

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 401号	学位申請者	佐々木 なつき
審査委員	主査	武田 泰生	学位 博士 (医学・歯学・学術)
	副査	宮田 篤郎	副査 橋口 照人
	副査	柴田 昌宏	副査 池田 龍二

主査および副査の5名は、平成28年12月21日、学位申請者 佐々木 なつき 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) HEK293細胞は胎児腎臓由来の細胞であり、choreinが発現しているが、有棘赤血球舞踏病 (ChAc) 患者では腎障害があるか。

(回答) ChAc患者では腎障害の頻度は低く、また腎障害との関連を明らかにした報告はない。

質問2) 内在性のchoreinをノックダウンしようとはしなかったのか。

(回答) 現在はchoreinのRNA干渉に成功しているが、研究開始時点では安定過剰発現細胞の研究をまとめた。

質問3) Fig. 1で、飢餓誘発をしているとmock細胞でも生存率がある程度保たれているがそれはどうしてか。

(回答) 血清成分の残存により細胞生存が保たれてしまうなどの影響が考えられる。また、内在性のchoreinを含めたオートファジー機構が飢餓誘発のアポトーシスに拮抗している可能性もある。

質問4) ヒトの脳でのchoreinの分布を調べたものがあるのか。

(回答) 脳、精巣、筋にchorein免疫反応を認めているウエスタンブロットの結果が報告されている。

質問5) Fig. 1で飢餓をかけずにchorein安定過剰発現細胞とmock細胞での生存率の差があるのか。

(回答) 生存率の差は明らかでないが、mock細胞の方が増殖は早い。

質問6) 細胞増殖を止めてオートファジーが起こるのか。

(回答) 基底レベルでもオートファジーは生じており、必ずしも細胞増殖が止まっているわけではないと思われる。

質問7) Fig.2Cではchoreinがオートファジーを起こしている可能性はないか。

(回答) 基底レベルではLC3 II/I比にmock細胞との差はないのでchoreinの過剰発現自体がオートファジーを起こしているとは言えないと思われる。

質問8) choreinとHDAC6は、飢餓の有無に関わらず相互作用しているが、オートファジーと関連があると言えるか。

(回答) 免疫沈降の結果から言えば基底レベルでも相互作用している。オートファジーとchoreinの関連はLC3やSQSTM1/p62の発現の変化で証明した。

質問9) Choreinがオートファジー自体を止めて、オートファゴソームの形成が進んでいたのでないか。微小管とHDAC6との関与はオートファゴソームの輸送だけに関連しているのか。

(回答) オートファゴソームの形成にも微小管やHDAC6の関与は言われており、choreinがオートファゴソームの形成に関わっている可能性もある。しかし、その後のオートファジーの過程も進んでおり、オートファジーを止めてはいないと思われる。

質問10) HDAC2などの他のクラスのHDACでは実験していないのか。

(回答) していない。

質問11) choreinの組織分布において分子量が若干異なっているが、組織において違うのか。

(回答) 組織によってさまざまな variants があることがわかっている。

質問 12) chorein はゴルジ体に局在しているというが、どうやってゴルジ体から移動するのか。

(回答) ゴルジ体以外にも分布しており、移動しているのかはわからない。

質問 13) 他のオートファジー関連物質との共在の研究があるのか。

(回答) LC3 との共在はなかった。他のオートファジー関連分子との明らかな共在を示す結果は得られていない。

質問 14) 飢餓誘発をした際に細胞数のカウントはしているか。

(回答) タンパク抽出の際にカウントしている。

質問 15) 細胞株を樹立しているが、複数の株で実験しているのか。Transient の発現系では研究していないのか。

(回答) 一つの細胞株でしか実験していない。

質問 16) p62 はオートファジーで分解されるはずなのに、安定過剰発現細胞で増加しているのは、オートファジーが止まっている可能性があるのではないか。

(回答) Chorein 安定過剰発現細胞において基底状態では p62 が増加しているが飢餓刺激により基底状態に比して有意に減少しており、Chorein 安定過剰発現細胞に飢餓刺激を与えるとオートファジーはオートリソソームの段階までは進むと考えられる。

質問 17) 今回は HEK 細胞を用いた実験だが、neuron では飢餓に陥ることは少ないので、恒常的なオートファジーにおける関連を調べる必要があるのではないか。

(回答) 神経細胞での研究は今後の課題だと思う。

質問 18) 飢餓オートファジーを誘導しているが、ラパマイシンなどの他の刺激をした実験はしていないのか。

(回答) マイトファジーを起こす carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone (CCCP) や、staurosporine、H₂O₂ によって細胞を刺激した研究を行っている。

質問 19) ATG_C モチーフの部分をクリックアウトしたものを導入して解析できるのではないか。

(回答) ATG_C モチーフは C 端側に存在している。細胞に chorein の N 端側断片のみと C 端側断片のみを transient に導入した研究を行ったことがある。そのときはオートファジーとの関連を研究していないがそれらコンストラクトを用いれば解析が可能かもしれない。

質問 20) VPS13A のどの variants もオートファジーを促進していると考えているか。

(回答) 全ての variants で見ているわけではないので明らかではない。

質問 21) 脱アセチル化が促進するというのは微小管が不安定化しているということなのか。

(回答) 脱アセチル化が促進すると微小管が不安定となり、アセチル化が増えると安定すると言われているが、アセチル化が過剰な場合に神経繊維の伸長が遅くなるという報告もあり、アセチル化のバランスが重要であると言われている。

質問 22) VPS13A の variants で exon 数が異なるが、5'-側に variant があるのか、3'-側やその他に variant があるのか。

(回答) 5'-側の transcript variant に加え alternative splicing など 3'-側やその他に多彩な variants が報告されている。

質問 23) Chorein の発現調節のメカニズムはわかっているのか。

(回答) 組織別に発現が異なっており何らかの調節機構が働いていると考えられるが、その機構は明らかではない。

質問 24) Alzheimer 病や Huntington 病のように細胞質内に凝集する異常タンパク質が ChAc にはあるのか。

(回答) ChAc では中枢神経系の凝集体は確認されていない。筋組織にネマリン小体を認めたという症例報告はある。

質問 25) オートファゴソームを促進させるその他のタンパク質はあるのか。

(回答) PI3K 複合体や ULK1 複合体など様々な関連因子があるので、それらと chorein の関連を検討していくことも今後の課題である。

質問 26) 微小管重合阻害剤によって刺激した細胞では生存率をみているが、その時の LC3 比やオートファジー関連物質の蓄積をみてはどうか。

(回答) 今回の研究では基底レベルでの生存率の差をみているが、今後検討する必要があると思われる。

以上の結果から、5名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。