

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	尾崎 陽介
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 ①・2 項該当		
論文題目 Shutdown of ER-associated degradation pathway rescues functions of mutant iduronate 2-sulfatase linked to mucopolysaccharidosis type II (小胞体関連分解の抑制はムコ多糖症 II 型原因タンパク質変異型イズロン酸 2 スルファターゼの機能を回復する)			
論文審査担当者			
主 査	教授	浅野 知一郎	印
審査委員	教授	川上 秀史	
審査委員	准教授	亭島 淳	
<p>〔論文審査の結果の要旨〕</p> <p>遺伝子変異等により異常タンパク質が産生され小胞体内に蓄積すると、小胞体機能の攪乱が起こる。このような状態を避けるため、小胞体には防御機構が備わっている。その一つに小胞体関連分解 [ER associated degradation ; ERAD] ) が良く知られている。変異遺伝子から翻訳されたタンパク質はこの ERAD によって分解され機能を失い、疾患発症へと至ることが近年報告されている。変異タンパク質の ERAD における詳細な分解機構を解明することは、変異タンパク質の機能喪失を原因とする希少疾患の治療法確立につながる事が期待できる。</p> <p>ムコ多糖症は、リソソーム病の一種であり、遺伝的要因によってムコ多糖が全身に蓄積し、骨軟骨形成異常や神経系障害など様々な症状を呈する代謝異常症である。日本ではリソソーム酵素である Iduronate-2-sulfatase (IDS) の変異で起こるムコ多糖症 II 型が約半数を占めている。本研究では、ムコ多糖症 II 型発症の分子機構を解析する目的で変異 IDS の細胞内動態と分解経路について詳細に解析した。</p> <p>まず IDS の細胞内局在を調べるために、HeLa 細胞に野生型及び変異型 IDS を遺伝子導入後、抗 IDS 抗体を用いて免疫染色を行った。野生型 IDS は主にリソソームマーカーLAMP2 陽性の顆粒状染色パターンを示した。一方、変異型 IDS はカルネキシン陽性の網目状染色パターンを示すのみで、LAMP2 との共局在は認めなかった。従って、変異型 IDS は小胞体内に留まり、リソソームまで到達していないことが示唆された。次に局在の異なるタンパク質の基質分解能の有無についてウェスタンブロッティングを用いて確認した。野生型 IDS は、分子量 75kDa の全長型とプロセシングを受けた活性型である 55kDa の 2 本のバンドとして観察される。重篤な症状を示す重症型変異 IDS は全長型のバンドのみが検出されるが、軽症型変異 IDS はわずかに活性型 IDS のバンドが検出された。基質分解能を解析したところ、変異型</p>			

IDSは野生型IDSの2~4%程度が残存するのみであった。また、重症型変異IDSと軽症型変異IDSの比較では、重症型変異IDSに比べ軽症型変異IDSは有意に基質分解能が残存していることが示された。上述のように小胞体内に蓄積した変異タンパク質はERADで速やかに分解されることが知られている。そこで野生型及び変異型IDSのタンパク安定性の比較する目的でIDSを発現させたHeLa細胞を翻訳阻害剤であるシクロヘキシミドで処理し、その後のタンパク質量の変化をチェイスした。重症型、軽症型とも変異IDSは野生型IDSと比較して極めて安定性が低く速やかに分解された。細胞をシクロヘキシミドに加えプロテアソーム阻害剤MG132で処理すると、重症型、軽症型共に変異IDSの分解は抑制された。このことから、変異IDSはユビキチン-プロテアソーム系で分解されていることが確認できた。次にIDSの分解に関わるERAD関連因子の検討を行った。E3リガーゼは基質の特異性を決定する重要な役割を果たしているためIDSの分解に関わるERAD関連E3ユビキチンリガーゼの同定を試みるため、小胞体膜上に局在する7種類のE3ユビキチンリガーゼをsiRNAを用いてノックダウンした。その結果、HRD1をノックダウンした場合のみ重症型及び軽症型変異IDSとも分解が抑制され、全長型の有意な増加を認めた。さらに軽症型変異IDSでは活性型が有意に増加しリソソームへの移行と基質分解能の改善が認められた。以上から小胞体に留まった変異IDSは速やかにERADで分解されることでリソソーム酵素としての機能を失い、分解障害をきたすことが示唆された。さらにERADの阻害によって軽症型変異IDSの基質分解能が回復したことから、ERADにおける分解の抑制が病態の改善につながる可能性が示された。

また、申請者の論文は掲載されていないが追加で行った下記の実験が示された。ERAD遮断による軽症型変異IDS機能回復の機序として、カルネキシンサイクルに注目し解析を行った。HRD1のノックダウンにより、カルネキシンと結合する変異IDSのタンパク質量増加が免疫沈降法によって認められた。また、カルネキシンのノックダウンによって、変異IDSタンパク質の発現量が低下し、軽症型変異IDSの基質分解能の低下も認めたことから、カルネキシンが軽症型変異IDSの機能回復に重要な役割を果たしていることが示された。さらに変異タンパク質を正しいオルガネラに局在させることにより、タンパク質機能が回復すると仮説を立て薬剤スクリーニングシステムを構築した。軽症型変異IDS安定発現細胞を96well plateに播種し既存薬の添加した後、抗IDS抗体と抗Lamp2抗体で免疫染色を行いHigh contents image analysis systemであるOpera phenixを用い解析を行った。解析方法としては細胞全体のIDSの輝度におけるリソソーム内のIDSの輝度を指標に共局在率を求めた。結果既存薬280検体のうち、有意に共局在率が改善した4検体を候補として選定した。その中で、最も共局在率が改善したDrug Aに関しては、ウェスタンブロッティングで活性型IDSの増加及び基質分解能の改善が確認できた。

以上の結果から本論文において小胞体関連分解の抑制はムコ多糖症II型原因タンパク質変異型IDSの機能を回復することを明らかにするとともに、新規薬物スクリーニングシステムの構築と候補化合物の選定に成功していることから、今後臨床応用への発展が期待され、病態医学領域の発展に資すること大である。よって審査委員会委員全員は本論文が尾崎陽介に博士(医学)の学位を授与することに十分な価値あるものと認めた。

最終試験の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（医学）	氏名	尾崎 陽介
学位授与の条件	学位規則第4条第①・2項該当		
論文題目 Shutdown of ER-associated degradation pathway rescues functions of mutant iduronate 2-sulfatase linked to mucopolysaccharidosis type II (小胞体関連分解の抑制はムコ多糖症 II 型原因タンパク質変異型イズロン酸 2 スルファターゼの機能を回復する)			
最終試験担当者			
主査 教授	浅野 知一郎	印	
審査委員 教授	川上 秀史		
審査委員 准教授	亭島 淳		
〔最終試験の結果の要旨〕			
判定合格			
上記3名の審査委員会全員が出席のうえ、平成31年2月6日日本委員会において最終試験及び平成31年2月7日第78回広島大学研究科発表会（医学）を行い、主として次の試問を行った。			
1. 重症型及び軽症型 IDS の酵素活性の違いと臨床症状。			
2. HRD1 阻害による毒性と治療ターゲットとしての妥当性。			
3. HRD1 阻害が軽症型変異 IDS のみに作用する理由。			
4. IDS タンパク質の構造と変異領域の機能。			
5. Drug A の作用機序。			
6. Drug A 以外の候補化合物の薬効。			
これらの質問に対し適切な解答をなし、本委員会が本人の学位申請論文の内容及び関係事項に関する本人の学識について試験した結果、全員一致していずれも学位を授与するに必要な学識を有するものと認めた。			