

博士論文審査結果の要旨

学位申請者 奥井元貴

主論文 1編

Post-translational regulation of CALHM1/3 channel: N-linked glycosylation and S-palmitoylation
The FASEB Journal Epub ahead of print (doi:10.1096/fj.202002632R)

審査結果の要旨

calcium homeostasis modulator (CALHM)ファミリーのうち、CALHM1とCALHM3は電位依存性のATPチャンネルCALHM1/3複合体を形成する。これは味細胞のチャンネルシナプスにおいて神経伝達物質を放出する分子実体であり、塩味・甘味・うま味・苦味の情報を味神経へ伝える分子基盤の中心を担っている。しかし、CALHM1/3チャンネルの制御機構は依然として不明な部分が多い。

申請者は、CALHM3とCALHM1の相互作用がCALHM1の化学修飾の程度を変化させる可能性を生化学的に検証し、CALHM3の発現量の増加に伴い約45 kDaのCALHM1シグナルが増強する一方で、約40kDaのシグナルが減弱することを見出した。次に、分子量の変化に関してツニカマイシンやPNGase F、Endo Hを用いて検証し、CALHM1は複数のグリコシル化反応を受けた状態で存在することを見出した。また、CALHM1N139Q及びCALHM3N142Q変異体ではグリコシル化フォームが消失した。これらの結果を受け、Lec1細胞とPro5細胞を用いてCALHM1/3の細胞表面発現や電位依存性ゲーティングを検証し、Lec1細胞の細胞表面には約45 kDaのCALHM1が存在しないことやゲーティングが減速することを見出した。次に、CALHM1/3NQ変異体やツニカマイシンを用いてグリコシル化の意義を多角的に検証した。CALHM1NQ変異体やツニカマイシン処理下ではチャンネルコンダクタンスが消失したが、CALHM3NQ変異体ではチャンネルコンダクタンスが部分的に減少することやゲーティングが減速することを見出した。局在解析により、CALHM1NQ変異体やツニカマイシン処理下でチャンネル機能が観察できない原因としてCALHM1の細胞膜局在が抑制されることを見出した。また、CALHM1NQ変異体のタンパク発現量はMG132処理下で野生型と同等になる一方で、CALHM3NQ変異体は野生型と同等であった。以上の結果から、CALHM1とCALHM3はグリコシル化反応により異なる制御を受けることを明らかにした。次に、CALHM3のS-パルミトイル化反応は可逆的であることを明らかにした。CALHM3CS変異体を用いて検証し、C99、C200、C204がパルミトイル化部位であることを見出した。次に、DHHCパルミトイル化酵素を共発現し責任酵素候補を検証したところ、DHHC3/15がパルミトイル化レベルを増加させることやDHHC3/15とCALHM3が共免疫沈降すること、Dhhc3及び15をノックダウンするとパルミトイル化レベルが低下することを見出した。次に、タンパク質の安定性、CALHM1との結合能、細胞膜局在への影響という観点で検証し、それらに対しては影響しないが、ルシフェリルシフェラーゼ化学発光法を用いてATPの放出能を検証し、CALHM1存在下でCALHM3野生型を発現させると増加するが、CALHM3CS変異体ではその効果が認められないことを見出した。また、ホールセルボルテージクランプ法にて膜コンダクタンスがCALHM3変異体では低下していることを見出した。以上の結果から、CALHM3のパルミトイル化によりチャンネル機能を制御していることを明らかにした。以上が本論文の要旨であるが、CALHM1/3チャンネルのN-グリコシル化反応とS-パルミトイル化反応の意義の一端を解明した点で、医学上価値ある研究と認める。

令和3年4月15日

審査委員 教授 奥田 司 ㊞

審査委員 教授 平野 滋 ㊞

審査委員 教授 田中 秀央 ㊞