

京都大学	博士（薬科学）	氏名	中嶋 将久
論文題目	肝臓特異的 <i>Ccdc47</i> 欠損マウスの作出と小胞体ストレス誘導剤ツニカマイシンに対する応答の検討		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>Coiled-coil domain containing 47 (CCDC47) は1回膜貫通型の小胞体膜タンパク質であり、小胞体内腔側領域にCa²⁺結合活性を有している。<i>Ccdc47</i>欠損マウス胎児線維芽細胞を用いた解析で、小胞体Ca²⁺貯蔵量の減少と小胞体ストレスに対する感受性の亢進が認められたことから、CCDC47が小胞体Ca²⁺恒常性の維持を担っていることが想定される。また、複数回膜貫通型タンパク質の生合成において、CCDC47が膜内シャペロン複合体の構成分子の1つとして複数回膜貫通型タンパク質のホールディングに寄与することが報告されている。</p> <p>ヒトCCDC47遺伝子変異が肝機能障害、骨形成異常、全般的成長遅延など他系統疾患を引き起こすことから、CCDC47が正常な発生や組織生理機能において重要な役割を担っていることが考えられる。しかしながら、<i>Ccdc47</i>欠損マウスは胎生10.5日前後で致死となるため、機能欠損変異による病態やその分子機序に関する解析はほとんど行われておらず、生体内におけるCCDC47の機能的重要性は検討されていない。本研究では、肝臓特異的<i>Ccdc47</i>欠損マウスを作出し、小胞体ストレス誘導剤ツニカマイシンにより誘導される小胞体ストレスへの応答を検討した。また、初代培養肝細胞を用いたCa²⁺イメージングを行い、<i>Ccdc47</i>欠損によるCa²⁺ハンドリング異常を検討した。</p> <p>本研究では、Cre/loxPシステムを用いて肝臓特異的<i>Ccdc47</i>欠損マウス (cKOマウス) を作出した。cKOマウスは正常に発育し、明瞭な形態的異常は観察されなかった。</p> <p>マウス胎児線維芽細胞において、<i>Ccdc47</i>欠損が小胞体ストレス誘導剤による細胞死を亢進させることが報告されている。小胞体ストレスに対する感受性の亢進が生体内組織においても認められるか検討するために、cKOマウスにツニカマイシンを腹腔内投与し、その応答を観察した。cKOマウスでは、ツニカマイシン投与により誘導される肝臓への脂肪蓄積が対象群と比較して有意に亢進していた。また、C/EBP homologous protein (CHOP) タンパク質の発現が有意に高かった。CHOPはC/EBPαと二量体を形成することでその転写活性を阻害し、代謝関連遺伝子の発現を抑制することが知られている。Real-time PCR法により代謝関連遺伝子のmRNA発現レベルを検討したところ、脂肪酸β酸化関連遺伝子の発現を制御する核内受容体PPARαのmRNA発現レベルが有意に低下していた。この結果から、<i>Ccdc47</i>欠損マウス肝臓におけるツニカマイシン誘導性脂肪蓄積の亢進に、PPARαの減少による脂肪酸β酸化の抑制が寄与することが示唆された。</p> <p>次に<i>Ccdc47</i>欠損マウス胎児線維芽細胞で認められた小胞体Ca²⁺ハンドリング異常が、<i>Ccdc47</i>欠損肝細胞でも認められるか検討するために、初代培養肝細胞を用いたCa²⁺イメージングを行なった。<i>Ccdc47</i>欠損肝細胞の静止状態のCa²⁺レベルは対照群肝細胞と比較して有意に低下していた。また、Ca²⁺-free溶液中でイオノマイシン、及び、Sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SRECA) 阻害剤タブシガルギン処置により誘導されるCa²⁺トランジェントも有意に低下しており、肝細胞における<i>Ccdc47</i>欠損が小胞体Ca²⁺貯蔵量を減少させることが示唆された。</p>			

以上の結果から、肝細胞における*Ccdc47*欠損がツニカマイシン誘導性小胞体ストレスへの適応を抑制すること、及び、小胞体Ca²⁺貯蔵量を減少させることが明らかになった。小胞体Ca²⁺貯蔵量の減少はCa²⁺依存性分子シャペロンの活性低下を引き起こし、小胞体ストレスへの抵抗性を低下させると考えられる。*Ccdc47*欠損による分子シャペロンの機能不全がツニカマイシン誘導性小胞体ストレスへの適応を抑制し、CHOPの発現レベルが高く維持されることで肝臓への脂肪蓄積が亢進したと予想される。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

小胞体膜タンパク質 CCDC47 は、重篤な遺伝子疾患の原因遺伝子にコードされ、膜貫通タンパク質のホールディングに寄与するとの報告があるが、基本的には機能不明なタンパク質である。その生理的機能の解明を目的として、本研究では肝細胞特異的 *Ccdc47* 欠損マウスを作製して、その Ca^{2+} ハンドリングや小胞体ストレス応答に関する変容を検討している。*Ccdc47* 欠損肝細胞では小胞体 Ca^{2+} 貯蔵量の減弱と小胞体ストレス応答の増悪が確実なデータとして観察された。両異常所見の因果関係は不明であるものの、小胞体内腔のシャペロン分子群は多くは Ca^{2+} 依存性を示すことが知られていることから、小胞体 Ca^{2+} 含量の低下が小胞体シャペロンの活性低下を引き起こし、小胞体内タンパク質の折り畳みが障害されることにより小胞体ストレス応答が増悪することと考察されている。

学位審査においては、やや散在的な実験データのみに基づく、断片的な考察および結論を危ぶむ指摘もあった。しかしながら、提出された論文では、*Ccdc47* 欠損がもたらす確実な異常所見が初めて報告されており、ヒト先天性疾患の病態解明に部分的に貢献する内容を包含するものと評価された。よって、本論文は博士(薬科学)の学位論文として価値あるものと認める。また、令和6年2月14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。