

## 論文内容の要旨

論文提出者氏名 奥井 元貴

### 論文題目

CALHM1/3 チャンネルの翻訳後修飾：N-結合型グリコシル化と S-パルミトイル化

### 論文内容の要旨

calcium homeostasis modulator (CALHM)ファミリーのうち、CALHM1と CALHM3は電位依存性 ATP チャンネル複合体 CALHM1/3 を形成する。CALHM1/3 チャンネルは、味細胞のチャンネルシナプスにおいて神経伝達物質 ATP の放出経路として機能し、塩味・甘味・うま味・苦味の情報の求心性味神経への神経伝達を担う。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。そこで、本研究では CALHM1/3 チャンネルの各サブユニットにおける既知の翻訳後修飾に着目し、N-グリコシル化反応と S-パルミトイル化反応の性質及びその意義を明らかにすることを試みた。

培養細胞発現系において、CALHM3の共発現により CALHM1の電流密度や細胞膜局在の亢進が認められたが、この現象の背景で CALHM1の化学修飾が変化している可能性についてウェスタンブロッティングで検証した。すると、CALHM3発現に伴い、約 45 kDa の CALHM1 シグナルが増強する一方、約 40kDa のシグナルが減弱していた。次に、この CALHM1 の分子量変化に関して、N-グリコシル化阻害剤であるツニカマイシンや N 型糖鎖を除去する PNGase F、アスパラギン結合ハイブリッド又は高マンノースオリゴ糖を切断する Endo H を用いて検証した。その結果、CALHM3 の存在は CALHM1 の N 型糖鎖の高マンノース型からハイブリット型/複合型へのプロセッシングを促進することが明らかとなった。さらに、高マンノース型からハイブリット型/複合型へのプロセッシングを担う酵素の欠損細胞株である Lec1 細胞において CALHM1/3 の電位依存性活性化キネティクスの減速が観察された。また、N→Q 点変異体の解析から、CALHM1 と CALHM3 はそれぞれ N139 及び N142 に N 型糖鎖が付加されることが明らかになった。そこで、各サブユニットが N-グリコシル化されること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一方、CALHM3NQ 変異体では電位依存性活性化キネティクスの減速が観察された。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かった原因は、

CALHM1 の細胞膜への局在が抑制されていることが原因であることが局在解析により明らかとなった。その原因として、CALHM1NQ 変異体でプロテアソームにおける MG132 感受性タンパク質分解が亢進している事が明らかとなり、CALHM1 生成の際の正しいフォールディングに N-グリコシル化が重要な役割を担うことが示唆された。以上の結果から、CALHM1/3 の各サブユニットにおける N-グリコシル化修飾の付与やそのプロセッシングがチャンネル形成から機能まで多様な制御に関与していることが解明された。

次に、CALHM3 が受ける S-パルミトイル化反応の可逆性を生化学的に検証し、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。次に、CALHM3 の C→S 変異体を用いてパルミトイル化部位を検証したところ、C99、C200、C204 が CALHM3 のパルミトイル化部位であることを見出した。次に、CALHM3 と 23 種類の DHHC パルミトイル化酵素を共発現させることで CALHM3 のパルミトイル化責任酵素候補を検証したところ、DHHC3 及び DHHC15 が CALHM3 のパルミトイル化レベルを増加させることを見出した。また、DHHC3 と 15 は CALHM3 と共免疫沈降すること、Dhhc3 及び 15 をノックダウンすることで CALHM3 のパルミトイル化レベルの低下を観察した。これらの結果は、DHHC3 と 15 が CALHM3 のパルミトイル化責任酵素であることを強く示唆している。

さらに、CALHM1/3 の機能発現における CALHM3 のパルミトイル化の意義をタンパク質の安定性、CALHM1 との多量体形成、細胞膜局在という観点で検証したところ、CALHM3 のパルミトイル化はそれらに対しては影響しなかった。しかし、野生型 CALHM1+野生型 CALHM3 に比べて野生型 CALHM1+CALHM3CS 変異体ではルシフェリルルシフェラーゼ化学発光法を用いて測定される ATP の放出能が強く減弱していた。また、パッチクランプ全細胞電位固定法で、ATP 放出能の低下が膜コンダクタンスの低下によるものであることを確認した。以上の結果から、CALHM3 のパルミトイル化はチャンネルの形成・細胞膜局在ではなく機能そのものを制御していることが明らかとなった。

以上、本研究では、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性質及び機能発現における役割を解明した。