

審査の結果の要旨

氏名 中野 栄治

本研究は遺伝性ネフローゼ症候群の原因となるミトコンドリア蛋白 ADCK4 の細胞内局在および関連分子との機能的相互作用から CoQ10 合成へ与える影響を解明するために、蛋白発現ベクターを用いた系において、局在と蛋白相互作用を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. ADCK4 ベクターを用いたウェスタンブロットの結果、ADCK4 は N 末端に近い部分で分子内切断が起き、60 kDa と 55 kDa の断片が生じることが示された。ミトコンドリア画分でのウェスタンブロットにより分子内で切断されない ADCK4 はミトコンドリアには局在しないことを明らかにした。また、蛍光免疫染色により切断された N 末および C 末断片がミトコンドリアに局在することが示された。さらに、ADCK4 患者変異体はミトコンドリア局在自体には影響がないことが明らかとなった。
2. Stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC) および銀染色による蛋白抽出を用い ADCK4 結合蛋白質の網羅的な解析を行った。それぞれ、ピロリン-5-カルボン酸レダクターゼ(PYCR)のアイソフォームが検出され、結合蛋白質候補として PYCR が同定された。
3. PYCR1 の細胞局在の検討により、PYCR1 は N 末端に近い部分で分子内切断が生じミトコンドリアに局在することを明らかにした。それぞれの蛋白発現ベクターにより PYCR1 および PYCR2 が ADCK4-とミトコンドリア内で共局在することが示され、免疫沈降によりミトコンドリア画分で ADCK4 と PYCR1 および PYCR2 が結合することが示された。Proximity ligation assay (PLA)を用い ADCK4 と PYCR1 がミトコンドリア内で近接していることが示された。また、免疫沈降法により ADCK4 のパラログである ADCK3 と PYCR1・PYCR2 との結合も示された。さらに、免疫沈降により PYCR には ADCK4 のみならず COQ6 も結合することが明らかとなった。PYCR1 の欠失変異体を用いた検討により、ADCK4 は PYCR1 の結合には dimerization 領域の前半および後半の両者が関与していることが示された。また、COQ6 と PYCR1 の結合には PYCR1 の dimerization 領域の後半部分が必要であること示され、COQ6 が ADCK4 を介さずに PYCR1 の dimerization 領域に結合することを明らかにした。
4. PYCR1 の欠失変異体を用いた検討により、N 末端を欠失させた変異体の細胞内局在の変化が示された。また、N 末端だけではなく 117-145 の配列もまたミトコンドリア局在に影響を与えることが示された。Dimerization 領域の欠失変異体では PYCR1 のミトコンドリア局在に変化はなく、ADCK4 および COQ6 との複合体形成が必ずしも必要

ではないことが示された。また、PYCR1 および PYCR2 の患者変異体である PYCR1 R119H および PYCR2 R119C でも細胞内局在の変化が示された。さらに、ミトコンドリアに局在しない PYCR1 の欠失変異体および患者変異体が ADCK4 とミトコンドリア外で結合し、ADCK4 のミトコンドリア局在を阻害することが示された。また、PYCR1 欠失変異体による局在変化が COQ6 のミトコンドリア局在に影響を与えないことが示された。

5. 定常状態の培養細胞に対する PYCR1・PYCR2 のノックダウンでは CoQ10 産生に明らかな影響を与えないことが明らかになった。また、PYCR1 欠失変異体および患者変異体ではコントロールと比較し有意な Total CoQ10/FC の変化は認められなかった。また、ADCK4 のノックダウンにおいても定常状態の培養細胞の CoQ10 産生に明らかな影響を与えないことが判明した。
6. $32\text{P}\gamma\text{ATP}$ キナーゼアッセイを行い、ミトコンドリア画分に抽出した ADCK4 に反応するリン酸化基質が含まれることを明らかにした。また、抽出した ADCK4 免疫沈降産物を用いた $32\text{P}\gamma\text{ATP}$ キナーゼアッセイによりミトコンドリアに存在する ADCK4 複合体はそれ自身にキナーゼと基質を含むことを示した。

以上、本論文は ADCK4 の蛋白局在および蛋白相互作用の解析から、ミトコンドリア内で ADCK-COQ6-PYCR 複合体を形成することを見出し、一部の PYCR 変異は ADCK4 のミトコンドリア局在に影響を与えることを明らかにした。本研究の新規ミトコンドリア複合体は、これまでに未知であった病態の解明や治療法の開発に重要な貢献をなすと考えられる。

よって本論文は博士（医学）の学位請求論文として合格と認められる。