

学位論文審査結果の要旨	
学位申請者 氏 名	釜 田 佳 季
審査委員	主査 鹿児島大学 教授 杉元 康志
	副査 鹿児島大学客員教授 大野木 宏
	副査 佐賀大学 教授 渡邊 啓一
	副査 鹿児島大学客員准教授 榎 竜嗣
	副査 琉球大学 教授 平良 東紀
審査協力者	九州大学 教授 植田 正
題 目	<p>アミロイドジェニックリゾチームの品質管理と小胞体ストレスに関する研究 (Studies on quality control and ER stress of amyloidogenic lysozyme)</p>
<p>現在、アルツハイマー病をはじめとして異常タンパク質の組織内での蓄積が原因でアミロイド病を発する多くの疾患が知られ、食品の機能成分を含めた治療薬の開発が進められている。その原因となるタンパク質は共通してアミロイド線維を形成し、細胞毒性を示すとされている。リゾチームは抗菌性を有する分泌タンパク質であるが、アミロイド線維形成タンパク質としてもよく研究されており、実際、ヒトでは点遺伝子変異によりアミロイド線維が形成され、全身性のアミロイドーシスを発症する。本研究ではリゾチームのアミロイドーシス発症機構を解明するため原因となるヒトリゾチーム変異体をヒト細胞で発現させ、タンパク質の細胞内動態を調べ、フォールディングとの関係について追究した。</p> <p>ヒト白血球cDNAライブラリーよりリゾチームcDNAを単離し、それをもとに4つのアミロイドジェニック変異体を作製後、発現ベクターを構築し、ヒト胚腎由来細胞HEK293に導入して発現を観察した。野生型に比べ、変異体は分泌が低かったが、細胞可溶化画分では量に差はなかった。一方、細胞不溶化画分には変異体が大量に観察された。つまり、変異体は細胞内に留まっていると推定され、細胞局在の観察の結果、小胞体内に蓄積していることが明</p>	

らかになった。小胞体ではミスフォールディングしたタンパク質を管理するいくつかのUPRシステムの存在が知られていることから、UPRについて検討した。その結果、リゾチーム変異体の場合、PERKやERAD経路は変化なく、IRE1-XBP1-GRP78/BiP経路が特異的に稼働していることが明らかになった。つまり、変異体の大量翻訳によって小胞体シャペロンであるGRP78/BiPを動員してフォールディングを完成させる傾向にあるが、完成されずに細胞内に蓄積していると推定された。興味深いことに変異体リゾチームとGRP78/BiPは会合したまま細胞不溶化画分に共在しており、フォールディングが出来ないばかりか異常タンパク質と共に小胞体内に蓄積し、その結果、小胞体ストレスを引き起こすことが明らかになった。

リゾチームにはアミロイド線維を形成するコア領域が存在し、変異体はこの領域に集中している。リゾチーム変異体とGRP78/BiPは結合したまま小胞体内に蓄積していることが示唆されたので、GRP78/BiPはリゾチームのどの領域と相互作用するのかを調べた。いくつかの領域を削除した欠損体を作製し、GRP78/BiPとの結合性を観察した結果、N-末端側を欠如した変異体はGRP78/BiPと反応しないことが確認された。この領域には疎水性残基が規則的に点在する $\alpha$ -ヘリックス1と2が含まれ、GRP78/BiPが挿入できるドックの構造をしており、コア領域を含む疎水性の高い領域をフォールディングを受け入れる構造になっていると推定された。次にリゾチームのI56を他のアミノ酸に置換してGRP78/BiPとの結合性を観察した結果、Leu、Val、Metが野生型と同じ性質を示し、それ以外の変異体はGRP78/BiPとの結合が確認され、小胞体ストレスを引き起こした。56番目の長い側鎖のアミノ酸がフォールディング後のGRP78/BiPとの解離に必要と判断した。

小胞体の品質管理において分子シャペロンGRP78/BiPによるフォールディングの失敗は異常タンパク質の蓄積を促進し、小胞体ストレスを誘発し、細胞に障害を与え、全身性アミロイドーシスの発症に関係すると結論した。

以上の結果から本研究はリゾチームの変異体が引き起こすアミロイドーシスは分子シャペロンGRP78/BiPも含めた異常タンパク質の蓄積、それによる小胞体ストレスによる細胞傷害が大きく関与していることを示唆した。本研究はアミロイド線維の病態発症のメカニズムの解明に寄与するだけでなく、ここで確立した系を使って食品をはじめとしたアミロイド病の予防剤や治療剤の開発に役立つ社会貢献の高いものである。したがって、審査委員一同は、本論文について博士（農学）の学位論文として十分な価値を持つと判定した。