

## 論文審査の結果の要旨

|   |                   |        |      |
|---|-------------------|--------|------|
| 博士の専攻分野の名称  | 博士 ( 医学 )         | 氏名     | 田口 慧 |
| 学位授与の条件   | 学位規則第 4 条第①・2 項該当 |        |      |
| 論文題目<br>Role of the E3 ubiquitin ligase HRD1 in the regulation of serotonin transporter function<br>(セロトニントランスポーターの機能制御における E3 ユビキチンリガーゼ HRD1 の役割)  |                   |        |      |
| 論文審査担当者   |                   |        |      |
| 主 査   | 教授                | 浅野 知一郎 | 印    |
| 審査委員  | 教授                | 岡本 泰昌  |      |
| 審査委員  | 准教授               | 吉田 隆行  |      |
| 〔論文審査の結果の要旨〕  |                   |        |      |
| <p>セロトニントランスポーター(SERT) は、神経終末においてセロトニンを再取り込みすることにより、セロトニン神経伝達の終了を担う膜タンパク質である。SERT は気分障害、不安障害、自閉症などに関与する分子であり、抗うつ薬の作用点としても知られている。SERT は、小胞体 (ER) で翻訳され、まず high mannose type の不完全な糖鎖修飾を受ける。その後ゴルジ体に運ばれ、完全な糖鎖修飾を受けた後に形質膜に発現し機能を発揮する。その後、形質膜の機能的 SERT はエンドサイトーシスにより細胞質に取り込まれリソソームにより分解される。一方、折りたたみ不全が生じた SERT は、ほとんど形質膜には輸送されず小胞体に蓄積し、小胞体において小胞体関連分解 (ERAD) により分解されると考えられている。しかしながら、その詳細な機構については未だに明らかにはなっていない。本研究では ERAD において中心的な役割を果たすユビキチンリガーゼである HRD1(HMG-CoA reductase degradation protein)に着目し、HRD1 が SERT 機能調節に与える影響を調べた。</p> <p>実験には HRD1 を安定過剰発現させた HEK293 細胞および HRD1 siRNA を導入した COS-7 細胞を用いた。これらの細胞に野生型 SERT (WT-SERT) および SERT の折りたたみ不全変異体と考えられる SERT C 末端欠損変異体(SERTACT)を発現させ、シクロヘキシミド (CHX)チェイスアッセイによる SERT 分解、免疫沈降による SERT ユビキチン化、SERT と HRD1 の相互作用、免疫蛍光染色による SERT と HRD1 の局在、SERT の基質取り込み活性、SERT タンパク発現を検討した。</p> <p>CHX チェイスアッセイによって SERT タンパク質の分解に対する HRD1 の影響について検討した。HRD1 の過剰発現は WT-SERT および SERTACT の分解を有意に増強した。また、HRD1 siRNA による HRD1 のノックダウンは WT-SERT および SERTACT の分解を有意に抑制した。次に、HRD1 の過剰発現とプロテアソーム阻害剤 MG132 による処理が SERT のユビキチン化に及ぼす影響を調べた。HRD1 の過剰発現は SERT のユビキチン化を促進し、その効果はプロテアソーム阻害剤 MG132 処置によりさらに増大した。これらの結果から、HRD1 は SERT のユビキチン化と分解に関与することが明らかとなった。</p> <p>SERT の免疫沈降の結果、HRD1 は MG132 の存在下で SERT と相互作用することが明らかになった。さらに免疫蛍光染色において HRD1 は細胞内に局在する WT-SERT や SERTACT と共局在しており、特に ER において凝集した SERTACT と共局在していることが観察された。これらの結果から、SERT と HRD1 は小胞体で機能連関することが明らかとなった。</p> <p>最後に HRD1 ノックダウン COS-7 細胞を用いて、SERT のタンパク質発現レベルおよび取り込み活性に対する HRD1 の効果を調べた。HRD1 のノックダウンによって、SERT タンパク発現が有意に上昇した。また、トランスフェクションの 1 日後において基質取り込み活性も上昇した。これらの結果は、HRD1 が SERT のタンパク質レベルを変化させることで SERT の機能を調節していることを示唆している。</p> <p>以上の結果から、HRD1 は ERAD を介した SERT の分解に関与することで、SERT の膜輸</p> |                   |        |      |

送と機能制御に寄与していることが明らかとなった。HRD1は、様々な SERT 関連疾患の発症に関与し、それら疾患の治療標的になりうる可能性がある。

このように、本研究は、SERT の ERAD による分解機構に HRD1 が関与していることを明らかにし、SERT に関わる疾患の病態生理の理解に大きな貢献をもたらした。よって審査委員会委員全員は、本論文が田口慧に博士（医学）の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。