

論文 / 著書情報
Article / Book Information

| | |
|-------------------|---|
| 題目(和文) | Wolfram症候群の原因遺伝子であるWFS1遺伝子の変異解析 |
| Title(English) | |
| 著者(和文) | 徳間啓 |
| Author(English) | Hiraku Tokuma |
| 出典(和文) | 学位:博士(理学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第12515号, 授与年月日:2023年9月22日, 学位の種別:課程博士, 審査員:糸 昭苑,白木 伸明,田口 英樹,田川 陽一,相澤 康則 |
| Citation(English) | Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第12515号, Conferred date:2023/9/22, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,, |
| 学位種別(和文) | 博士論文 |
| Category(English) | Doctoral Thesis |
| 種別(和文) | 論文要旨 |
| Type(English) | Summary |

論文要旨

THESIS SUMMARY

| | | | | | |
|--|----------------|----------|---|-----------------|------|
| 系・コース： Department of, Graduate major in | 生命理工学 生命理工学 | 系 コース | 申請学位 (専攻分野)： Academic Degree Requested | 博士 Doctor of | (理学) |
| 学生氏名： Student's Name | 徳間 啓 | | 指導教員 (主)： Academic Supervisor(main) | 糸 昭苑 | |
| | | | 指導教員 (副)： Academic Supervisor(sub) | 白木 伸明 | |

要旨 (和文 2000 字程度)

Thesis Summary (approx.2000 Japanese Characters)

Wolfram 症候群は若年での糖尿病を初発症状とする遺伝性希少疾患である。原因は *Wolfram Syndrome 1 (WFS1)* 遺伝子変異である。WFS1 は脳や心臓、腎臓などで発現し、膵臓では膵β細胞で発現している。Wolfram 症候群患者ではインスリン分泌能の低下や膵細胞数の減少が報告されている。WFS1 は 890 aa の 9 回膜貫通型タンパク質で主に小胞体に局在している。現在までに Wolfram 症候群患者では 200 以上の WFS1 遺伝子変異が報告されている。報告された変異の中でも WFS1 タンパク質の C 末端側のアミノ酸が欠損する nonsense や frameshift 変異を持つ患者は missense 変異に比べ、若年で糖尿病を発症する。この変異による症状が異なる分子機序は不明である。そこで、本研究では変異型 WFS1 タンパク質の安定性・インスリン分泌における機能を解析し、Wolfram 症候群における膵β細胞機能不全発症のメカニズムの解明を目指した。

次の 3 つの解析を行った。

1. WFS1 KO iOE iPS 細胞の樹立と解析

内在性の WFS1 遺伝子を欠失させ、Doxycycline の添加で WFS1 の発現を誘導する WFS1 KO iOE iPS 細胞 (WFS1 KnockOut inducible OverExpression iPS 細胞) を樹立した。しかし、WFS1 KO iOE iPS 細胞は WFS1 を強制発現しても内分泌前駆細胞への分化誘導ができなかった。一方、*Wfs1* ノックアウトマウスや Wolfram 症候群患者では膵臓は正常に発生しているため、WFS1 KO iOE iPS 細胞の樹立中に問題が生じたと考えられる。

2. 変異型 WFS1 タンパク質の安定性の解析

様々な蛍光リガンドでタンパク質を標識する HaloTag とプロテアソーム阻害剤を用いて、マウス膵β細胞由来細胞株 MIN6 細胞において WFS1 タンパク質の安定性を Pulse-chase 実験にて解析した。その結果、MIN6 細胞では野生型 WFS1 タンパク質に比べ、C 末端欠損変異型 WFS1 タンパク質がユビキチン・プロテアソーム系において速やかに分解されていた。

同様の解析をヒト胎児腎臓上皮由来 HEK293T 細胞とアフリカドリザル腎臓由来 COS7 細胞で行った。すると、HEK293T 細胞では、野生型 WFS1 タンパク質は C 末端欠損変異型 WFS1 タンパク質よりも速く分解した。一方、COS7 細胞では野生型 WFS1 タンパク質と C 末端欠損変異型 WFS1 タンパク質に分解速度の差はなかった。以上から、膵β細胞では他の細胞種とは異なり、C 末端欠損変異型 WFS1 タンパク質を特異的に分解するユビキチン・プロテアソーム系があると推察している。

3. WFS1 がインスリン分泌に与える影響に関する解析

変異型 WFS1 タンパク質の性状を MIN6 細胞で解析するために、shRNA を使い MIN6 細胞の *Wfs1* 遺伝子の発現を抑制した細胞株 (*Wfs1*-KD MIN6 細胞) を樹立した。また、コントロールとして non-targeting shRNA を導入した scramble_MIN6 細胞を樹立した。次に、変異型 WFS1 タンパク質のインスリン分泌能における機能を解析するために、*Wfs1*-KD MIN6 細胞に野生型 WFS1 タンパク質または変異型 WFS1 タンパク質を強制発現後、ELISA 法によりインスリン分泌能を評価した。その結果、scramble_MIN6 細胞はグルコース濃度に応じてインスリンを分泌した。一方、*Wfs1*-KD_MIN6 細胞は、グルコース濃度への依存性がみられなかった。*Wfs1* 遺伝子抑制によるインスリン分泌能の低下は、野生型 WFS1 タンパク質の強制発現により回復した。また、カリウムチャネル阻害剤 Tolbutamide 刺激によるインスリン分泌も同様であった。次に、Tolbutamide 刺激によるカルシウムの流入を解析した。その結果、*Wfs1* の抑制により Tolbutamide 刺激によるカルシウムイオンの細胞内流入は減少したが、野生型 WFS1 タンパク質の強制発現により回復した。一方、C 末端欠損変異型 WFS1 タンパク質の強制発現では回復しなかった。次に、野生型 WFS1 タンパク質の細胞内局在を解析した結果、小胞体と細胞膜近傍に存在していることが判明した。以上の 2 点から WFS1 タンパク質の一部は細胞膜近傍に局在し、カリウムチャネルの閉口・脱分極・電位依存性カルシウムチャネルの開口という細胞膜近傍での現象に関わりが示唆された。

以上の 3 つの解析から、WFS1 タンパク質の C 末端欠損変異を持つ Wolfram 症候群患者の膵β細胞では生後から WFS1 タンパク質量が少ないため、インスリン分泌能が低下し糖尿病を発症すると考えられる。今後は、膵β細胞において C 末端欠損変異型 WFS1 タンパク質の分解機構を同定し、その機構の特異的に阻害が Wolfram 症候群の治療標的となるか検討したい。

備考：論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note : Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1 copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).

(博士課程)
Doctoral Program

論文要旨

THESIS SUMMARY

系・コース： 生命理工学 系
Department of Graduate major in 生命理工学 コース
学生氏名： 徳間 啓
Student's Name

申請学位 (専攻分野)： 博士 (理学)
Academic Degree Requested Doctor of

指導教員 (主)： 糸 昭苑
Academic Supervisor(main)

指導教員 (副)： 白木 伸明
Academic Supervisor(sub)

要旨 (英文 300 語程度)

Thesis Summary (approx.300 English Words)

Wolfram Syndrome is a rare and monogenic disease mainly caused by mutations in the *Wolfram Syndrome 1* (*WFS1*) gene. Mutations in the *WFS1* gene lead to beta cell death and dysfunction, resulting in insulin-dependent diabetes. WFS1 protein consists of 890 amino acids and is a nine-transmembrane protein localized at the endoplasmic reticulum. The expression of *WFS1* is ubiquitous but at higher levels in the brain, heart, lung, and pancreas. In particular, only pancreatic beta cells express WFS1 in the pancreas. More than 200 mutations in the WFS1 gene have been reported in Wolfram syndrome patients. Among the mutations, patients with nonsense or frameshift mutations in the *WFS1* gene shows more severe symptom than patients with missense mutations. In this study, we focus on five C-terminally-truncated WFS1 proteins (Q266X, 409fs/ter440, Y652X, Y735X, W837X) and one missense mutation (P724L). We compared their stability in a pancreatic beta cell line (MIN6), HEK293T cells, and COS7 cells using the proteasome inhibitor and HaloTag. This self-labeling protein tag binds to various fluorescent ligands. As a result, in MIN6 cells, C-terminally-truncated WFS1 proteins were degraded faster than the wild-type or P724L mutant by the ubiquitin-proteasome system. On the other hand, in HEK293T cells, the wild-type was degraded faster than C-terminally truncated WFS1 proteins. In COS7 cells, the degradation rate of wild-type and C-terminally truncated proteins were almost the same. From these results, we suggested that selective degradation of C-terminally truncated WFS1 proteins occurs in the pancreatic beta cells. However, we could not identify the degradation system in this study. In the future, we would like to understand the degradation system and consider the specific inhibition of the system as a therapeutic target of Wolfram syndrome.

備考：論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note：Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).