解機構が重要であることが明らかになり、脂肪肝発症を防ぐ点においてHRD1とgp78の機能重複が示唆された。ただし、HRD1またはgp78ノックアウトも脂肪肝となることから、HRD1とgp78は互いの機能を完全に補えないと考えられる。

また、ノックアウトメダカにおける脂肪肝発症促進のメカニズムを明らかにするため、2DICALシステムでのプロテオミクス解析を実施した。グルコースあり、またはグルコースなし条件で飼育した孵化後5日目の稚魚肝臓をサンプルに用いて、得られたヒト遺伝子情報について解析した。その結果、レトロトランスロコン構成因子ノッ

クアウトメダカでは、総じて小胞体シャペロンの発現量が増加しており、小胞体ストレスの発生が示唆された。肝臓における代謝経路の変化は、グルコースあり条件、なし条件においても概ね飢餓条件の際の野生型稚魚肝臓で見られた変化に一致しており、肝細胞へのトリグリセリドの蓄積が脂肪肝を誘導すると考えられる。また、小胞体ストレスの発生が脂肪肝発症促進に寄与する可能性が示唆された。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

以上、本論文はまず、メダカにおける飢餓誘導性脂肪肝発症の分子機構をプロテオミクス解析により明らかにした。ついで、小胞体関連分解において重要な役割を果たすレトロトランスロコン構成因子であるHRD1、SEL1L、gp78を欠失するメダカを作出して、それらが極めてマイルドな表現型を示す（致死にならない）という重要な結果を得た。さらにこれらの欠失メダカが脂肪肝発症を促進することを見出し、その分子機構をプロテオミクス解析により明らかにした。すなわち、小胞体におけるタンパク質の品質管理機構と脂肪肝発症の関連を明確に示すことに成功した。

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6年1月17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。

要旨公表可能日： 年 月 日以降