

アミロイドジェニックスリゾチームの品質管理と
小胞体ストレスに関する研究

釜田 佳季
2016

目次

第1章	序論	1
第2章	アミロイド病に関わるヒトリゾチーム変異体の発現解析	
	第1節 目的	5
	第2節 試料調製および実験方法	5
	第3節 結果および考察	9
	第4節 要約	11
第3章	ヒトリゾチーム変異体の凝集体の解析	
	第1節 目的	12
	第2節 試料調製および実験方法	13
	第3節 結果および考察	13
	第4節 要約	14
第4章	ヒトリゾチーム変異体による小胞体ストレスの誘導	
	第1節 目的	16
	第2節 試料調製および実験方法	17
	第3節 結果および考察	18

第4節	要約	21
第5章	ヒトリゾチーム変異体と GRP78/BiP の相互作用	
第1節	目的	23
第2節	試料調製および実験方法	23
第3節	結果および考察	25
第4節	要約	26
第6章	ヒトリゾチームと GRP78/BiP との結合領域の探索	
第1節	目的	27
第2節	試料調製および実験方法	27
第3節	結果および考察	28
第4節	要約	32
第7章	ヒトリゾチーム N 末端の疎水性アミノ酸残基と GRP78/BiP との相互作用の関係	
第1節	目的	33
第2節	試料調製および実験方法	33
第3節	結果および考察	34

第4節	要約	35
第8章	56番目イソロイシン変異体と GRP78/BiP との相互作用特性	
第1節	目的	37
第2節	試料調製および実験方法	37
第3節	結果および考察	38
第4節	要約	41
第9章	総括	
第1節	総括	42
第2節	要約	50
第3節	Summary	52
	参考文献	54
	Table, Figure	63
	謝辞	94

略語

Armet	arginine-rich, mutated in early stage tumors
ATF4	activating transcription factor 3
ATF6 α	activating transcription factor 6 α
cDNA	complementary DNA
CHOP	C/EBP homologous protein
DAPI	diamidino-2-phenylidole
dsRNA	double-strand RNA
EDEM1	ER degradation-enhancing α -mannosidase-like protein1
eIF2 α	eukaryotic initiation factor 2 α
ER	endoplasmic reticulum
ERAD	ER-associated degradation
ERdj4	a member of ER-resident DnaJ family chaperons
GADD45	growth arrest and DNA damage-inducible protein
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GRP78/BiP	glucose-regulated protein 78/binding immunoglobulin protein
GRP94	a member of ER-resident Hsp90 family chaperones
HEDJ	an Hsp40 cochaperone localized to the ER
HRD1	HMG-CoA reductase degradation 1 homolog
IRE1	inositol-requiring enzyme 1

Lz	lysozyme
mRNA	messenger RNA
Nrf2	NF-E2-related factor 2(nuclear factor erythroid 2-related factor 2)
p58 ^{IPK}	potential negative regulator of eIF2 α
PBS	phosphate buffer saline
PCR	polymerase chain reaction
p-eIF2 α	phosphorylated eIF2 α
PDI	protein disulfide isomerase
PERK	double stranded RNA activated protein kinase (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase
PQC	Protein quality control
RNAi	RNA interference
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction
SDS	sodium lauryl sulfate
SDS PAGE	SDS polyacrylamide gel electrophoresis
UPR	unfolded protein response
WB	western blot
<i>XBP-1</i>	X-box binding protein 1 mRNA
XBP-1s	protein from the spliced XBP-1 mRNA
<i>XBP-1u</i>	unspliced XBP-1 transcript

第1章 序論

ミスフォールディングし線維化した異常タンパク質の蓄積は、アルツハイマー病や、パーキンソン病、プリオン病、二型糖尿病、リゾチームアミロイドーシスなどのアミロイドーシス性の疾患で認められる現象である[1-5]。これらの疾患に関わる原因タンパク質において、共通のアミノ酸配列や立体構造はないが、クロス β 構造からなるアミロイド線維を形成する性質をもっており、このアミロイド線維は様々な組織に蓄積することが知られている[6,7]。これらの原因タンパク質は、アンフォールディングした後に、オリゴマーもしくは中間体を形成し、凝集した後に最終的に枝分かれのないアミロイド様の線維となると考えられている[8,9]。このアミロイド線維は、多くの場合毒性を示すが、毒性を示さないものも存在する。この複雑な状況が、アミロイド線維と疾患との関係性について、研究を刺激し続けている[10,11]。アルツハイマー病に関わるアミロイド β ペプチド ($A\beta$) は、細胞毒性を示されているが、成熟したアミロイド線維よりもむしろ、初期の凝集体 (オリゴマー) や、線維化前の凝集体に強い細胞毒性を示すことが報告されている[12]。これらの線維のポリモルフィズムは、ミスフォールディングしたモノマーやオリゴマーからなるタンパク質の凝集体の構造的特性が、それぞれ異なっているからだと考えられる。

リゾチームは、生体内で広く遍在するタンパク質で、細菌のペプチドグリカン層を形成する、N-アセチルムラミン酸と N-アセチルグルコサミン間の β -1,4 グリコシド結合を加水分解することで抗菌活性をしめす[13,14]。ヒトのリゾチームにおいては、少なくとも 5 つの非ニューロパチー性全身性アミロイドーシスを引き起こす変異体が存在する。自然に存在する、リゾチームのシングル

ミューテーションとしては、 I56T, F57I, W64R, D67H (Fig. 1) が知られており、これらのリゾチーム変異体は、異常なタンパク質凝集体（アミロイド線維）を形成し、肝臓や脾臓、腎臓などの様々な臓器に蓄積し、アミロイドーシスを引き起こす[15]。これらの病原性のリゾチーム変異体は、野生型と比較して、僅かな構造変化を引き起こすと考えられている。さらに、 *in vitro* において、これらのリゾチーム変異体は、アミロイド線維を形成しやすいことが報告されている[16]。

当研究室では、これまで、ヒトリゾチームの構造的なホモログである卵白リゾチームを用いて、リゾチームのアミロイド形成メカニズムの解明を行ってきた。その結果、卵白リゾチームからアミロイド線維形成に必要な 9 個のアミノ酸からなる最小のペプチド (⁵⁴GILQINSRW⁶²) を同定した[17]。本ペプチドは、自己凝集性に富み、それだけでアミロイド線維を形成した。また、その中でも W62 が重要であり、このトリプトファンを別のアミノ酸に置換すると、線維の形成能が低下するかあるいは、全く生じないことが確かめられた。 W62 を含む領域の分子表面への露出により、 W62 を中心に分子会合が起こり、整列した構造を形成して線維化すると結論した。ヒトリゾチームでは、 W62 が Y63 に相当し、卵白リゾチームでのコアペプチドと配列に違いがみられるが、ヒトコアペプチドでも線維を形成することから、本ペプチドは、リゾチーム共通の線維形成領域と証明した。この領域はリゾチームの α -ドメインと β -ドメインを繋ぐポケット部分に存在し、ヒトの病原性リゾチームは、この付近のアミノ酸が変化しており、この領域の構造変化により、タンパク質の会合・凝集が促進され、線維化し、アミロイドーシスを引き起こすと考えられる。

ヒトリゾチームは、分泌タンパク質であるが、その他の分泌タンパク質と同様、体液や細胞外の組織に存在する。正常な機能を保持していないと思われるこれらの変異体の分泌が野生型と比較して変化するのかどうかは、非常に興味深い。構造的に不安なヒトリゾチーム変異体の分泌との関係性については、*Pichia pastoris* を用いた実験系で報告されており[16]、これらの変異体は分泌率が非常に低下することが分かっている。このヒトリゾチーム変異体の安定性と分泌の問題については、*Drosophila melanogaster* を用いた発現系でも探究されているが[17]、ヒトの細胞を用いての実験系については報告されていない。

これまでヒトリゾチームアミロイドーシスにおいて、細胞外でのリゾチームアミロイド線維の蓄積が疾患の主な原因と考えられてきたが、果たしてこのような構造的に不安定な異常なタンパク質が、細胞内での厳密なタンパク質品質管理システムをすり抜けて分泌することができるのだろうか。

そこで本研究では、この問いに答えるべく、4つの病原性リゾチーム変異体 I56T, F57I, W64R, D67H を用いて、ヒトの培養細胞に発現させ、変異体が正常に分泌されるのか、細胞内で蓄積し細胞になんらかの影響を与えるのではないか、もしくは、異常タンパク質として認識され速やかに分解されるのではないか、細胞内での影響について検証を行うことを最初の目的とした。そして本研究の結果、これらの変異体が小胞体ストレスを引き起こし、小胞体のシャペロンタンパク質である GRP78/BiP との相互作用を引き起こすことを新たに発見した。

第2章ではまず、ヒトリゾチーム遺伝子をヒト胎児腎細胞である HEK293 細胞に導入し、その発現の解析を行った。

第 3 章では、ヒトリゾチーム変異体にみられた凝集体について、特徴付けをするために細胞内での局在についての解析を行った。

第 4 章では、ヒトリゾチーム変異体の凝集体が、小胞体に蓄積していたため、小胞体ストレスの誘導が引き起こされているかどうか検出を行った。

第 5 章では、小胞体ストレスでキーのタンパク質となる GRP78/BiP と変異体の相互作用について、ヒトリゾチーム欠損体を用いて解析を行った。

第 6 章では、ヒトリゾチームのどの領域と GRP78/BiP が結合するのか、詳細な解析を行った。

第 7 章では、ヒトリゾチームと GRP78/BiP が結合すると推定される N 末端領域の疎水性アミノ酸残基が、結合に対しどのような影響を与えるか解析した。

第 8 章では、ヒトリゾチームの 56 番目のイソロイシンの変異が、GRP78/BiP との相互作用にどのような影響を与えるか解析した。

第2章 アミロイド病に関わるヒトリゾチーム変異体の発現解析

第1節 目的

リゾチームは、生体内に普遍的に存在する分泌タンパク質である。抗菌活性を示すことから、自然免疫系において重要な役割を担っている。ヒトでは、疾患を引き起こすヒトリゾチーム変異体が存在し (I56T, F57I, etc...) それらは、生体内で、線維状の凝集体を形成し、臓器の機能不全を引き起こす。この疾患は、ヒトリゾチームアミロイドーシスと呼ばれ、またその線維状凝集体はアミロイド線維と呼ばれ、リゾチームにとどまらず、様々なタンパク質がアミロイド線維を形成することが知られている。このアミロイド線維を形成する変異体は、構造的に不安定であるため、この異常なタンパク質は正しく折りたたまれず、細胞内に蓄積するのではないと予想した。そこで、まず野生型およびヒトリゾチーム変異体 (I56T, F57I, W64R, D67H) の発現ベクターを構築し、ヒト培養細胞である HEK293 細胞に導入し、過剰発現させ、発現・分泌が正常に行われるのか解析を行った。

第2節 試料調製および実験方法

1. 細胞および試薬

ヒト胎児腎細胞である HEK293 細胞は、RIKEN BRC (Tsukuba, Japan) から購入した。生育培地には DMEM 培地 (WAKO, Osaka, Japan) に、予めウシ胎児血清 (GIBCO, Grand Island, NY) を 10%、1 × MEM 非必須アミノ酸溶液 (GIBCO)、1 × 抗生物質-抗真菌剤溶液 (GIBCO) を添加したものをを用いた。トランスフェクションの際には、予め抗生物質-

抗真菌剤の含まない培地で細胞を継代したものをを用いた。抗ヒトリゾチーム抗体は Abcam (Cambridge, MA) から購入しウェスタンブロットと免疫蛍光染色に用いた。抗 GAPDH 抗体は、 Santa Cruz Biotechnology (San Diego, CA) から購入した。ウェスタンブロットの二次抗体として使用したペルオキシダーゼ結合抗マウス抗体および抗ウサギ抗体は、 Jackson Immuno Reseach (WestGrove, PA) から購入した。免疫蛍光染色の二次抗体として使用した Alexa Fluor 488 または Alexa Fluor 546 結合抗体は、 Life Technologies (Carlsbad, CA) から購入した。MG-132 はペプチド研究所 (Osaka, Japan) から購入した。

2. 発現ベクターの調製

シグナル配列を含めたヒトリゾチームの cDNA クローニングは、ヒト白血球細胞の cDNA ライブラリーから PCR で増幅し、 pENTR™11 に導入したものを九州大学農学部 日下部 宜宏 教授からいただき、それを鋳型に、リゾチーム変異体の発現のための変異を inverse-PCR で導入した。野生型と 4 つの変異体 (I56T, F57I, W64R, D67H) の cDNA は、CAG プロモーターをもつ pEB-Multi-neo-vector (WAKO) に導入し、HEK293 細胞にトランスフェクションし発現させた。

3. トランスフェクション

トランスフェクションは、 X-tremeGENE HP (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) を用いて、リポフェクション法で導入した。まず、トラ

ンスフェクションの前日に 35 mm dish もしくは、6 well プレートに細胞数が 1.5×10^6 cells/2 ml になるように細胞を播種した。トランスフェクションは 1 well あたり、Opti MEM (GIBCO) 196 μ l に 4 μ l のベクター DNA 溶液 (0.5 μ g/ μ l) を加え、さらに 4 μ l の X-tremeGENE HP を加えたトランスフェクション溶液を調製し、15 分間室温でインキュベートした後に、細胞に滴下して行った。

4. ウェスタンブロット

トランスフェクション後の細胞を回収し、protease inhibitor cocktail (Roche) を含む、10 mM トリス塩酸バッファー, pH 7.4, 1% NP-40 で溶解した。溶解後、14,000 g で 20 分遠心し、その上清を可溶性画分とした。可溶性画分のタンパク質濃度は、Micro BCA protein assay system (Thermo/Pierce, Rockford, IL) で測定し、ゲルにアプライする量を揃えた。ペレットは、100 μ l の 2 \times SDS サンプルバッファー (0.125 M トリス塩酸バッファー, pH 6.8, 10% 2-メルカプトエタノール, 10% SDS, 10% スクロース) を加え、可溶化させ、不溶性画分として、ウェスタンブロットに用いた。培地上清も 2 \times SDS サンプルバッファーと等量混合後、ウェスタンブロットに用いた。SDS PAGE 後、タンパク質は、Immobilon-P (Merck Millipore, Billerica, MA) に転写し、1%スキムミルク in TBS-T でブロッキング後、一次抗体で一晩インキュベートさせた。その後、ペルオキシダーゼ結合二次抗体で 30 分反応させた。検出は ECL 試薬と ChemiDoc (Bio-Rad, Hercules, CA) を用いて化学発光法で行い、バンドの強度は、

Image Lab™ Software (Bio-Rad) を用いて測定した。

5. RT-PCR

トランスフェクション後の細胞のトータル RNA は、TRIzol® (Life Technologies) を用いて、キットの説明書に従い、回収した。その後、Rever Tra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover を用いて逆転写を行い鋳型 cDNA とした。その後、各遺伝子の特異的プライマー (Table.2) を設計し、PCR 反応は、TAKARA PCR Thermal Cycler Dice® Touch (TAKARA BIO, Otsu, Japan) を行った。アガロースゲルで電気泳動後ゲルをエチジウムブロマイドで染色し、バンドは ChemiDoc で検出した。

6. 免疫蛍光染色

トランスフェクション 24 時間後に、細胞をコラーゲンコート処理されたスライドガラス (IWAKI, Shizuoka, Japan) に播き直し、さらに 48 時間インキュベートした。処理後の細胞を PBS で 3 回洗浄後、10%トリクロロ酢酸または、4%パラホルムアルデヒド in PBS で、室温で 15 分固定した。0.2%Triton X-100 in PBS で 10 分間、細胞膜透過処理後、ブロッキングバッファー (10% ヤギ正常血清 または、1% ウシ血清アルブミン in TBS-T) で、30 分インキュベートした。その後、特異的抗体で一晩反応後、蛍光標識二次抗体で 2 時間反応させた。作製したサンプルは、Prolong® Gold Antifade Reagent で封入し、共焦点レーザー顕微鏡 (EZ-C1, Nikon, Tokyo, Japan) で観察した。

7. 細胞の生死判定

細胞の生死判定は、トランスフェクション後 72 時間の細胞を回収し、Guava ViaCount® Reagent (Merck Millipore) を用いて、キットの説明書に従い染色を行った。染色した細胞の検出は、Guava easyCyte™ HT sampling Flow Cytometer (Merck Millipore) を用いて行った。

第 3 節 結果および考察

まず、野生型ヒトリゾチームおよび4つのヒトリゾチーム変異体 (I56T, F57I, W64R, D67H, Fig. 1) をそれぞれ HEK293 細胞に過剰発現させ、トランスフェクション後 72 時間の細胞を回収し、フローサイトメーターを用いて細胞の生死判定を行った (Table.1)。野生型と変異体のヒトリゾチームを発現させた細胞ともに、80-90%の生存率を示した。また、野生型と変異体間でアポトーシス細胞と死細胞にも大きな差はみられなかった。

次に、野生型と変異体の HEK293 における遺伝子発現解析と、細胞内での挙動を解析した。まず、mRNA レベルでの遺伝子発現は、RT-PCR で行ったが、Mock 細胞を除いて、野生型と変異体すべてで発現が認められた。このことから、HEK293 細胞においては、導入したヒトリゾチームが正常に発現し、また内在性の発現が低いことが分かった。

次にウェスタンブロットを用いてタンパク質レベルでのヒトリゾチームの発現を解析した (Fig.2A)。Mock 細胞は、明瞭なバンドが認められず、mRNA での発現が認められなかったように、タンパク質レベルでも発現していなかった。野生型の場合、培地上清中画分に強いシグナルが得られたが、変異体では薄い

バンドしか得られなかった。それとは対照的に、細胞内の不溶性画分には、変異体は野生型よりも強いシグナルが得られた。さらに、細胞内の可溶性画分においては、野生型の方がわずかながら変異体よりも強いバンドが得られた。以上の結果から、野生型とは違い、ヒトリゾチーム変異体は細胞内で不溶化し、蓄積していることが推察される。

また、プロテアソームによる分解が引き起こされているか、プロテアソーム阻害剤を用いて解析を行った。トランスフェクション後 24 時間の細胞に MG-132 (5 μ M) で 12 時間処理し、回収後ウェスタンブロットでタンパク質の増減を確認した (Fig. 2B)。Nrf2 タンパク質は、恒常的にプロテアソームで分解されるタンパク質のため、ポジティブコントロールとして用いた。野生型および変異体において、ライセイト画分でのタンパク質増減は多くても 1.3 倍ほどで、ほとんど分解されていないことが分かった。また、ペレット画分での増減も全くみられなかった。以上の結果から、変異体は異常タンパク質として分解されてはいないことが分かった。また、MG-132 処理で野生型および変異体でわずかに分泌されるリゾチーム量が減少していた。これは、プロテアソーム阻害がタンパク質の分泌に何らかの影響を与えるためだと推定できる。

ヒトリゾチームは、分泌タンパク質であるが、変異体において細胞内の不溶性画分に多く存在することが認められた。そこで、細胞内での挙動を確かめるために、トランスフェクション後の細胞を固定し、ヒトリゾチーム特異的抗体を用いて免疫蛍光染色を行い、細胞の観察を行った (Fig. 3)。Mock 細胞は、ウェスタンブロットの結果と同様、細胞内での存在が認められなかった。野生型を発現させた細胞では、細胞内で広く分布しているのに対し、変異体は、細

胞内で蓄積しているような、ある特定の局在を示す分布であった。

さらに、この蓄積が凝集体であるか確かめるに、凝集タンパク質を染める ProteoStat® (Enzo Life Science, Farmingdale, NY) を用いて、ヒトリゾチームと共染色を行った (Fig. 4)。野生型では ProteoStat® ポジティブな領域は細胞内に認められなかったのに対し、変異体では、ProteoStat® ポジティブな領域が認められ、それらは、ヒトリゾチーム変異体の局在と共局在していた。つまり、変異体は細胞内で不溶化していた。以上の結果は、ウェスタンブロットでの変異体が不溶性画分に多く存在していたことに類似しており、変異体は正常に分泌されず、大部分は、細胞質内のある特定の領域で、不溶化している可能性を示した。

第 4 節 要約

HEK293 細胞に野生型および 4 つのアミロイドーシスを引き起こす変異体 (I56T, F57I, W64R, D67H) を導入し、発現解析を行った。変異体は、ウェスタンブロットの結果から正常に分泌されず、プロテアソームによる分解も受けずに細胞内に蓄積していることが分かった。また、免疫蛍光染色および ProteoStat® による染色の結果から、変異体は、細胞内で局在性をもって不溶化していることも分かった。つまり、変異体は、細胞内で大部分が凝集しながら蓄積し、正常に分泌されないことが示唆された。

第3章 ヒトリゾチーム変異体の凝集体の解析

第1節 目的

第2章において、ヒトリゾチーム変異体は、細胞内のある特定の局在性を示しながら、不溶化していることが示された。そこで、この凝集体がいったい何なのか、2つの仮説を考えた。

1つ目の仮説は、アグリソーム仮説である。ミスフォールディングやタンパク質分解系の異常により細胞内に異常タンパク質が蓄積した場合、細胞は、アグリソームと呼ばれる凝集体構造を形成することが知られている[18]。このアグリソームとは、ユビキチン化された異常タンパク質が、微小管上を移動するダイニンモーターにより中心体付近に集められ、周囲を中間径フィラメントであるビメンチンに覆われている封入体である。前章で用いた ProteoStat® は、このアグリソームを染色するものであり、ヒトリゾチーム変異体でみられる凝集体がアグリソームであるか、そのコンポーネント(ビメンチン・ γ -チューブリン)と共染色し、検証した。

さらに、もう1つの仮説として、分泌タンパク質であるヒトリゾチームが、その分泌経路の途中で蓄積・凝集しているというものである。分泌タンパク質は、まず細胞小器官である小胞体に運ばれ、そこで正しいフォールディングとジスルフィド結合の形成を行い、その後ゴルジ体に輸送され、糖タンパク質は糖鎖修飾を受けて、細胞外へと分泌される。野生型ヒトリゾチームは、正しくフォールディングし、速やかに分泌されるのに対し、変異体は正しくフォールディングできずに、小胞体もしくはゴルジ体で蓄積しているのではないかと予想した。以上の、仮説を証明するために、それぞれの細胞小器官のマーカータ

ンパク質と免疫蛍光染色を用いて観察を行った。

第2節 試料調製および実験方法

1. 細胞および試薬

前章と同様に HEK293 細胞を培養した。また、細胞へのトランスフェクションも同様の方法で行った。抗 γ -tubulin 抗体と抗 Golgi 58K 抗体は、Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) から購入した。抗 Vimentin 抗体は、Santa Cruz Biotechnology から購入した。抗 PDI 抗体は、Abcam から購入した。

2. 免疫蛍光染色

前章と同様の方法で行った。

第3節 結果および考察

まず、ヒトリゾチーム変異体が形成する ProteoStat® ポジティブの凝集体がアグリソームであると予想し、アグリソームのコンポーネントタンパク質の特異的抗体を用いて共染色を行った (Fig. 5)。アグリソームは、細胞内の中心体付近に形成されることが知られている。そこで、中心体を形成しているタンパク質の一つである γ -チューブリンとヒトリゾチームで共染色を行った (Fig. 5A)。ヒトリゾチーム変異体は前章と同様、細胞内で凝集体を形成していたが、 γ -チューブリンの局在とは全く一致しなかった。つまり、中心体付近に形成されていなかった。次に、アグリソームのコンポーネントの一つであるビメンチ

ンと共染色を行った (Fig. 5B)。しかし、こちらも γ -チューブリンと同様に、共局在性を示さず、この凝集体はビメンチンに覆われていなかった。以上から、ヒトリゾチーム変異体が形成する凝集体は、アグリソームではないことが示された。

次に、ヒトリゾチーム変異体が分泌経路の途中で蓄積している仮説を検証した。小胞体のマーカータンパク質として PDI、ゴルジ体のマーカータンパク質として Golgi 58K それぞれの特異的抗体を用いて、ヒトリゾチーム特異的抗体とともに、共染色を行った (Fig. 6)。まず、小胞体内でジスルフィド結合の形成に関わるタンパク質である PDI と共染色し観察したところ (Fig. 6A)、PDI の局在とヒトリゾチーム変異体の局在が非常によく一致していた。一方、ゴルジ体のマーカーとして用いた Golgi 58K との共染色では (Fig. 6B)、ヒトリゾチーム変異体の凝集体と Golgi 58K のシグナルは一致せず、ゴルジ体には蓄積していないことが分かった。つまり、ゴルジ体に輸送されずに、小胞体内で蓄積していた。以上の結果をまとめると、ヒトリゾチーム変異体の凝集体は、ProteoStat® ポジティブな凝集体ではあるものの、アグリソームでなく、小胞体内で蓄積していた。そこで、次の章では、小胞体内での異常タンパク質の蓄積で引き起こされる小胞体ストレスについて、解析を行なうことにした。

第4節 要約

ヒトリゾチーム変異体は、細胞内で ProteoStat® ポジティブな凝集体を形成するが、それらは、アグリソームのコンポーネントである γ -チューブリンやビメンチンと共局在性は示さなかった。一方で、小胞体のマーカータンパク質で

ある PDI と局在が非常によく一致しており、ゴルジ体のマーカートンパク質である Golgi58K とは共局在性は示さなかった。つまり、ヒトリゾチーム変異体が正常に分泌されないのは、小胞体内で凝集・蓄積していたためと結論付けた。

第4章 ヒトリゾチーム変異体と小胞体ストレスの誘導

第1節 目的

小胞体内にミスフォールディングしたタンパク質が蓄積すると小胞体ストレスを引き起こすことが知られている[19]。小胞体ストレスが引き起こされると、細胞は異常タンパク質を正しいフォールディングに導くためにシャペロンタンパク質の発現誘導や、これ以上の異常タンパク質の産生を抑えるために翻訳抑制を行なうなどの **unfolded protein response (UPR)** を誘導する[19]。UPRの誘導には、小胞体シャペロンタンパク質である **GRP78/BiP** が重要な役割を担っている。小胞体ストレスがかかっていない場合、**GRP78/BiP** は小胞体膜貫通型タンパク質で、UPRのトランスデューサタンパク質でもある **PERK・IRE1・ATF6** と結合している。小胞体内に異常タンパク質が蓄積すると、**GRP78/BiP** は分子シャペロンとしてそのフォールディングに使用され、**PERK・IRE1・ATF6** から遊離する。すると、**PERK・IRE1・ATF6** は活性化され、シグナル伝達により、シャペロンタンパク質の発現誘導や翻訳抑制、異常タンパク質の分解のための小胞体関連分解 (**ERAD**) などの誘導を行う [20,21]。

第3章にて、ヒトリゾチーム変異体の凝集体は、小胞体で凝集・蓄積していると結論付けた。そこで、ヒトリゾチーム変異体の発現によって、小胞体ストレスが引き起こされ、細胞は **UPR** を誘導しているのではないかと仮説を立てた。本章では、ヒトリゾチーム変異体が小胞体ストレスを引き起こしているかどうか検証するために、小胞体ストレスの誘導に関わる **GRP78/BiP** の発現解析、3つの **UPR** 誘導経路 (**PERK**、**IRE1**、**ATF6**) の活性化の解析、**UPR** 関連遺伝子の発現解析を行った。

第2節 試料調製および実験方法

1. 細胞および試薬

前章と同様に HEK293 細胞を培養した。また、細胞へのトランスフェクションも同様の方法で行った。抗 GRP78/BiP 抗体は、ウェスタンブロット用には、R&D system (Minneapolis, MN) から購入し、免疫蛍光染色用には、Santa Cruz Biotechnology から購入した。抗 XBP-1s 抗体は、Biolegend (San Diego, CA) から購入した。抗 eIF2 α 抗体及び抗 p-eIF2 α 抗体、抗 cleaved caspase-3 抗体は、Cell Signaling Technology (Beverly MA) から購入した。抗 ATF6 抗体は、BioAcademia (Osaka, Japan) から購入した。

2. RNA 干渉

HEK292 細胞は、6 well プレートに 1 well あたり、 1.5×10^6 cells /well で播種し、24 時間前培養を行い、トランスフェクションした。野生型および変異ヒトリゾチーム cDNA それぞれ導入した発現ベクター (pEB-Multi-neo-vector) と RNA 干渉のための 21 塩基の二本鎖 RNA のコトランスフェクションは、X-tremeGENE siRNA (Roche) を用いて行った。21 塩基の二本鎖 RNA の配列は、5'-UUUUGACAACGAUUUCUCCAU-3'/5'-GGAGAAAUCGUUGUCAAAACA-3'で、ヒトリゾチームの cDNA 配列の 387-409bp に相当する部分を用いた。さらに、トランスフェクション後 72 時間の細胞をウェスタンブロット解析および RT-PCR による発現解析を行った。

3. 免疫蛍光染色

前章と同様の方法で行った。

4. ウェスタンブロット

UPR 関連遺伝子の発現解析に用いるサンプルには、細胞を直接 2 × SDS サンプルバッファーで溶解したものを使用した。そのほかの手順は、前章と同様の方法で行った。

5. RT-PCR

前章と同様の方法を行った。

6. リアルタイム PCR

RT-PCR と同様の方法で、鋳型 cDNA を調製した。GRP78/BiP や XBP-1、その他の UPR 関連の遺伝子を検出するためのプライマーは、Primer blast (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA) を用いて設計した (Table.2)。PCR 反応液は、SYBR® Premix *Ex Taq*[™] (TAKARA BIO) を用いてキットの説明書に従い調製した。PCR 反応は、Thermal Cycler Dice® Real time system II (TAKARA BIO) を用いて行った。得られたデータは、GAPDH 遺伝子で標準化を行った。

第3節 結果および考察

まず、UPR のセンサータンパク質として知られており、また、小胞体内の

分子シャペロンとしての働きを持つ GRP78/BiP の発現解析を行った (Fig. 7)。ウェスタンブロットの結果から (Fig. 7A)、GRP78/BiP は小胞体内に豊富に存在するためか、細胞内の可溶性画分にて、野生型と変異体間での発現量違いは、ほとんど確認できなかった。しかし興味深いことに、細胞のペレット画分 (不溶性画分) において、野生型と比較して、変異体では GRP78/BiP の強いバンドが検出された。さらに、GRP78/BiP を免疫蛍光染色で染めると (Fig. 7B)、GRP78/BiP とヒトリゾチーム変異体の局在が完全に一致していた。このことから、ヒトリゾチーム変異体と GRP78/BiP は相互作用しながら凝集体を形成しているのではないかと推論できる。

次に、ヒトリゾチーム変異体の発現で、UPR の 3 つの経路 PERK・IRE1・ATF6 の活性化が引き起こされているかどうかウェスタンブロットを用いて検証した (Fig. 8)。この解析に用いたサンプルは、全細胞溶解のため、野生型と変異体でヒトリゾチームの発現量に差はみられなかった。IRE1 は活性化すると RNase 活性を示し、細胞質に存在する *XBP-1* の mRNA をスプライシングし、フレームシフトを引き起こし、転写因子 XBP-1s の発現を誘導する [22]。ウェスタンブロットの結果から、ヒトリゾチーム変異体では、この XBP-1s の発現が上昇しており、IRE1 経路の活性化が引き起こされていた。一方、PERK の下流で、翻訳抑制に関わる e-IF2 α のリン酸化や、ATF6 経路の自己切断による活性化 (ATF6 は GRP78/BiP から遊離すると、ゴルジ体に輸送され、2 種のプロテアーゼ S1P/S2P で切断され転写因子として働く) は引き起こされていなかった。

次に、UPR 関連遺伝子の発現解析をリアルタイム PCR を用いて定量解析した (Fig. 9)。ヒトリゾチーム遺伝子の発現は、RT-PCR の結果 (Fig. 2A) と同

様に野生型と変異体間で大きな違いはなかった。IRE1 経路の下流の転写因子 *XBP-1* に関しては、トータル *XBP-1* とスプライシングされていない *XBP-1u* の発現は、野生型と変異体間で差は認められなかったが、スプライシングされた *XBP-1s* の発現量が変異体で野生型と比較して 2 倍に上昇していた (Fig. 9A)。この結果は、ウェスタンブロットの結果 (Fig. 8) と、合致していた。また、*XBP-1s* が発現誘導する *GRP78/BiP* の遺伝子発現もすべての変異体で、Mock より 2 倍以上上昇していた (Fig. 9A)。さらに、この IRE1-XBP-BiP 経路に関連する *ERdj4*、*HEDJ*、*GRP94* の発現も変異体にて上昇傾向がみられた (Fig. 9A)。また、PERK 経路のダウンレギュレーターとして働く *p58^{IPK}* (翻訳開始因子 eIF2 α のリン酸化を抑制する) の発現上昇もみられた (Fig. 9B)。この *p58^{IPK}* の発現が上昇していたため、ウェスタンブロットの結果で eIF2 α のリン酸化が抑制されていたと推察できる。また、PERK の下流の *ATF4* の発現上昇は認められなかったが、*ATF4* のターゲットである *CHOP* の発現はわずかに上昇していた (Fig. 9B)。しかし、タンパク質レベルでの *CHOP* の発現は認められなかったため (data not shown)、アポトーシスは誘導されなかったと考えられる。また、小胞体ストレスによる細胞死を抑制する *Armet* の発現が変異体で約 1.5 倍上昇していたため、これも細胞死が誘導されなかった一因と考えられる (Fig. 9B)。以上の結果から、ヒトリゾチーム変異体を発現させると、小胞体ストレスが誘導され、主に IRE1 経路の活性化が引き起こされることが分かった。

さらに、ヒトリゾチーム変異体が小胞体ストレスを引き起こし IRE1 経路の活性を引き起こしていることを立証するために、RNA 干渉 (RNAi) を用いて、

ヒトリゾチームの発現抑制を行った (Fig. 10)。ヒトリゾチームの発現ベクターとヒトリゾチームの発現を抑制する dsRNA をコトランスフェクションし、まずヒトリゾチームの発現が低減されるか確認を行った (Fig. 10A)。今回ヒトリゾチーム cDNA の 387-409bp に相当する領域の dsRNA を用いたが、ヒトリゾチームの転写産物の減少およびタンパク質レベルの減少が認められた。その結果を踏まえ、変異体で認められた XBP-1 のスプライシングを RT-PCR で検出したところ、ヒトリゾチームの発現抑制によって、スプライシングも抑制されていた。また、タンパク質レベルでの XBP-1s の減少も認められた。つまり、ヒトリゾチーム変異体の発現を抑制することで確かに IRE1 経路の活性化が抑制されていることが立証された。また、ヒトリゾチームの変異体において、細胞内の不溶性画分 (ペレット画分) でみられた GRP78/BiP の増加も、RNAi によって、減少した (Fig. 10B)。以上から、ヒトリゾチーム変異体の過剰発現は、細胞に小胞体ストレスを引き起こすが、発現量を減少させることで、そのストレスは軽減されることが分かった。

この章の結果を踏まえ、ヒトリゾチーム変異体は GRP78/BiP と相互作用しながら凝集体を形成し、UPR のトランスデュースタンパク質 (特に IRE1) から GRP78/BiP を奪うことで、IRE1 経路の活性化を誘導するのではないかと、新たな仮説を立てた。そして、次章では、この仮説を立証するために、ヒトリゾチーム変異体と GRP78/BiP との相互作用について、解析した。

第 4 節 要約

ヒトリゾチーム変異体は、その発現により小胞体ストレスを引き起こすこと

が分かった。そして、HEK293 細胞は、このストレスに対し、3つの UPR 経路の中で主に IRE1 経路の活性化を誘導することが分かった。また、この活性化は、ヒトリゾチームの発現を RNAi により抑止することで、低減されることも立証された。ヒトリゾチーム変異体がどのようなメカニズムで小胞体ストレスを引き起こすかは、不明である。だが、小胞体ストレスのセンサータンパク質である GRP78/BiP が変異体と同様に不溶性画分に多く存在していたこと、そして、変異体と GRP78/BiP の局在が非常によく一致していたことを踏まえ、次のような仮説を立てた。ヒトリゾチーム変異体は GRP78/BiP と相互作用しながら凝集体を形成し、結果として、UPR のトランスデューサタンパク質 (IRE1) から GRP78/BiP を奪うことで UPR を誘導する。次章では、この仮説を立証するために、ヒトリゾチーム変異体と GRP78/BiP が相互作用するのかどうか解析を行った。

第5章 ヒトリゾチーム変異体と GRP78/BiP との相互作用

第1節 目的

URP のトランスデュースタンパク質 (PERK、IRE1、ATF6) は、通常 GRP78/BiP と結合しており不活性化しているが、異常タンパク質の増加により、GRP78/BiP が不足すると、結合していた GRP78/BiP が解離し、活性化する [20,21]。前章で、ヒトリゾチーム変異体の発現により、UPR の活性化を立証した。また、ヒトリゾチーム変異体は、UPR センサータンパク質である GRP78/BiP と共局在し、また、GRP78/BiP は、不溶性画分に多く存在していた。これまでの結果を踏まえ、ヒトリゾチーム変異体は GRP78/BiP と相互作用しながら凝集体を形成し、結果として、UPR のトランスデュースタンパク質 (IRE1) から GRP78/BiP を奪うことで UPR を誘導するという可能性が考えられる。

そこで本章では、ヒトリゾチーム変異体と GRP78/BiP と相互作用するのか証明するために、FLAG タグ付加 GRP78/BiP (FLAG-GRP78/BiP) を発現させ、免疫沈降法を用いて、ヒトリゾチーム変異体が共沈降するかどうか解析を行った。

第2節 試料調製および実験方法

1. 細胞および試薬

前章と同様の方法で、細胞培養を行った。ウェスタンブロット用の抗 FLAG 抗体と、免疫沈降に用いた抗 FLAG-M2 Affinity Gel は、Sigma Aldrich から購入した。ヘキサキナーゼは、オリエンタル酵母 (Tokyo, Japan) か

ら購入した。

2. FLAG-GRP78/BiP の発現ベクターの調製

ヒト GRP78/BiP の cDNA は、HEK293 細胞の cDNA ライブラリー(前章の RT-PCR で調製した逆転写産物) から、遺伝子特異的プライマーを用いて調製した。GRP78/BiP の cDNA は、In-Fusion HD cloning system (TAKARA BIO) で、pBApo-EF1 α vector (TAKARA BIO) に導入した。また、GRP78/BiP のシグナル配列のすぐ後ろに、FLAG タグ (DYKDDDDK) を付加し、N 末端に FLAG タグが付加した FLAG-GRP78/BiP 発現ベクターを構築した。

3. トランスフェクション

前章と同様の方法で行った。

4. ウェスタンブロット

前章と同様の方法で行った。

5. 共免疫沈降

共免疫沈降のため、はじめに HEK293 細胞に FLAG-GRP78/BiP 発現ベクターをトランスフェクションした。トランスフェクション 24 時間後、さらにヒトリゾチーム発現ベクターをトランスフェクションした。さらに、48 時間インキュベートした後、NP40 lysis buffer で細胞ライセイトを調製した。その際、GRP78/BiP とリゾチームの結合を維持するために、NP40

lysis buffer に 10 U/ml のヘキソキナーゼと 0.2 mM グルコースを添加し、細胞ライセイトに残存する ATP を除去した。FLAG-GRP78/BiP を回収するために、細胞ライセイトを anti-FLAG M2 Affinity Gel に添加し (Gel のベッドボリューム 20 μ l に対し、細胞ライセイトを 800 μ l 添加)、4°C で 2 時間緩やかに攪拌しながらインキュベートした。インキュベート後、PBS で 3 回洗浄し、非特異的結合を除去した。その後、Gel に 2 \times SDS サンプリングバッファーを 40 μ l 加え、95°C で 3 分インキュベートし、Gel からタンパク質を抽出した。抽出産物 (共免疫沈降したヒトリゾチームおよび FLAG-GRP78/BiP) および各フラクション (細胞内可溶性画分・細胞内不溶性画分・培地上清) 中のターゲットタンパク質の解析は、ウェスタンブロットで行った。

第 3 節 結果および考察

ヒトリゾチーム変異体と GRP78/BiP が相互作用しているかどうか確かめるため、FLAG-GRP78/BiP とヒトリゾチームを HEK293 に発現させた。そして、FLAG-GRP78/BiP を抗 FLAG 抗体で回収し、共免疫沈降したヒトリゾチームをウェスタンブロットで検出した (Fig. 11A)。野生型および変異体すべてのヒトリゾチームの発現が細胞可溶性画分 (免疫沈降にもちいたライセイト) で発現が認められた。しかし、抗 FLAG 抗体で免疫沈降した画分において、野生型では、共免疫沈降していなかったのに対し、変異体では、共免疫沈降していた。つまり、FLAG-GRP78/BiP と相互作用している可能性が示された。

次に、同様の実験で、変異体の中で特に I56T を用いて、ATP の存在下・

非存在下で、GRP78/BiP と変異体の相互作用が変化するか解析を行った (Fig. 11B)。GRP78/BiP は、ATP が過剰に存在すると、基質タンパク質をリリースすることが知られている。そこで、細胞可溶バッファーに 10 U/ml のヘキソキナーゼと 0.2 mM のグルコースを添加して ATP 非存在下にした場合 (ATP-) と、ATP を添加し ATP が豊富に存在する場合 (ATP+) の 2 つの条件で、共免疫沈降してくる I56T の量の比較を行った。ATP 非存在下での共免疫沈降した I56T と比較して、ATP 存在下では、I56T のバンドの強度が明らかに弱くなっていた。つまり、ATP の存在により GRP78/BiP と I56T の結合がしなくなった。以上から、ヒトリゾチーム変異体と GRP78/BiP は非特異的に結合しているのではなく、確かに GRP78/BiP のシャペロン機能により相互作用していることが示された。

第 4 節 要約

ヒトリゾチーム変異体と、GRP78/BiP が相互作用するかどうか解析するために、GRP78/BiP と共免疫沈降してくるヒトリゾチームをウェスタンブロットで検出した。野生型は、GRP78/BiP と共免疫沈降しなかったが、ヒトリゾチーム変異体 (I56T・F57I・W64R・D67H) は、すべて GRP78/BiP と共免疫沈降してきた。また、I56T について、ATP 存在下・非存在下で共免疫沈降を行うと、共免疫沈降するヒトリゾチームの量が ATP 存在下で減少していた。以上から、ヒトリゾチーム変異体は、GRP78/BiP の働きで、確かに相互作用していた。次章では、ヒトリゾチームのどの領域と相互作用しているか解析を行うこととした。

第6章 ヒトリゾチームと GRP78/BiP との結合領域の探索

第1節 目的

前章にて、ヒトリゾチーム変異体と GRP78/BiP が相互作用していることが実証された。GRP78/BiP は、分子シャペロンであり、フォールディング途中のタンパク質と結合し、正しいフォールディングへと導く。しかし、ヒトリゾチーム変異体の場合、GRP78/BiP と相互作用したまま、正しくフォールディングされずに、小胞体内で蓄積し、小胞体ストレスを引き起こしていると推定した。そこで、新たな疑問として、ヒトリゾチームのどの領域と GRP78/BiP が相互作用しているのか興味を持たれた。本章では、この疑問に応えるべく、ヒトリゾチームの種々の領域の欠損体を作製し、GRP78/BiP と結合する領域を導き出そうとした。

第2節 試料調製および実験方法

1. 細胞および試薬

前章と同様の方法で行った。

2. ヒトリゾチーム欠損体発現ベクターの構築

ヒトリゾチーム欠損体発現ベクターの調製するために、まず、野生型ヒトリゾチーム cDNA を導入した pENTR™11 ベクターを鋳型に inverse PCR で欠損領域を導入した。その後、In-Fusion HD cloning system (TAKARA BIO) で、pEB-Multi-neo-vector (WAKO) ベクターにヒトリゾチーム欠損体 cDNA を導入し、発現ベクターとした。

3. トランスフェクション

前章と同様の方法で行った。

4. ウェスタンブロット

前章と同様の方法で行った。

5. 免疫蛍光染色

前章と同様の方法で行った。

6. RT-PCR

前章と同様の方法で行った。

7. 共免疫沈降

前章と同様の方法で行った。

第3節 結果および考察

ヒトリゾチームのどの領域で GRP78/BiP と相互作用するのか。この問いに応えるべく、ヒトリゾチームの N 末端、内部配列、C 末端を削除した、ヒトリゾチーム欠損体を発現させるベクターを構築した (Fig. 12A)。そして、前章で構築した FLAG-GRP78/BiP 発現ベクターを予めトランスフェクションし、24 時間後にさらに各ヒトリゾチーム欠損体発現ベクターをトランスフェクションした。48 時間インキュベートした後、細胞の各フラクション (可溶性画分・

不溶性画分・培地上清)、さらに可溶性画分を抗 FLAG 抗体で免疫沈降を行い、共沈降するヒトリゾチーム欠損体をウェスタンブロットで検出した (Fig. 12B)。細胞の可溶性画分において、野生型を含めほぼすべての変異体 (欠損体) で、非常に強いバンドが検出されたが、N 末端の欠損体 (1-41del、1-51del) だけが、バンド強度が弱かった。構築した 4 つの欠損体 (1-41 del、1-51 del、80-130 del、51-67 del) すべてにおいて、培地上清にてバンドは検出されなかった。また興味深いことに、欠損体の中で、N 末端欠損体 (1-41del、1-51del) だけが、抗 FLAG 抗体で共免疫沈降しなかった。これは、N 末端欠損体が、GRP78/BiP と相互作用していないことを意味している。逆に、C 末端欠損体および内部領域 (アミロイド線維形成コア領域を含む) 欠損体は、GRP78/BiP と相互作用することが示された。

さらに、この N 末端欠損体は、GRP78/BiP と相互作用していないにも関わらず、細胞内不溶性画分 (ペレット画分) には、多く存在した。これは、細胞内において、N 末端欠損体が自己凝集し不溶化しているのではないかと考えられる。

同じ検体を用いて、次に免疫蛍光染色を行い、細胞内での挙動を観察した (Fig. 12C)。51-67del および 80-130del の欠損体は、I56T と同じく、細胞内において GRP78/BiP の局在と非常によく一致していた。一方、N 末端欠損体 (1-41 del、1-51del) は、ほとんど GRP78/BiP と局在が一致していなかった。この結果は、免疫沈降の結果と同様、N 末端欠損体が GRP78/BiP と相互作用しないことを示している。

4 つのヒトリゾチーム変異体は、小胞体ストレスのマーカーである XBP-1 の

スプライシングを引き起こしていた。そこで、このヒトリゾチーム欠損体が *XBP-1* のスプライシングを引き起こしているか解析した (Fig. 12D)。N 末端欠損体は、野生型と同様に、*XBP-1* のスプライシング産物である *XBP-1s* のバンドが、ほとんど検出されなかった。一方で、内部配列欠損体 (51-67del) と C 末端欠損体 (80-130del) は、ヒトリゾチーム変異体と同様、*XBP-1s* のバンドが検出された。以上の結果は、免疫蛍光染色の結果を含め、ウェスタンブロットの結果と一致していた。つまり、GRP78/BiP と相互作用するためには、ヒトリゾチームの N 末端の配列が必須であると結論付けた。

GRP78/BiP と相互作用したヒトリゾチーム変異体は、プロテアソームで分解されず、小胞体内で蓄積した。一方で、N 末端欠損体は GRP78/BiP と相互作用せず、正常分泌もされなかった。そこで N 末端欠損体がプロテアソームで分解されているか興味を持たれた。次に、プロテアソーム阻害剤 MG-132 を用いて、N 末端欠損体がプロテアソームで分解されているかウェスタンブロットで解析を行った (Fig. 13)。Fig. 13 に示したように、N 末端欠損体 (1-41del、1-51del) は、MG-132 処理することで、ウェスタンブロットのバンド強度が上昇していた。つまり、N 末端欠損体は、プロテアソームで分解されていたことが示された。一方で、80-130del、51-67del は MG-132 処理後でタンパク質量の増加はわずかであった。これらの変異体は、GRP78/BiP と小胞体内で共局在しており、また共に不溶性画分に存在していた。N 末端欠損体は GRP78/BiP と相互作用しないが、不溶性画分に存在しており、これらは先に述べたように自己凝集しているからだと推察できる。

一連の結果から、ヒトリゾチームが GRP78/BiP と結合するためには、N 末

端の配列が必須であることが示された。GRP78/BiP は、リダントなヘプタペプチドモチーフ (Hy(W/K)HyXHyXHy) と相互作用すると報告されている[23]。Hy は、大きい疎水性アミノ酸もしくは、芳香族のアミノ酸を示しており、このモチーフに GRP78/BiP の基質結合ドメインは強い親和性を示す[24]。ヒトリゾチームの N 末端配列において、このモチーフに適合する領域を探索したところ、ヒトリゾチームの 28-34 配列 (WMCLAKW) が適合することを発見した。そこで、野生型とヒトリゾチーム変異体 I56T を元に、28-34del の欠損体を新たに作製した (28-34del、28-34del/I56T)。そして、FLAG-GRP78/BiP とコトランスフェクションし、相互作用するかどうか解析を行った (Fig. 14A)。ウェスタンブロットの結果から、細胞可溶性画分にて 28-34del、28-34del/I56T は発現量が少ないが、I56T が GRP78/BiP と共免疫沈降しているのに対し、これら 2 つの欠損体は全く共免疫沈降していなかった。これは、28-34del は GRP78/BiP と相互作用していないことを示している。また、免疫蛍光染色の結果 (Fig. 14B) も同様で、28-34del は GRP78/BiP と共局在を示さなかった。また、前述の 4 つの欠損体と同様に、培地上清にはほとんど、分泌されていなかった。さらに、小胞体ストレスのマーカである *XBP-1* のスプライシングも引き起こされていなかった (Fig. 14C)。つまり GRP78/BiP と相互作用せず、小胞体ストレスを引き起こしていなかった。

次に、28-34 del が GRP78/BiP と相互作用していなかったことから、プロテアソームにより分解が引き起こされているのではと予想した。そこで、前述と同様に、プロテアソーム阻害剤 MG-132 で細胞を処理し、タンパク質の増加がみられるかウェスタンブロットで解析した (Fig. 15)。MG-132 で処理した

場合 (MG-132+)、28-34del および 28-34del/I56T で未処理 (MG-132-) よりもバンド強度の上昇がみられた。これは、28-34del がプロテアソームで分解されていることを示している。

以上から、ヒトリゾチームの N 末端で GRP78/BiP と相互作用しており、28-34 の配列 (WMCLAKW) が、特に重要な配列であると結論付けた。

第 4 節 要約

前章でヒトリゾチーム変異体が、GRP78/BiP と相互作用することが示された。そこで本章では、ヒトリゾチームのどの領域と GRP78/BiP と結合するのか、ヒトリゾチームの欠損体を用いて GRP78/BiP との相互作用解析を行った。その結果、ヒトリゾチームの N 末端を欠損させると、GRP78/BiP と共免疫沈降しなかった。また N 末端欠損体は、GRP78/BiP との共局在もしていなかった。さらに、N 末端領域で GRP78/BiP の結合モチーフである 28-34 の配列 (WMCLAKW) が存在しており、この領域を欠損させると、GRP78/BiP と全く相互作用しなかった。

以上から、ヒトリゾチームが GRP78/BiP と相互作用するためには、N 末端配列 (28 WMCLAKW 34) が必須であり、この領域が存在しないと GRP78/BiP と相互作用することなく、プロテアソームで分解されると結論付けた。

第7章 ヒトリゾチーム N 末端の疎水性アミノ酸残基と GRP78/BiP との相互作用の関係

第1節 目的

ヒトリゾチームが GRP78/BiP と相互作用するためには、N 末端配列 (28 WMCLAKW³⁴) 必須であることを前章で突き止めた。この 28-34 の配列は、ヒトリゾチームの $\alpha 2$ -helix 領域に存在している (Fig. 16A)。 $\alpha 2$ -helix は $\alpha 1$ -helix と互いに平行に位置しており、ともに疎水性アミノ酸残基を適当な間隔をとり整列させながら、保持している (F3、L8、L12、L15、L25、L31)。I56 も $\alpha 2$ -helix に含まれている。そこで、この特徴的な構造 (二つの平行に並んだヘリックス間で、疎水性アミノ酸残基が適当な間隔で並んだ構造) を形成できないと、GRP78/BiP と相互作用したまま不溶化し小胞体ストレスを引き起こすのではないかと予想した。

本章では、前述の疎水性アミノ酸残基 F3、L8、L12、L15、L25、L31 をそれぞれアラニンに置換し、GRP78/BiP と相互作用するのか解析を行った。また、変異導入により小胞体ストレスが引き起こされているか解析も行った。

第2節 試料調製および実験方法

1. 細胞および試薬

前章と同様に HEK293 細胞を培養した。また、細胞へのトランスフェクションも同様の方法で行った。抗体も同様のものを使用した。

2. 変異体発現ベクターの構築

前章ですでに構築した、野生型および変異体 I56T の発現ベクターに inverse PCR で変異を導入し、変異が導入されたかどうかは、シーケンスで確認した。

3. トランスフェクション

前章と同様の方法で行った。

4. ウェスタンブロット

前章と同様の方法で行った。

5. RT-PCR

前章と同様の方法で行った。

6. 共免疫沈降

前章と同様の方法で行った。

第3節 結果および考察

ヒトリゾチームの α 1-helix および α 2-helix に含まれる疎水性アミノ酸残基 F3、L8、L12、L15、L25、L31 をそれぞれアラニンに置換させ、HEK293 細胞に発現させた。今回は、野生型および変異体 I56T に上記の変異を導入し、FLAG-GRP78/BiP と共発現させ、GRP78/BiP と相互作用するか共免疫沈降およびウェスタンブロットで解析した (Fig. 16B)。野生型に変異を導入したサン

プルは、FLAG-GRP78/BiP とともに共沈降し、クリアなバンドが検出された。これは、変異導入により、GRP78/BiP と相互作用しやすくなったことを示している。しかしながら L15A は、全く共沈降しておらず、野生型と同様の挙動を示した。これは 15 番目のロイシンはアラニン程度の疎水性でも十分である、もしくは、L15 は比較的タンパク質表面に存在しており、構造形成に深く関与していないのではと思われる。I56T にこれらの変異を導入した場合、依然として I56T と同様の傾向を示したが、培地上清への分泌はさらに減少する傾向があった。

次に、F3、L8 等の変異によって小胞体ストレスを引き起こし UPR が誘導されているかどうか、XBP-1 のスプライシングを指標に解析を行った (Fig. 16C)。ウェスタンブロットの結果と同様に、GRP78/BiP と共沈降した変異体は、XBP-1s のバンドが野生型よりも上昇しており、UPR が誘導されていた。

以上の結果から、ヒトリゾチームの N 末端の二つ α -helix に並ぶ疎水性アミノ酸残基に変異を導入すると、アミロイドーシスを引き起こすリゾチーム変異体と同様の挙動を示すことが分かった。そして、前章の 28-34 が GRP78/BiP と相互作用する領域であることを考慮すると、この二つの α -helix の位置が GRP78/BiP と相互作用するための入り口なのかもしれない。

第4節 要約

ヒトリゾチームが GRP78/BiP と相互作用するためには、N 末端配列 (28^{WMCLAKW}³⁴) 必須であることを前章で突き止めた。この 28-34 の配列は、ヒトリゾチームの α 2-helix 領域に存在している。そこで、この α 2-helix とと

もに特徴的な構造を形成している α 1-helix それぞれに含まれる疎水性アミノ酸残基 (F3、L8、L12、L15、L25、L31) をアラニンに置換し、GRP78/BiP との相互作用を解析した。野生型に上記の変異を導入すると、アミロイドーシスを引き起こすヒトリゾチーム変異体 (I56T, F57I, etc...) と同様、GRP78/BiP と相互作用し、小胞体ストレスを引き起こしていた。また、培地上清への分泌も減少傾向を示した。前章の 28-34 が GRP78/BiP と相互作用する領域であることを考慮すると、この二つの α -helix の位置が正しく形成されると、GRP78/BiP が解離するが、変異により形成できないと GRP78/BiP は結合したまま、小胞体ストレスを引き起こす原因になると思われる。

第8章 56番目イソロイシン変異体と GRP78/BiP との相互作用特性

第1節 目的

これまで、ヒトリゾチーム変異体 (I56T、F57I、W64R、D67H) が小胞体内に蓄積することで小胞体ストレスを引き起こし、細胞は UPR を誘導することを示した。I56T 変異体の場合、56番目のイソロイシンがトレオニンに変異することで、GRP78/BiP と相互作用し、細胞は UPR を誘導するが、トレオニン以外のアミノ酸に置換した場合、小胞体ストレスを引き起こすかどうか興味を持たれた。

そこで本章では、アミロイドーシスを引き起こす変異体の中で特に I56T に絞って、この 56番目のイソロイシンがトレオニン以外のアミノ酸に置換した場合、小胞体ストレスを引き起こすかどうか、変異体の熱安定性に着目しながら解析を行った。

第2節 試料調製および実験方法

1. 細胞および試薬

前章と同様に HEK293 細胞を培養した。また、細胞へのトランスフェクションも同様の方法で行った。抗体も同様のものを使用した。

2. 変異体発現ベクターの構築

前章ですでに構築した、野生型ヒトリゾチームの発現ベクターに inverse PCR で変異を導入した。変異が導入されたかどうかは、シーケンスで確認

した。

3. トランスフェクション

前章と同様の方法で行った。

4. ウェスタンブロット

前章と同様の方法で行った。

5. 共免疫沈降

前章と同様の方法で行った。

6. Molecular Operating Environment (MOE) program を用いた熱安定性の評価解析

熱安定性の解析には、Molecular Operating Environment (MOE) program (Chemical Computing Group, Montreal, QB, Canada) の網羅的変異体スキャンを用いて、ヒトリゾチームの PDB データ (1LZ1) を鋳型に、56番目のイソロイシンをその他のアミノ酸に置換した I56 変異体の構造を予想した。そして、野生型から各変異体への熱安定性の差を出力した。力場には AMBER10EHT を用いた。

第3節 結果および考察

56番目のイソロイシンはヒトリゾチーム変異体 I56T の変異箇所であると

同時にアミロイド線維を形成するコア領域にも含まれている。この野生型ではイソロイシンであるアミノ酸を別のアミノ酸 (A、E、R、S、Y、G、L、F、W、V、M) に置換し、FLAG-GRP78/BiP と共発現させ、変異によって GRP78/BiP と相互作用するのか共免疫沈降を用いて解析した(Fig. 17A)。

FLAG-GRP78/BiP との共免疫沈降の結果から、今回導入した変異の中で I56L、I56V、I56M の 3 つの変異体のみ、ほとんどもしくは全くバンドが確認されていなかった (Fig. 17A サードパネル)。またこれらの変異体は、培地上清画分にも多く存在していた (Fig. 17A トップパネル)。つまり、56 番目をロイシン・バリン・メチオニンに置換しても、野生型の場合と同様、GRP78/BiP と相互作用せずに、培地上清に正常に分泌されることが分かった。

一方、その他の 8 つのアミノ酸 (A、E、R、S、Y、G、F、W) に置換した場合、I56T タイプに変化し、GRP78/BiP と相互作用し共沈降していた。また、変異体の中で、I56A と I56F は I56T と同程度、培地上清画分に検出されたが、その他 6 つの変異体 (I56E、I56R、I56S、I56Y、I56G、I56W) は、ほとんど検出されなかった。この 6 つの変異体は、I56A と I56F に比べ共沈降したリゾチームの量が多い傾向があったため、GRP78/BiP と相互作用しやすいと分泌量が下がると考えられる。これらの変異体の結果は、Table.3 にまとめた。

また、細胞内での局在についても、免疫蛍光染色を用いて観察した (Fig. 17B)。ウェスタンブロットの結果と同様 I56L は、野生型と同じ挙動を示し、GRP78/BiP と強い共局在性も示さなかった。一方で、I56A・I56S・I56G・I56W は、I56T と同じように細胞内で凝集し GRP78/BiP と共局在していた。

以上の結果は、リゾチームの 56 番目のアミノ酸残基が GRP78/BiP とリゾチ

ームの相互作用に影響を与えることを示したが、これはリゾチームの変異体間でのフォールディング状態の違い、熱安定性の違いにより引き起こされると考えられる。そこで、後者の変異体間での熱安定性の違いを解析するため、分子モデリングとシミュレーションを実施した。解析手法として、**Molecular Operating Environment (MOE) program** を用いて、野生型に対しての変異体の熱安定性の差を計算した。計算結果は、変異体の他の特性（培地上清への分泌、不溶性画分での存在等）と同様に大まかに **Table.3** にまとめた。細胞内で **GRP78/BiP** と相互作用したリゾチーム変異体は、熱安定性が野生型に比べ低くなる傾向があった (**I56R**、**I56E**、**I56T**、**I56S**、**I56A**、**I56W**、**I56G**)。逆に、**GRP78/BiP** と相互作用しなかった変異体は、野生型と同等もしくは、熱安定性の低下も小さかった (**I56L**、**I56V**、**I56M**)。一方で、例外的に **I56F** と **I56Y** は、熱安定性が他の変異体と比較して高い傾向があったが、**GRP78/BiP** と相互作用した。不溶性画分（ペレット画分）の存在に関しても **GRP78/BiP** の相互作用と同じ傾向を示した。ヒトリゾチームの分泌に関しては、熱安定性が低いものほど分泌量が低下する傾向があった。例外として **I56T** と **I56A** は、熱安定性は低いが発酵されておき、逆に **I56Y** は熱安定性が低下していないが、全く分泌されていなかった。野生型とほぼ同様の特性を示した **I56L**、**I56V**、**I56M** がシンプルな構造であるのに対し、**I56Y** は疎水性アミノ酸であるが構造が大きいため、フォールディングの際に障害になるのかもしれない。

これまでの結果から、**56** 番目のアミノ酸に関して、疎水性アミノ酸の場合、構造的に安定であるため、翻訳後正しいフォールディングをすぐに形成して **GRP78/BiP** から解離し、正常に分泌されると考えられる。対照的に、親水性の

アミノ酸の場合、構造的に不安定になり、GRP78/BiP と相互作用したまま、うまくフォールディングできずに不溶化し、小胞体ストレスを引き起こすのではないかと結論付けた。

第4節 要約

アミロイドーシスを引き起こすヒトリゾチーム変異体には **I56T** が存在する。この変異体は前章から **GRP78/BiP** と相互作用し小胞体ストレスを引き起こすことが分かった。本章では、**I56T** をモデルとして、56番目のイソロイシンを別のアミノ酸に置換した場合、トレオニン以外でどのようなアミノ酸が小胞体ストレスを引き起こすか解析を行った。

実験結果から、イソロイシンをロイシン、バリン、メチオニンに置換しても野生型と同様の挙動を示したが、親水性のアミノ酸に置換した場合、**I56T** タイプの挙動を示した。これら親水性のアミノ酸は *in silico* 解析から熱安定性が低下する傾向がみられた。以上から、タンパク質構造の安定性が変異により崩れることで、**GRP78/BiP** との相互作用したまま凝集し、小胞体ストレスを誘導すると結論付けた。

第9章 総括

第1節 総括

ヒトリゾチームおよびその変異体のフォールディング過程について、これまで詳細に研究されている[15,25-28]。本研究に用いたアミロイドーシスを引き起こすヒトリゾチーム変異体 (I56T、F57I、W64R、D67H) の変異箇所 (Fig. 1) は、アミロイド線維形成コア領域 (⁵⁴GILQINSRW⁶²) 周辺に集中している[16,29-30]。変異により構造的に不安になるため、タンパク質表面にコア領域が露出してアミロイド線維形成が引き起こされていると考えられているが、詳細は分かっていない。事実、野生型と I56T は構造的にわずかな違いしかないが、D67H は大きく変わっている[31]。これは、得られた構造データが正しくフォールディングしたものであり、実際にアミロイド線維を形成するのはミスフォールディングしたもの、つまりフォールディング過程のものが線維形成するのかもしれない。タンパク質のフォールディングは通常、細胞内で行われる。そこで、ヒトリゾチーム変異体が細胞内で作られる過程 (フォールディング過程) で、アミロイド線維を形成するのではないかという発想の元、本研究をスタートした。

まず、アミロイドーシスを引き起こす変異体 (I56T、F57I、W64R、D67H) を HEK293 細胞に発現させ、細胞毒性について解析を行った。変異体は正しく発現はしたものの、細胞毒性を示さなかった。また、アポトーシス誘導も引き起こされなかった。これは、これまで報告されているリゾチームアミロイド線維の示す毒性 (培養培地にアミロイド線維を添加する方法) の結果とは、異なっていた[12, 32]。本研究ではトランスフェクション後のインキュベートを 72

時間に設定したが、これは72時間で発現が最も多かったためである。そのため、長期的に発現させることで毒性を示すと考えられるが、本研究において長期的に発現させ細胞毒性を解析する方法は見出せなかった（安定発現株を作製したが、セレクションがかかっているため、細胞毒性を調べるには困難と判断した）。

以前、マウス L 細胞においてヒトリゾチーム変異体（システインをアラニンに置換して正常なジスルフィド結合が形成されない変異体）が蓄積し、pre golgi compartment にてシステインプロテアーゼで分解されるという報告があった[33]。また最近の報告では、ピキア酵母において、ヒトリゾチーム変異体が細胞内にとどまり分解されるため、分泌されないという報告もあった[34]。同様に、本研究でも HEK293 細胞において、野生型ヒトリゾチームは正常に分泌されるのに対し、4つのヒトリゾチーム変異体は細胞内で蓄積・凝集することを示した。しかし、マウス L 細胞やピキア酵母のように速やかに分解されてはいなかった。さらに、T70N のような自然に存在するヒトリゾチームの変異体[35]は、野生型のように正常に分泌され、細胞内の不溶性画分にもほとんど存在していなかった (Fig. 18)。この T70N は野生型よりも構造が不安定だが、アミロイドーシスを引き起こされないので、野生型と同様の傾向を示したのかもしれない。

細胞は、異常なタンパク質を分解することなく、細胞内に封入体として溜め込むことがある。これは、凝集タンパク質による毒性から守るためだと考えられる。ミスフォールディングやタンパク質分解系の異常によりユビキチン化したタンパク質が、微小管上を移動するダイニンモーターにより中心体付近に集められ、ビメンチンに包まれた封入体（アグリソーム）を形成することが知られている[36-38]。本研究でみられたヒトリゾチーム変異体の凝集体は、アグリ

ソームを検出する Proteostat®では陽性であった。しかしながら、中心体に存在しておらず、ビメンチンにも含まれていなかった。また、ウェスタンブロットの結果からヒトリゾチーム変異体はユビキチン化されていないことも明白であった（ユビキチン化されたら分子量が大きくなるため）。以上を踏まえ、この凝集体は厳密な定義において、アグリソームではないと結論付けた。

一般的に異常なタンパク質が小胞体内に蓄積すると、小胞体ストレスを引き起こすことが知られている。本研究において、ヒトリゾチーム変異体は小胞体内で蓄積しており、それがきっかけで小胞体ストレスが引き起こされていた。小胞体ストレスに対処するために細胞は、**unfolded protein response (UPR)** を誘導し、タンパク質フォールディングのホメオスタシスを維持しようとする [39-42]。

UPR において、小胞体膜貫通型タンパク質である **IRE1・PERK・ATF6** がトランスデューサとしての役割を担っており、小胞体内で異常が出たことを小胞体外へ知らせている [22,40,43-45]。ヒトリゾチームを過剰発現させた場合、当然正しいフォールディングのために、分子シャペロンタンパク質の助けが必要になる。**GRP78/BiP** は UPR において重要な役割をもつ小胞体シャペロンタンパク質であり、小胞体ストレスのセンサータンパク質でもある。小胞体ストレスが誘導される前は、**GRP78/BiP** は **IRE1・PERK・ATF6** のトランスデューサタンパク質と結合している。しかし異常タンパク質が小胞体内で蓄積すると **GRP78/BiP** はトランスデューサタンパク質から解離し、異常タンパク質のフォールディングに消費される。**GRP78/BiP** が離れたトランスデューサタンパク質は活性し、UPR を誘導する [42,46-48]。IRE1 は活性化するとダイマー化

し、RNase 活性をもつようになり、細胞質で *XBP-1u* をスプライシングする。スプライシングされた *XBP-1 (XBP-1s)* は、翻訳されると転写因子として、シスエレメントである ER stress response element (ERSE) に結合し、小胞体シャペロンタンパク質等の発現誘導を行なう [49]。これら、IRE 経路の活性化が、本研究においても、ヒトリゾチーム変異体の発現により誘導されていた。また、GRP78/BiP の発現誘導と平行して、関連するシャペロンタンパク質の発現も誘導されていた (Fig. 9)。その他、小胞体ストレスによる細胞死を引き起こす *CHOP* 遺伝子のわずかな発現上昇がみられたが、細胞死を抑制する *Armet* の発現も上昇しており、ヒトリゾチーム変異体による小胞体ストレスによる毒性の詳細は、まだまだ不明な点が多い。同様に小胞体関連遺タンパク質分解 ERAD 関連遺伝子の発現上昇もみられず、なぜヒトリゾチーム変異体を分解しようとならないのかは不明であった。ただし、IRE1 経路の活性化だけは、本研究において明白に示された。

さらに言えば、*XBP-1* のスプライシングがヒトリゾチーム変異体でみられたが、RNAi でヒトリゾチームの発現を抑制することで、スプライシングが抑制された (Fig. 10)。また当然、ペレット画分に含まれるヒトリゾチーム変異体および GRP78/BiP の量も減少していた。GRP78/BiP は小胞体シャペロンタンパク質として、異常タンパク質と結合し正しいフォールディングへと導くが、本研究において、ヒトリゾチーム変異体が GRP78/BiP によって正しいフォールディングへ導かれるかまでは検証できなかった。

ヒトリゾチーム変異体において、小胞体ストレスを引き起こすことが明らかとなり、次に小胞体ストレスのセンサータンパク質として働く GRP78/BiP と

変異体が相互作用するのか興味を持たれた。そこで、免疫沈降法を用いて GRP78/BiP と一緒にヒトリゾチームが沈降してくるか解析を行った。その結果 アミロイドーシスを引き起こす変異体が GRP78/BiP と強く相互作用していることが明らかとなった。また、欠損変異体による解析から N 末端の配列が GRP78/BiP と相互作用していることも分かった。さらに言えば、ヒトリゾチームの N 末端の中でも、28-34 の配列 (28 WMCLAKW 34) に結合していることも示され、その配列がないとプロテアソームによって分解されることも分かった。

つまり、上記の結果から、以下の仮説が考えられる。

「野生型、変異体に関わらず、小胞体内にヒトリゾチームのポリペプチド鎖が翻訳されながら導入されると、GRP78/BiP は一度結合する。そして野生型の場合、正しいフォールディングをとったら解離する。しかし、変異体はいつまでたっても正しいフォールディングを形成できないため、結合したまま凝集してしまい、小胞体内で GRP78/BiP が枯渇して小胞体ストレスを引き起こしてしまう。それに対し 28-34 欠損体のように、もともと GRP78/BiP と相互作用する領域を持っていないポリペプチド鎖が小胞体内に導入されると、フォールディングする前に、速やかに分解されてしまう。」

本研究での免疫沈降による相互作用の結合だけでは、ヒトリゾチーム変異体のフォールディング過程のどのタイミングで GRP78/BiP と結合しているか分からないため、さらなる解析が必要である。

ヒトリゾチームの 28-34 番目の残基は、 α 2-helix に存在する。そしてもう一つの helix である α 1-helix とともに、疎水性および芳香族アミノ酸残基を規則的に配列させている (Fig. 16A)。これらのアミノ酸残基をそれぞれアラニンに

置換にすると、野生型からアミロイドーシスを引き起こすヒトリゾチーム変異体と同じ挙動を示すようになった（分泌の低下、ペレット画分の上昇、GRP78/BiP との相互作用）。おそらく、この $\alpha 1$ -helix と $\alpha 2$ -helix のポジションは、GRP78/BiP と相互作用するための“エントランス”のような働きをしており、結果として、ヒトリゾチームが正しくフォールディングできたかどうかモニタリングしていると考えられる。I56T の変異のように疎水性から親水性アミノ酸に置換されると、この“エントランス”が形成されず、GRP78/BiP が解離できないのかもしれない。

他の研究者による培養細胞とトランスジェニックマウスを用いた研究で、筋萎縮性側索硬化症を引き起こすスーパーオキシドジスムターゼ 1 (SOD1) の変異体が小胞体内で蓄積して、GRP78/BiP と結合し、小胞体ストレスを引き起こすことが報告されている[50-52]。興味深いことに、この SOD1 は本来細胞質の酵素でありながら、変異体は小胞体に蓄積し、小胞体ストレスを誘導する。さらに、アミロイドーシスを引き起こすヒトトランスサイレチンが、GRP78/BiP と安定的に結合し、ATP を添加することで解離することが *Escherichia.coli* の系[53]と哺乳類細胞の系[54]で報告されている。もしも小胞体シャペロンにより、変異体の分解が抑制されているのならば、小胞体シャペロン が凝集性のあるタンパク質を分解から保護しているとも言えるだろう。

トランスサイレチンの GRP78/BiP との結合領域は 88-130 残基であることが報告されており、そこは β -strand F に相当する。そして、この領域はアミロイド線維伸長領域と考えられている[53,55]。これら二つの酵素 (SOD1 とトランスサイレチン) と、本研究で用いたヒトリゾチームの状況と非常によく似てい

る。小胞体シャペロンの異常タンパク質に対しての強いアフィニティーにより、異常タンパク質の分泌を抑制させ、生体内で異常タンパク質が循環するのを防いでいるのかもしれない。そしてこのことが、全身性アミロイドーシスが発症するまでに、長い期間がかかる理由の一つなのかもしれない。

次にヒトリゾチームの α -ドメインのコア領域に存在する、56番目のイソロイシンについて、様々なアミノ酸に置換した変異体を作製した。この56番目のイソロイシンを疎水性アミノ酸に置換した場合、ほとんどのアミノ酸は野生型と同じで、GRP78/BiPと相互作用せず、非常によく分泌し、ペレット画分にも存在していなかった (Table.3)。一方で、親水性のアミノ酸に置換した場合、I56T変異体のような特性 (GRP78/BiPと相互作用し、分泌も悪く、多くがペレット画分に存在) に変化した。つまり、ヒトリゾチームの α -helixドメインにおいて、疎水性が低下すると、正しいフォールディングできずに、GRP78/BiPと相互作用したまま蓄積するのかもしれない。

これら I56T タイプのヒトリゾチーム変異体は、熱安定性が低いと考えられる。事実、このことはコンピュータを用いて算出した野生型に対しての各変異体の熱安定性の差の結果からも言えるだろう (Table.3)。野生型 (I56) が最も高い熱安定性を示したが、これは野生型が正しいフォールディング過程を経てフォールディングしているからだと考えられる。正しいフォールディング過程を経るために、アミロイド線維形成コア領域を含む β ドメインが正しく構築される必要がある。GRP78/BiPがこのヒトリゾチームフォールディング過程に関してどのようにまたどの程度関与するのかは、今後の課題である。

本研究において得られた新たな知見として、ヒトリゾチーム変異体が

GRP78/BiP と相互作用するためには N 末端領域が必要であるということ。そして、 $\alpha 1$ および $\alpha 2$ -helix ドメインに存在する疎水性アミノ酸の規則的な配列が GRP78/BiP との相互作用に重要であることも示した。興味深いことに、予想した GPR78/BiP の結合ペプチド $^{28}\text{WMCLAKW}^{34}$ は、 α -2helix に存在していた。しかしながら、明確な結論を導くためには、GRP78/BiP との複合体を形成するヒトリゾチーム由来の結合ペプチドを同定する必要がある。

1993年に初めて I56T、D67H の存在が報告されて以来、多くのアミロイドーシスを引き起こす変異体に関する研究がなされてきた[5]。これらの変異体は、シングルポイントミューテーションであり、常染色体優性遺伝である[56]。野生型ヒトリゾチームでさえ、本来アミロイド線維形成能を持っているが、生体内で野生型ヒトリゾチームが不完全なフォールディング状態で存在することは稀である[57]。それはおそらく、タンパク質品質管理 (PQC) システムによって、異常な構造のタンパク質が排除されるからである。しかしヒトリゾチーム変異体の場合は、このような排除機構が存在しても、アミロイド線維を形成してしまう[27]。

現在、アミロイドーシスを治療する特別な治療法はない。それゆえ、ヒトリゾチーム変異体の構造についてさらなる詳細な研究が必要である。2014年に、新たなヒトリゾチーム変異体 (W82G) が報告されている[58]。本研究によって得られた成果が将来、リゾチームアミロイドーシスの解明に役立つことを願う。

第2節 要約

異常タンパク質の蓄積により引き起こされる疾患は多い。アミロイドーシスは、異常タンパク質がアミロイド線維と呼ばれる線維状の凝集体を形成し、それが種々の臓器に蓄積して引き起こされる疾患である。アルツハイマー病や、パーキンソン病、プリオン病などはアミロイド線維の蓄積が疾患の原因の一つと考えられている。ヒトリゾチームは、生体内に広く存在する分泌性の抗菌タンパク質であるが、遺伝的な変異により全身性アミロイドーシスを引き起こす。アミロイドーシスを引き起こす変異体には、**I56T・F57I・W64R・D67H** が知られており、これら変異体がリゾチームアミロイド線維を形成し、アミロイドーシスを引き起こすと考えられている。ヒトリゾチーム変異体は、変異による構造的不安定化により、アミロイド線維を形成すると考えられているが、このような異常タンパク質が、細胞内で正常にフォールディングし、分泌されることは考えにくい。細胞内で正しくフォールディングできず凝集して、細胞に何らかの影響を与えるのではないか。そこで、ヒトリゾチーム変異体の発現が細胞にどのような影響をあたえるのか解析することを本研究の目的とした。

まず、4つのヒトリゾチーム変異体 (**I56T・F57I・W64R・D67H**) を野生型とともにヒト胎児腎臓細胞 (**HEK293**) に発現させ、毒性および発現解析を行った。生死判定の結果から変異体の発現により、直ちに細胞死を引き起こすことはなかった。しかし、野生型が正常に分泌されているのに対し、変異体は分泌量が少なく、細胞内の不溶性画分に多く存在していた。また、免疫蛍光染色による観察から、ヒトリゾチーム変異体は小胞体で凝集・蓄積していた。さらに、ヒトリゾチーム変異体の過剰発現により、小胞体ストレスによる **unfolded**

protein response (UPR) が誘導されていた。UPR の活性化経路のなかで特に、IRE1 経路の下流の XBP-1s と GRP78/BiP の発現増加が引き起こされていた。また免疫蛍光染色の結果から変異体は、GRP78/BiP とともに小胞体内で蓄積していた。

次に、UPR の誘導に関わる小胞体シャペロンタンパク質の GRP78/BiP とヒトリゾチームのどの領域が相互作用するのか解析した。上記のヒトリゾチーム変異体に加え、アミノ酸欠損およびアミノ酸置換の変異体を作製した。そして、FLAG タグ付の GRP78/BIP と HEK293 に共発現させ、免疫沈降法を用いた相互作用解析を行った。I56T などの 4 つの変異体は GRP78/BiP と強い相互作用を示したのに対し、N 末端欠損体(1-41 欠損、1-51 欠損)は、相互作用しなかった。また、N 末端の α -ヘリックスに存在する一連のロイシンをそれぞれアラニンに置換すると、I56T などの変異が存在しなくても、GRP78/BiP と相互作用した。また、それらの変異体は分泌量も少なかった。

結論として、ヒトリゾチームの N 末端は GRP78/BiP と相互作用するために非常に重要な箇所であった。そして、ヒトリゾチームはここで GRP78/BiP と相互作用し正しくフォールディングするが、変異体の場合、正しくフォールディングできずに GRP78/BiP と結合したまま小胞体内で凝集する。その結果、小胞体ストレスを引き起こすと結論付けた。

第 3 節 Summary

Accumulations of abnormal proteins that are misfolded and fibrotic have been observed in case of pathological amyloidosis such as Alzheimer's disease, Parkinson's diseases. None of the proteins involved in these diseases have common amino acid and sequences or tertiary structures, but each of them can form amyloid fibrils consisting of a cross- β -sheet structure and can be deposited in various tissue. Lysozyme is an omnipresent enzyme attacking the peptidoglycan cell wall of certain microorganisms. There are four pathogenic mutants of human lysozyme that cause non-neuropathic systematic amyloidosis. Naturally occurring single mutants, I56T, F57I, W64R and D67H, have been known to form abnormal protein aggregates (amyloid fibrils) and to accumulate in several organs, including the liver, spleen and kidney, resulting amyloidosis. However, the pathogenesis of the disease is not well understood. The mutants may aggregate in the cell, and exhibit cytotoxicity.

In this study, I examined the effects of the above-described four pathogenic lysozyme mutant (I56T, F57I, W64R, D67H) in cultured human embryonic kidney (HEK) 293 cells.

Western blot analyses showed the lesser amounts of these mutants proteins in the medium compared to the wild type, but they were abundant in the cell pellets, indicating that the modified lysozyme protein scarcely secreted into the medium but were retained in the cells. Immunocytochemistry revealed

that these mutant proteins resided in the restricted regions that were stained by an endoplasmic reticulum (ER) marker. Moreover, the overexpression of the mutant lysozymes were accompanied by marked increases in XBP-1s and GRP78/BiP, which are downstream agents of the IRE1 signaling pathway responding to the unfolded protein response (UPR) upon ER stress. Also, the mutant lysozymes accumulate in the ER with the ER chaperone GRP78/BiP.

Next, I investigated the region of lysozyme that is critical to its association with GRP78/BiP. In addition to above-described mutants, I constructed lysozyme truncation or substitution mutants. These were co-expressed with GRP78/BiP (tagged with FLAG) in HEK293 cells, and I analyzed the interaction by immunoprecipitation. The mutants were confirmed to be strongly associated with GRP78/BiP, whereas N-terminal pruned mutants (1-41del, 1-51del) were found not to be associated with the chaperone. Single amino acid substitutions for the leucine array along the α -helices in the N-terminal region resulted in wild-type lysozyme remaining attached to GRP78/BiP. These mutations also tended to show lowered secretion ability.

I conclude that the N-terminal α -helices region of the lysozyme is pivotal for its strong adhesion to GPR78/BiP. I suspect that lysozyme interacts with the GRP78/BiP at this region as a step in the proper folding. However, in mutants lysozyme, because they are not able to make proper structure, mutants remain interact to GRP78/BiP strongly and induced ER stress.

参考文献

- [1] R. Veerhuis, R.S. Boshuizen, A. Familian, Amyloid associated proteins in Alzheimer's and prion disease. *Curr. Drug Targets CNS Neurol. Disord.* 4 (2005) 235–248.
- [2] D. Aarsland, R. Perry, A. Brown, J.P. Larsen, C. Ballard, Neuropathology of dementia in Parkinson's disease: a prospective, community-based study. *Ann. Neurol.* 58 (2005) 773–776.
- [3] C. Chakraborty, S. Nandi, S. Jana, Prion disease: a deadly disease for protein misfolding. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 6 (2005) 167–177.
- [4] J. Montane, A. Klimek-Abercrombie, K.J. Potter, C. Westwell-Roper, B. Verchere, Metabolic stress, IAPP and islet amyloid. *Diabetes Obes. Metab.* 3 (2012) 68–77.
- [5] M.B. Pepys, P.N. Hawkins, D.R. Booth, D.M. Vigushin, G.A. Tennent, A.K. Soutar, N. Totty, O. Nguyen, C.C.F. Blake, C.J. Terry, G. Feest, A.M. Zalin, J.J. Hsuan, Human lysozyme gene mutations cause hereditary systemic amyloidosis. *Nature* 362 (1993) 553–557.
- [6] G.G. Glenner, Amyloid deposits and amyloidosis. The β -fibrilloses. *N. Engl. J. Med.* 302 (1980) 1333–1343.
- [7] L.W. Jin, K.A. Claborn, M. Kurimoto, M.A. Geday, I. Maezawa, F. Sohraby, M. Estrada, W. Kaminsky, B. Kahr, Imaging linear birefringence and dichroism in cerebral amyloid pathologies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100 (2003) 15294–15298.
- [8] C.M. Dobson, Protein folding and misfolding. *Nature* 426 (2003) 884–890.

- [9] F. Chiti, C.M. Dobson, Amyloid formation by globular proteins under native conditions. *Nat. Chem. Biol.* 5 (2009) 15–22.
- [10] P. Westermark, M.D. Benson, J.N. Buxbaum, A.S. Cohen, B. Frangione, S. Ikeda, C.L. Masters, G. Merlini, M.J. Saraiva, J.D. Sipe, Amyloid: Toward terminology clarification. Report from the Nomenclature Committee of the International Society of Amyloidosis. *Amyloid* 12 (2005) 1–4.
- [11] Y. Aso, K. Shiraki, M. Takagi, Systematic analysis of aggregates from 38 kinds of non disease-related proteins: identifying the intrinsic propensity of polypeptides to form amyloid fibrils. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71 (2007) 1313–1321.
- [12] C.G. Glabe, Structural classification of toxic amyloid oligomers. *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 29639–29643.
- [13] L. Callewaert C.W. Michiels, Lysozymes in the animal kingdom. *J. Biosci.* 35 (2010) 127–160.
- [14] G. Lesniewski, J. Kjosowski, Lysozyme. In: Huopalahti, R., Lopez-Fandino, R., Anton, M. and Schade, R., eds. *Bioactive Egg Compounds*. Berlin Heidelberg, Springer-Verlag. (2007) 34–42.
- [15] G. Merlini, V. Bellotti, Lysozyme: a paradigmatic molecule for the investigation of protein structure, function and misfolding. *Clin. Chim. Acta.* 357 (2005) 168–172.
- [16] J.R. Kumita, R.J. Johnson, M.J. Alcocer, M. Dumoulin, F. Holmqvist, M.G. McCammon, C.V. Robinson, D.B. Archer, C.M. Dobson, Impact of the native-state stability of human lysozyme variants on protein secretion by *Pichia pastoris*. *FEBS J.* 273 (2006) 711–720.

- [17] Y. Tokunaga, Y. Sakakibara, Y. Kamada, K. Watanabe, Y. Sugimoto, Analysis of core region from egg white lysozyme forming amyloid fibrils. *Int. J. Biol. Sci.* 9 (2013) 219–227.
- [18] JA. Johnston, CL. Ward, RR. Kopito, Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins. *J Cell Biol.* 143 (1998) 1883-1898.
- [19] D. Ron, P. Walter, Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8 (2007) 519-529.
- [20] A. Bertolotti, Y. Zhang, LM. Hendershot, HP. Harding, D. Ron, Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol.* 2 (2000) 326-332.
- [21] J. Shen, X. Chen, L. Hendershot, R. Prywes, ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals. *Dev Cell*, 3 (2002) 99-111.
- [22] A. Uemura, M. Oku, K. Mori, H. Yoshida, Unconventional splicing of XBP1 mRNA occurs in the cytoplasm during the mammalian unfolded protein response. *J. Cell Sci.* 122 (2009) 2877–2886.
- [23] S. Blond-Elguindi, S.E. Cwirla, W.J. Dower, R.J. Lipshutz, S.R. Sprang, J.F. Sambrook, M.J. Gething, Affinity panning of a library of peptides displayed on bacteriophages reveals the binding specificity of BiP, *Cell* 75 (1993) 717-728.
- [24] G. Knarr, S. Modrow, A. Todd, M.J. Gething, J. Bunchner, BiP-binding sequences in HIV gp160, Implications for the binding specificity of bip, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 29850-29857.

- [25] J.R. Kumita, L. Helmfors, J. Williams, L.M. Luheshi, L. Menzer, M. Dumoulin, D.A. Lomas, D.C. Crowther, C.M. Dobson, A.C. Brorsson, Disease-related amyloidogenic variants of human lysozyme trigger the unfolded protein response and disturb eye development in *Drosophila melanogaster*. *FASEB J.* 26 (2012) 192–202.
- [26] K. Takano, J. Funahashi, K. Yutani, The stability and folding process of amyloidogenic mutant human lysozymes. *Eur. J. Biochem.* 268 (2001) 155-159.
- [27] D. Canet, M. Sunde, A.M. Last, A. Miranker, A. Spencer, C.V. Robinson, C.M. Dobson, Mechanistic studies of the folding of human lysozyme and the origin of amyloidogenic behavior in its disease-related variants. *Biochemistry.* 38 (1999) 6419–6427.
- [28] M. Dumoulin, J.R. Kumita, C.M. Dobson, Normal and aberrant biological self-assembly: Insights from studies of human lysozyme and its amyloidogenic variants. *Acc. Chem. Res.* 39 (2006) 603–610.
- [29] R. Swaminathan, V.K. Ravi, S. Kumar, M.V. Kumar, N. Chandra, Lysozyme: a model protein for amyloid research. *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.*, 84 (2011) 63–111.
- [30] Y. Sugimoto, Y. Kamada, Y. Tokunaga, H. Shinohara, M. Matsumoto, T. Kusakabe, T. Ohkuri, T. Ueda, Aggregates with lysozyme and ovalbumin show features of amyloid-like fibrils. *Biochem. Cell Biol.* 89 (2011) 533–544.

- [31] A.K. Chamberlain, V. Receveur, A. Spencer, C. Redfield, C.M. Dobson, Characterization of the structure and dynamics of amyloidogenic variants of human lysozyme by NMR spectroscopy, *Protein Sci.* 10 (2001) 2525-2530.
- [32] A.L. Gharibyan, V. Zamotin, K. Yanamandra, O.S. Moskaleva, B.A. Margulis, I.A. Kostanyan, L.A. Morozova-Roche, Lysozyme amyloid oligomers and fibrils induce cellular death via different apoptotic/necrotic pathways. *J. Mol. Biol.* 365 (2007) 1337–1349.
- [33] M. Otsu, R. Omura, M. T. Yoshimori, M. Kikuchi, Protein disulfide isomerase associates with misfolded human lysozyme in vivo. *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 6874–6877.
- [34] G. Whyteside, M, J.C. Alcocer, J.R. Kumita, C.M. Dobson, M. Lazarou, R.J. Pleass, D.B. Archer, Native-state stability determines the extent of degradation relative to secretion of protein variants from *Pichia pastoris*. *PLoS One.* 6 (2011) e22692. doi: 10.1371.
- [35] G. Esposito, J. Garcia, P. Mangione, S. Giorgetti, A. Corazza, P. Viglino, F. Chiti, A. Andreola, P. Dumy, D. Booth, P.N. Hawkins, S. Bellotti, Structural and folding dynamic properties of the T70N variant of human lysozyme. *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 25910–25918.
- [36] Y. Kawaguchi, J. Kovacs, A. McLaurin, J.M. Vance, A. Ito, T.P. Yao, The deacetylase HDAC6 regulates aggresome formation and cell viability in response to misfolded protein stress. *Cell.* 115 (2003) 727–738.
- [37] H. Ouyang, Y.O. Ali, M. Ravichandran, A. Dong, W. Qiu, F. MacKenzie, S. Dhe-

- aganon, C.H. Arrowsmith, R.G. Zhai, Protein aggregates are recruited to aggresome by histone deacetylase 6 via unanchored ubiquitin C termini. *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 2317–2327.
- [38] N.G. Bauer, C. Richter-Landsberg, The dynamic instability of microtubules is required for aggresome formation in oligodendroglial cells after proteolytic stress. *J. Mol. Neurosci.* 29 (2006) 153–168.
- [39] S.J. Marciniak, D. Ron. Endoplasmic reticulum stress signaling in disease. *Physiol. Rev.* 86 (2006) 1133–1149.
- [40] K. Mori, Signalling pathways in the unfolded protein response: development from yeast to mammals. *J. Biochem.* 146 (2009) 743–750.
- [41] A. Chakrabarti, A.W. Chen, J.D. Varner, A review of the mammalian unfolded protein response. *Biotechnol. Bioeng.* 108 (2011) 2777–2793.
- [42] C.W. Lai, J.H. Otero, L.M. Hendershot, E. Snapp, ERdj4 protein is a soluble endoplasmic reticulum (ER) DnaJ family protein that interacts with ER-associated degradation machinery. *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 7969–7978.
- [43] M. Ni, H. Zhou, S. Wey, P. Baumeister, A.S. Lee, Regulation of PERK signaling and leukemic cell survival by a novel cytosolic isoform of the UPR regulator GRP78/BiP. *PLoS One.* 4 (2009) e6868.
- [44] J. Maiuolo, S. Bulotta, C. Verderio, R. Benfante, N. Borgese, Selective activation of the transcription factor ATF6 mediates endoplasmic reticulum proliferation triggered by a membrane protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 108 (2011) 7832–7837.

- [45] J. Hollien, Evolution of the unfolded protein response. *Biochim. Biophys. Acta.* 1833 (2013) 2458–2463.
- [46] C. Gallerne, A. Prola, C. Lemaire, Hsp90 inhibition by PU-H71 induces apoptosis through endoplasmic reticulum stress and mitochondrial pathway in cancer cells and overcomes the resistance conferred by Bcl-2. *Biochim. Biophys. Acta.* 1833 (2013) 1356–1366.
- [47] R.J. Viana, C.J. Steer, C.M. Rodrigues, Amyloid- β peptide-induced secretion of endoplasmic reticulum chaperone glycoprotein GRP94. *J. Alzheimers Dis.* 27 (2011) 61–73.
- [48] H. Nishitoh, CHOP is a multifunctional transcription factor in the ER stress response. *J. Biochem.* 151 (2012) 217–219.
- [49] M. Misiewicz, MA. Déry, B. Foveau, J. Jodoin, D. Ruths, AC. LeBlanc, Identification of a Novel Endoplasmic Reticulum Stress Response Element Regulated by XBP1. *J Biol Chem.* 288 (2013) 20378-20391.
- [50] S. Tobisawa, Y. Hozumi, S. Arawaka, S. Koyama, M. Wada, M. Nagai, M. Aoki, Y. Itoyama, K. Goto, T. Kato, Mutant SOD1 linked to familial amyotrophic lateral sclerosis, but not wild-type SOD1, induces ER stress in COS7 cells and transgenic mice, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 303 (2003) 496-503.
- [51] R. Wate, H. Ito, J.H. Zhang, S. Ohnishi, S. Nakano, H. Kusaka, Expression of an endoplasmic reticulum-resident chaperone, glucose-regulated stress protein 78, in the spinal cord of a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis, *Acta Neuropathol.* 110 (2005) 557-562.

- [52] H. Kikuchi, G. Almer S. Yamashita, C. Guégan, M. Nagai, Z. Xu, A.A. Sosunov, G.M. McKhann, S. Przedborski, Spinal cord endoplasmic reticulum stress associated with a microsomal accumulation of mutant superoxide dismutase-1 in an ALS model, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103 (2006) 6025-6030.
- [53] K. Sörgjerd, B. Ghafouri, B.H. Jonsson, J.W. Kelly, S.Y. Blond, P. Hammarström, Retention of misfolded mutant transthyretin by the chaperone BiP/GRP78 mitigates amyloidogenesis, *J. Mol. Biol.* 356 (2006) 469-482.
- [54] S. Susuki, T. Sato, M. Miyata, M. Momohara, M.A. Suico, T. Shuto, Y. Ando, H. Kai, The Endoplasmic Reticulum-associated Degradation of Transthyretin Variants Is Negatively Regulated by BiP in Mammalian Cells, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 8312-8321.
- [55] Y. Suzuki, M. Minami, M. Suzuki, K. Abe, S. Zenno, M. Tsujimoto, K. Matsumoto, Y. Minami, The Hsp90 inhibitor geldanamycin abrogates colocalization of eIF4E and eIF4E-transporter into stress granules and association of eIF4E with eIF4G, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 35597-35604.
- [56] P.T. Sattianayagam, S.D.J. Gibbs, D. Rowczenio, J.H. Pinney, A.D. Wechalekar, J.A. Gilbertson, P.N. Hawkins, H.J. Lachmann, J.D. Gillmore, Hereditary lysozyme amyloidosis — phenotypic heterogeneity and the role of solid organ transplantation, *J. Int. Med.* 272 (2012) 36–44.
- [57] L.A. Morozova-Roche, J. Zurdo, A. Spencer, W. Noppe, V. Receveur, D.B. Archer, M. Joniau, C.M. Dobson, Amyloid fibril formation and seeding by wild-type human lysozyme and its disease-related mutational variants, *J. Struct. Biol.* 130 (2000)

339-351.

[58] E. Jean, M. Ebbo, S. Valleix, L. Benarous, L. Heyries, A. Grados, E. Bernit, G.

Grateau et al., A new family with hereditary lysozyme amyloidosis with gastritis and inflammatory bowel disease as prevailing symptoms, *BMC Gastroenterol.* 14 (2014)

156–161.

Table, Figure

	Viable Cells (%)	Apoptotic Cells (%)	Non-viable Cells (%)
Mock	87.9 ± 0.9	3.4 ± 0.2	8.7 ± 1.0
Wild	86.9 ± 0.8	5.1 ± 0.2	8.0 ± 0.7
I56T	87.0 ± 0.5	5.1 ± 0.3	8.0 ± 0.5
F57I	87.7 ± 1.1	5.0 ± 0.6	7.4 ± 0.6
W64R	84.8 ± 0.4	5.2 ± 0.3	10.0 ± 0.3
D67H	86.3 ± 1.2	5.2 ± 0.1	8.5 ± 1.2

Table.1

トランスフェクション後 72 時間の HEK293 細胞の、生細胞・死細胞・アポトーシス細胞の測定 (n=4)。Guava viacount® で染色しフローサイトメーターで測定。データは mean ± SE。

<i>For RT-PCR</i>	
<i>Target</i>	sequence (5'-3')
<i>Lysozyme</i>	GGGTCTAGAATGAAGGCTCTCATTGTTCTG
	GGGAAGCTTTTACTACTCCACAACCTTGAAC
β -actin	ATGATATCGCCGCTCG
	CGCTCGGTGAGGATCTTCA
<i>XBP-1</i>	CCTTGTAGTTGAGAACCAGG
	GGGGCTTGGTATATATGTGG

<i>For real-time PCR</i>	
<i>Target</i>	sequence (5'-3')
<i>Lysozyme</i>	CAATGCTGGAGACAGAAGCA
	TAACTGCTCCTGGGGTTTTG
<i>GAPDH</i>	TCCAAAATCAAGTGGGGCGA
	AAATGAGCCCCAGCCTTCTC
<i>GRP78/BiP</i>	TGTCAACCAATTATCAGCAAACCTC
	TTCTGCTGTATCCTCTTCACCAGT
<i>GRP94</i>	TTCCGCCTTCCTTGTAGCAG
	GGGTAATTGTCGTTCCCCGT
<i>XBP-1s</i>	CTGAGTCCGAATCAGGTGCAG
	ATCCATGGGGAGATGTTCTGG
<i>XBP-1u</i>	CAGCACTCAGACTACGTGCA
	ATCCATGGGGAGATGTTCTGG
<i>Total XBP-1</i>	TGGCCGGGTCTGCTGAGTCCG
	ATCCATGGGGAGATGTTCTGG
<i>PDI</i>	GGACATGACCTTTGGCCTCA
	CCGCCCTCATCAAACCTTCT
<i>CHOP</i>	AGAACCAGGAAACGAAACAGA
	TCTCCTTCATGCGCTGCTTT
<i>Calnexin</i>	CCAGAAGCTGTCAAGCCAGA
	AACCAGCCTTCGGGTTTTGT
<i>ATF4</i>	GTTCTCCAGCGACAAGGCTA
	ATCCTGCTTGCTGTTGTTGG
<i>EDEM1</i>	CAAGTGTGGGTACGCCACG
	AAAGAAGCTCTCCATCCGGTC
<i>ERdj4</i>	GCCAAAATCGGCATCAGAGC
	TTTTGCTTCAGCATCTGGGC
<i>HERP</i>	CCAAAGCAGGAAAAACGGCA
	CCTCAGGATACTGTCCCGA
<i>p58IPK</i>	CGTTTGGGTTACAAGCACT
	CCCGTAGTTCTGCATCCCAA
<i>HEDJ</i>	AAACAAACCTGTGGCAAGGC
	ACATTAGGGCATTGTCGCA
<i>GADD45</i>	ACGATCACTGTCGGGGTGTA
	CCACATCTCTGTCGTCGTCC
<i>HRD1</i>	CCTGCCTCCTTTCTCCAG
	GAGAAAGGGCTGCACTGGT
<i>Armet</i>	GGGCGACTGCGAAGTTTGTA
	TGCTTCCCGCAGAACCTTA

Table.2

RT-PCR およびリアルタイム PCR に用いたプライマーの配列。

Lysozyme	Secretion to medium	Pelleting	Association to GRP78/BiP	Thermal stability	Property of amino acid 56
Wild type 56I	+++	±	-	+++	Hydrophobic
I56L*	+++	-	-	++	=
I56V*	+++	-	±	+	=
I56M*	+++	-	±	+	=
I56A	++	+++	+++	---	=
I56G	-	+++	+++	----	=
I56F	++	+++	+++	+	=
I56W	-	+++	+++	--	=
I56T**	++	+++	+++	---	Hydrophilic
I56E	-	+++	+++	---	=
I56R	-	+++	+++	--	=
I56S	-	+++	+++	---	=
I56Y	-	+++	+++	++	=

Table.3

野性型ヒトリゾチームおよび I56 変異体における、GRP78/BiP との相互作用の有無、*in silico* による熱安定性の予測結果、発現・分泌の有無結果の比較一覧。* は野性型ヒトリゾチームと同様の特性を示した変異体。** はアミロイドーシスを引き起こす変異体。=は同上を示している。カラム 2、3、4 は Fig.17A の結果を参照した。熱安定性はコンピュータシミュレーションによって解析した。それぞれのスコアは、「+」と「-」のおおよその程度で示した（+：多い、±：わずか、-：少ない）。また、熱安定性については、野生型に対しての熱安定性の差 (dstability) を元に示した（ $0 \leq +++ < 0.5$, $0.5 \leq ++ < 1.2$, $1.2 \leq + < 1.7$, $1.7 \leq - < 2.0$, $2.0 \leq -- < 3.0$, $3.0 \leq --- < 4.5$, $4.5 \leq ----$ ）。

今回実験に用いていない I56 変異体も熱安定性の計算を実施した。その結果、疎水性のアミノ酸に置換するとスコアは++もしくは+であったが、親水性のアミノ酸に置換するとスコアは---もしくは--であった。

Lysozyme	Degradation	Secretion to medium	Pelleting	Association to GRP78/BiP
Wild type	—	+++	±	—
I56T**	—	++	+++	+++
F57I**	—	++	+++	+++
W64R**	—	++	+++	+++
D67H**	—	++	+++	+++
1-41del	+++	—	+++***	—
1-51del	+++	—	+++***	—
28-34del	+	—	+++***	—
28-34del/I56T	+	—	+++***	—
51-67del	±	—	+++	+++
80-130del	±	—	+++	++
F3A	<i>n.d.</i>	+	++	++
F3A/I56T	<i>n.d.</i>	—	++	+++
L8A	<i>n.d.</i>	++	++	++
L8A/I56T	<i>n.d.</i>	—	++	+++
L12A	<i>n.d.</i>	++	++	++
L12A/I56T	<i>n.d.</i>	—	++	+++
L15A*	<i>n.d.</i>	+++	—	—
L15A/I56T	<i>n.d.</i>	—	++	+++
F25A	<i>n.d.</i>	+	++	++
F25A/I56T	<i>n.d.</i>	—	++	+++
L31A	<i>n.d.</i>	++	++	++
L31A/I56T	<i>n.d.</i>	—	++	++

Table.4

野性型および欠損体・変異体ヒトリゾチームにおける、GRP78/BiP との相互作用の有無、*in silico* による熱安定性の予測結果、発現・分泌の有無結果の比較一覧。* は野性型ヒトリゾチームと同様の特性を示した変異体。** はアミロイドーシスを引き起こす変異体。*** は自己凝集性を示したものの。カラム 2 から 5 は Fig.2, 12-16 の結果を参照した。スコアは、Table.3 と同様の方法で表記した。*n.d.* は未実施。

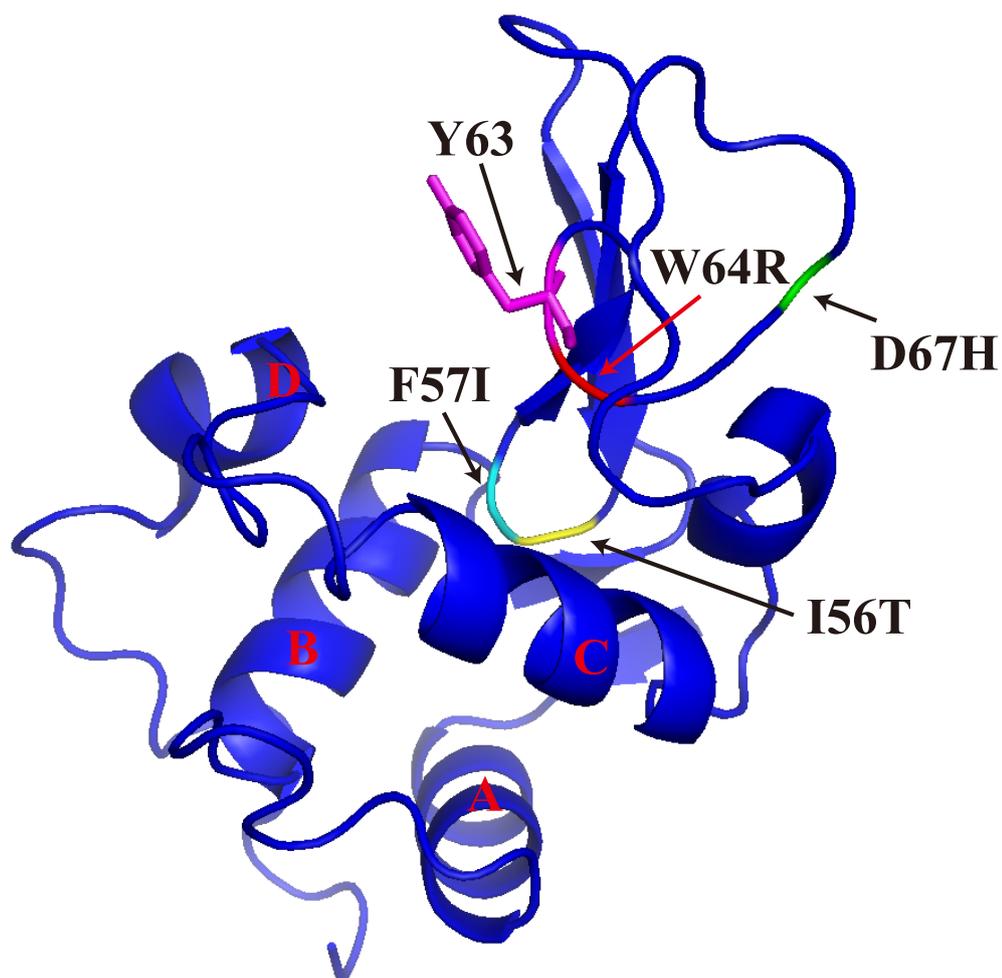


Figure.1

野性型ヒトリゾチームの構造。アミロイドーシスを引き起こす変異箇所 4 つ (I56T・F57I・W64R・D67H) とアミロイド線維形成に重要な Y63 を矢印で表示。A-D はヘリックス構造。イメージは、PDB (1LZ1) のリゾチームデータを用いて PyMOL で作製した。

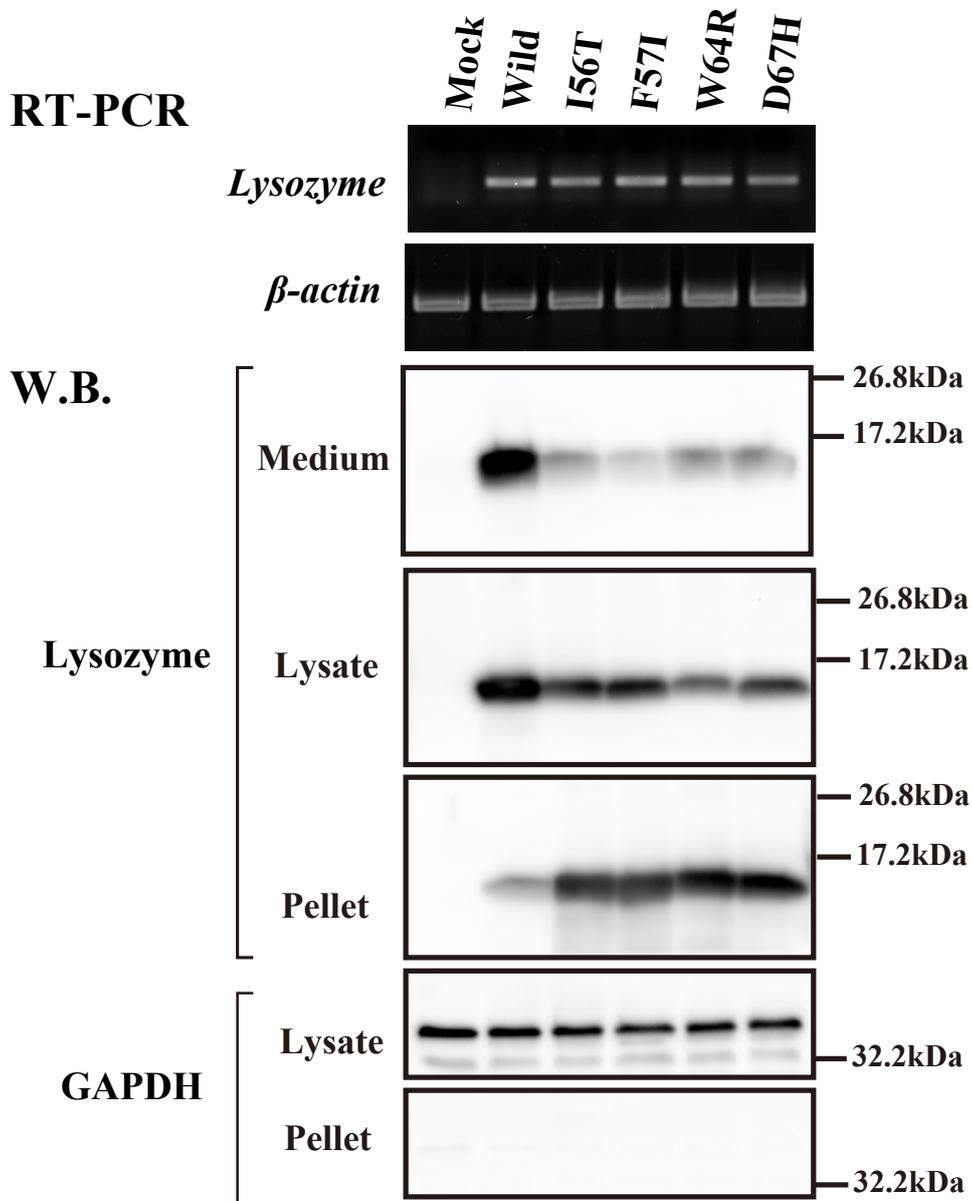


Figure.2A

トランスフェクション後72時間のヒトリゾチームの発現。**Mock**は空ベクターを導入したもの。**Wild**は野生型を導入し、**I56T**、**F57I**、**W64R**、**D67H**は変異体を導入したもの。上2つのパネルはRT-PCRによる転写レベルの発現。下の5つのパネルはウェスタンブロットによるタンパク質レベルの発現。培地上清 (**Medium**)・細胞内可溶性画分 (**Lysate**)・細胞内不溶性画分 (**Pellet**)それぞれに含まれるヒトリゾチームをウェスタンブロットで抗ヒトリゾチーム抗体を用いて検出。**GAPDH**は、内在性コントロールとして使用した。

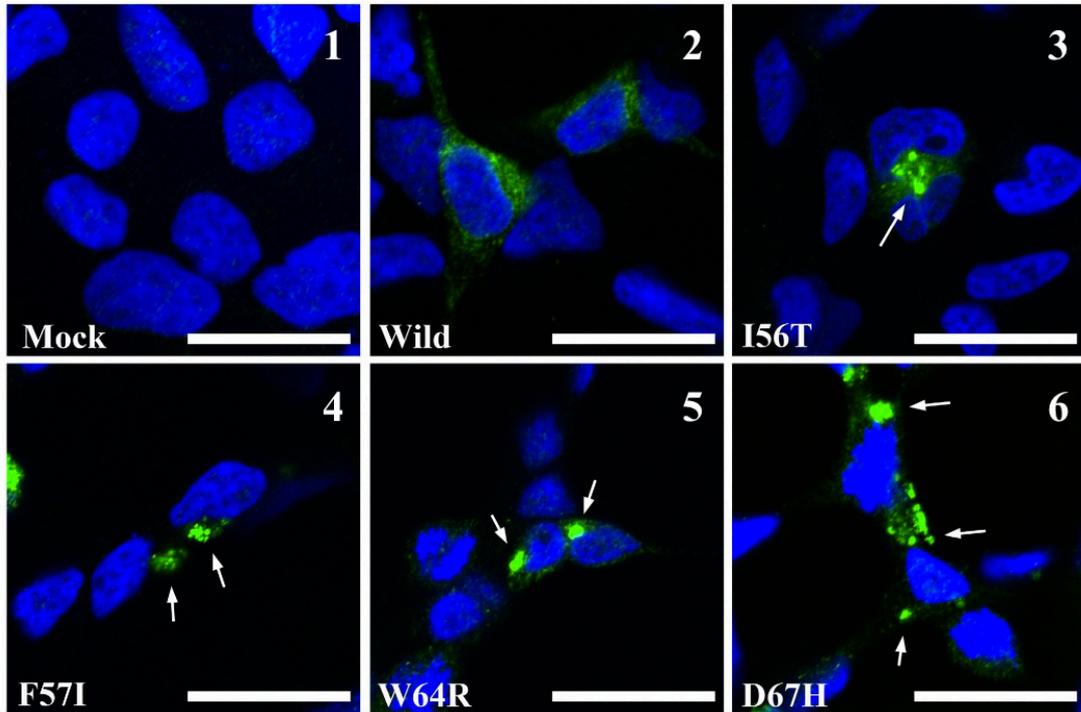


Figure.3

HEK293 細胞に導入したヒトリゾチームの細胞内局在。トランスフェクション後 72 時間の細胞を固定し、ヒトリゾチーム（緑）は、ウェスタンブロットで使用した抗体と同じ抗体を使用し、Alexa 488 結合二次抗体で染色した。細胞核は DAPI（青）で染色した。観察は共通点レーザー顕微鏡で行った。矢印は、変異体の凝集箇所を示している。スケールバーは 20 μm を示している。

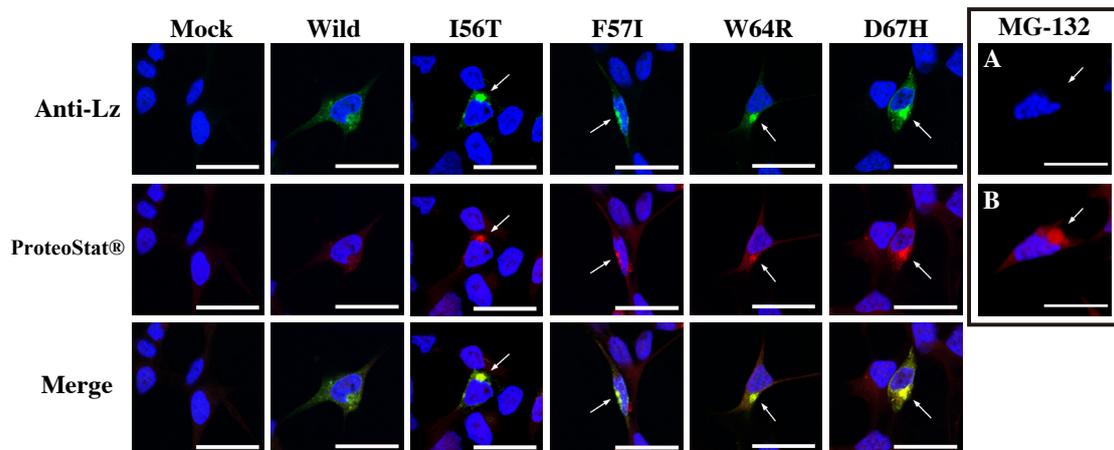


Figure.4

Proteostat® と抗ヒトリゾチーム抗体による共染色。トランスフェクション後 72 時間の細胞を固定し、Proteostat®（赤）と Figure.3 と同様に抗ヒトリゾチーム抗体で染色した（ヒトリゾチームは緑）。観察は、共焦点レーザー顕微鏡で行った。トップパネルはヒトリゾチーム、ミドルパネルは Proteostat®、ボトムパネルは重ね合わせ画像。ポジティブコントロール処理区に用いた薬剤（MG-132）はプロテアソーム阻害剤であり、プロテアソーム阻害によりアグリソームが形成される。スケールバーは、20 μm を示している。

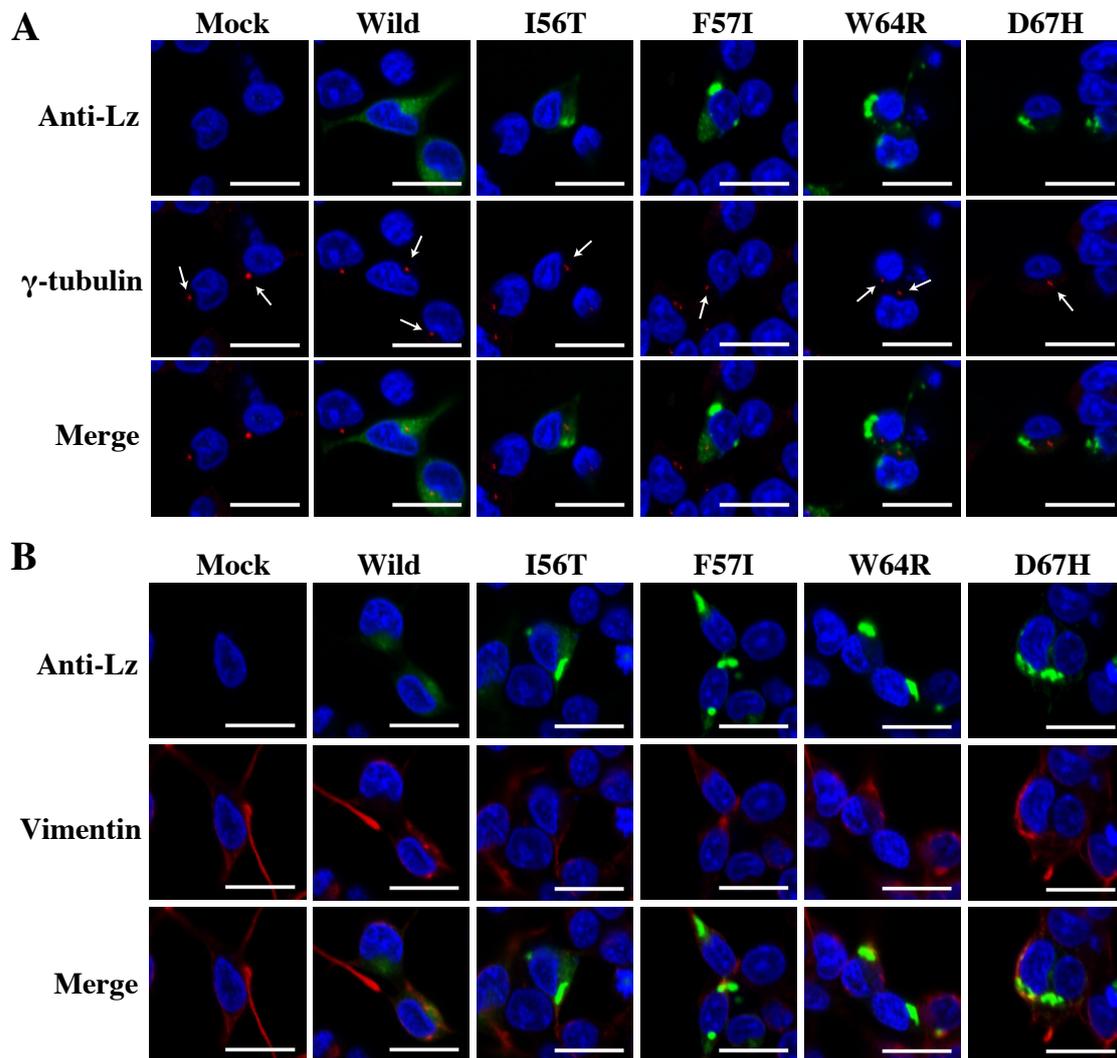


Figure.5

アグリソームのマーカータンパク質 (γ -tubulin、Vimentin) とヒトリゾチームの共染色。トランスフェクション後 72 時間の細胞を固定し多重染色を行った。ヒトリゾチームは緑、 γ -tubulin と Vimentin は赤で示している。観察は共焦点レーザー顕微鏡で行い、漏れ込みを防ぐため、line sequence で蛍光画像を取得した。A と B のトップパネルはヒトリゾチーム、A のミドルパネルは γ -tubulin、B のミドルパネルは Vimentin を示している。A と B のボトムパネルはそれぞれの重ね合わせ画像である。細胞核は青で示している。A のミドルパネルの矢印は γ -tubulin の位置を示している。スケールバーは、20 μ m である。

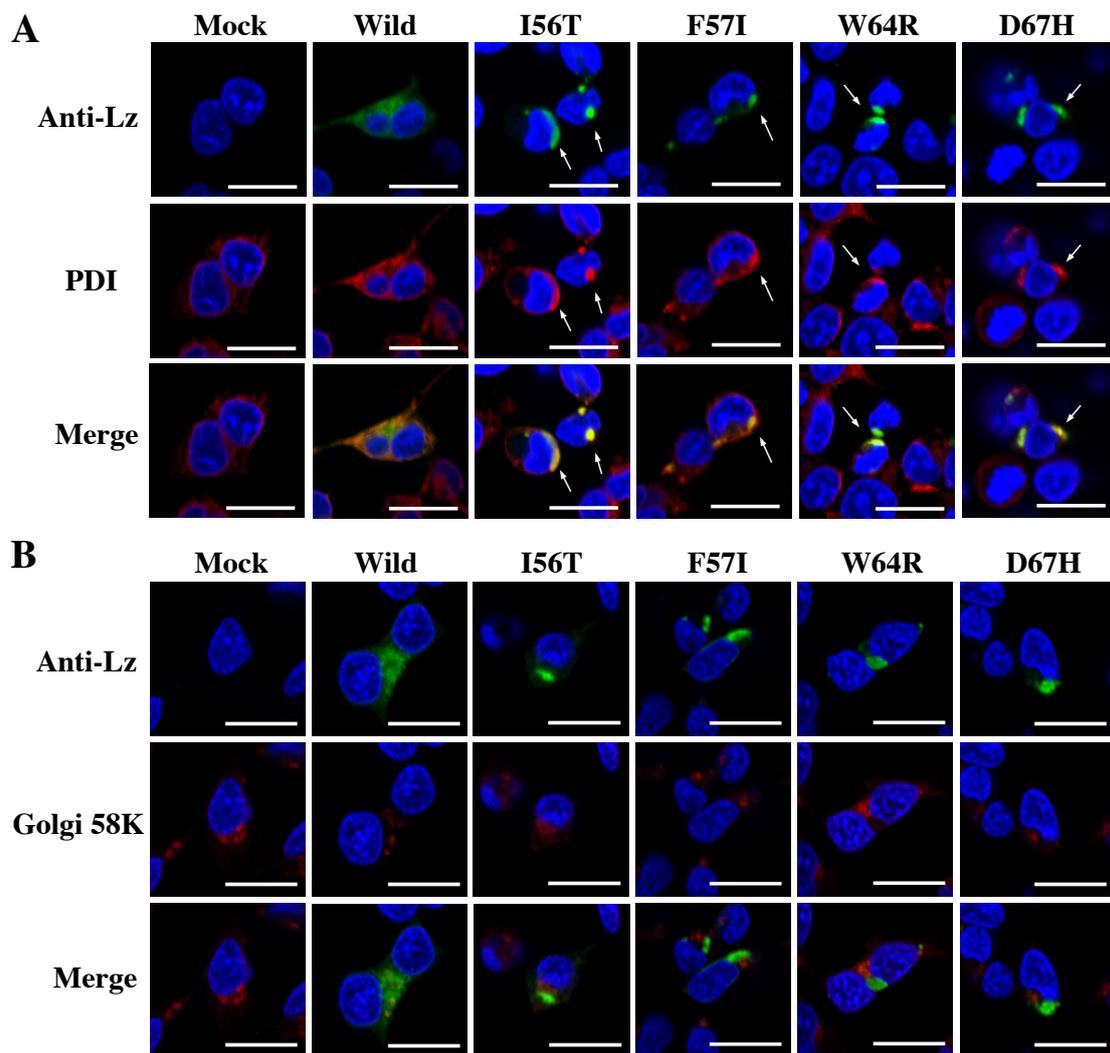


Figure.6

小胞体とゴルジ体のマーカータンパク質とヒトリゾチームの共染色。小胞体のマーカータンパク質として PDI、ゴルジ体のマーカータンパク質として Golgi 58K を用いた。トランスフェクション後 72 時間の細胞を固定し、抗ヒトリゾチーム抗体とそれぞれの特異的抗体で反応させた。そして、それぞれの抗体に特異的な二次抗体を用いて染色した。観察は、共焦点レーザー顕微鏡で行った。ヒトリゾチームは緑、PDI と Golgi 58K は赤で示している。細胞核は青で示している。A と B のトップパネルはヒトリゾチーム、A のミドルパネルは PDI、B のミドルパネルは Golgi 58K を示している。A と B のボトムパネルはそれぞれの重ね合わせ画像である。A で示している矢印は、ヒトリゾチームと PDI の局在が位置示している箇所である。スケールバーは、20 μm である。

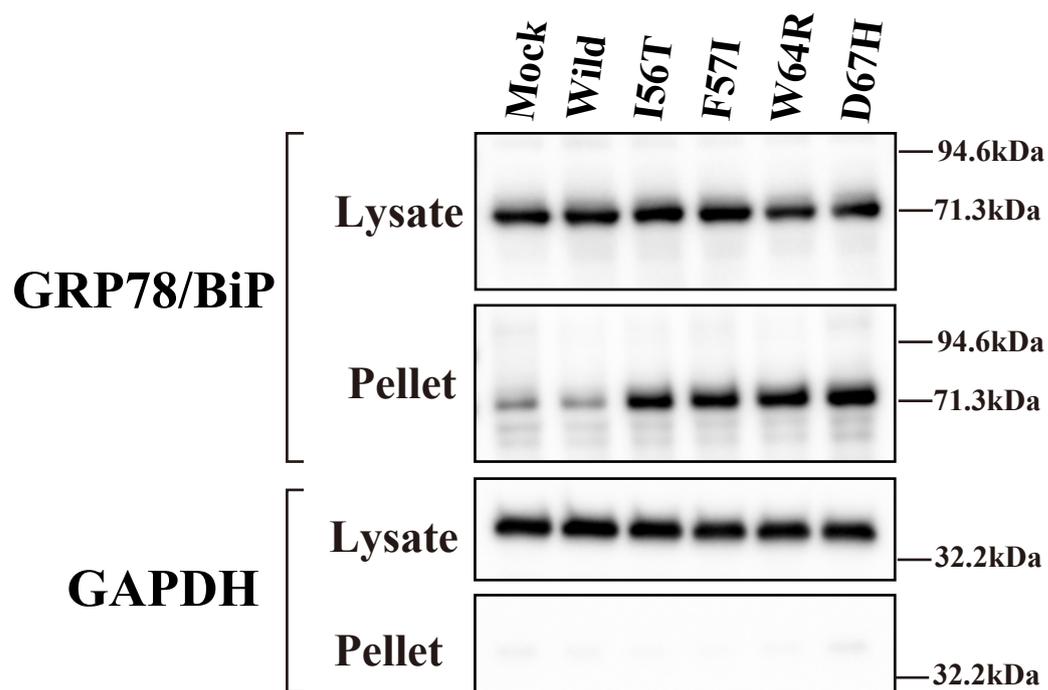


Figure.7A

トランスフェクション後 72 時間の HEK293 の GRP78/BiP の発現。ウェスタンブロットにより検出。トップパネルは、可溶性画分中の GRP78/BiP 、セカンドパネルは不溶性画分中の GRP78/BiP 。ボトムの中の二つのパネルは、内在性コントロールの GAPDH を検出。右の数字はタンパク質の分子量を示している。

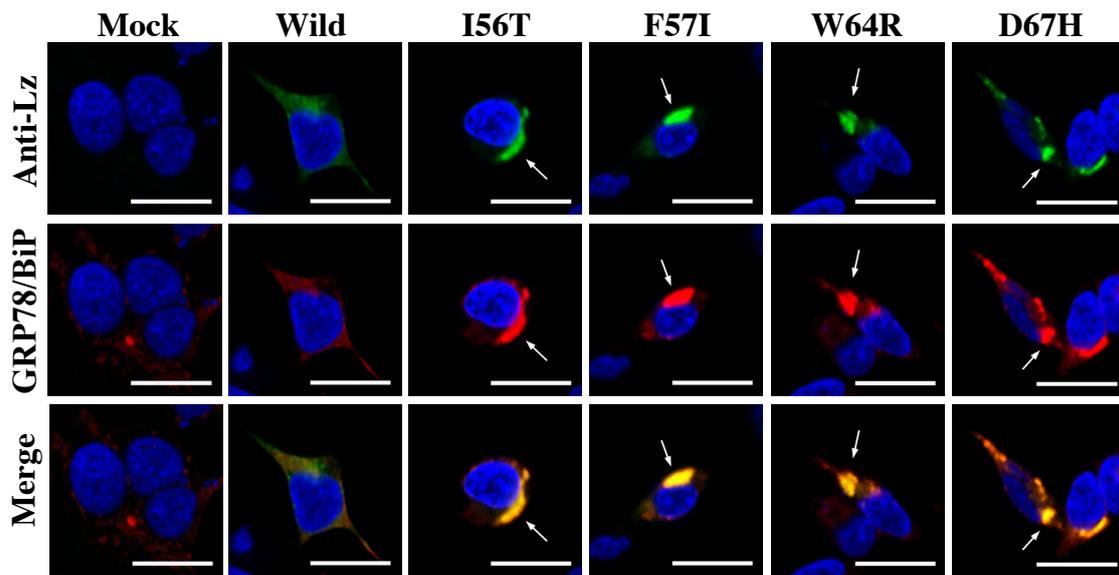


Figure.7B

トランスフェクション後 72 時間の HEK293 のヒトリゾチームと GRP78/BiP の細胞内局在。細胞を固定後、抗ヒトリゾチーム抗体と抗 GRP78/BiP 抗体を用いて免疫蛍光染色を行った。観察は、共焦点レーザー顕微鏡で実施した。ヒトリゾチームは緑、GRP78/BiP は赤、細胞核は青で示している。矢印は、ヒトリゾチームと GRP78/BiP の共局在箇所を示している。スケールバーは、20 μm である。

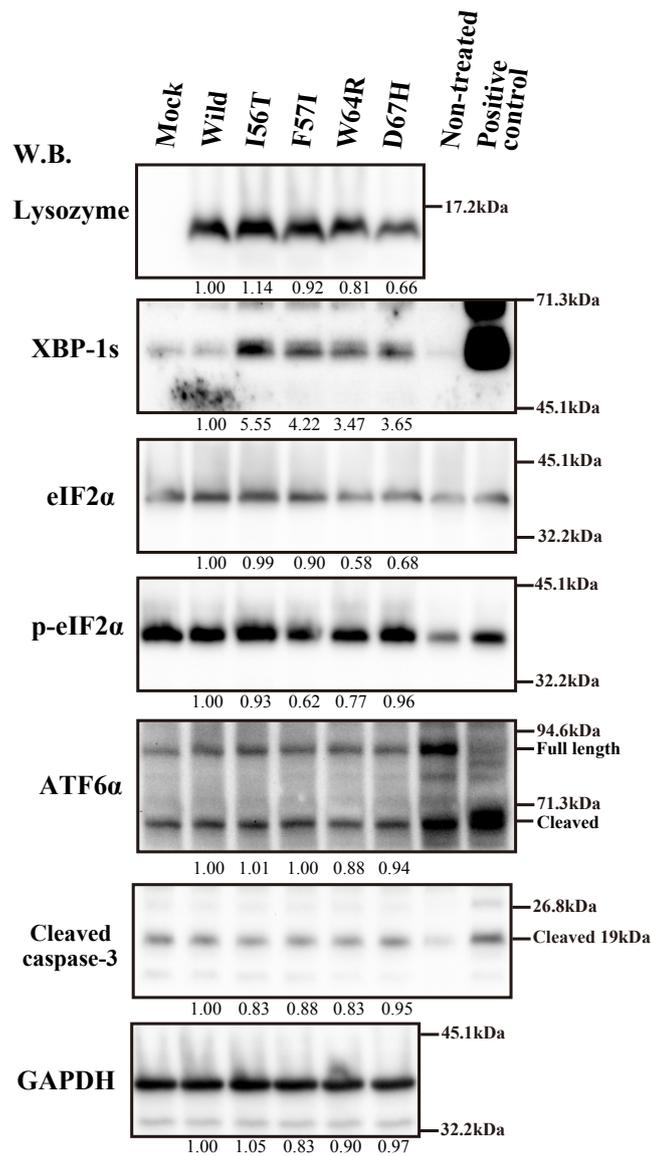


Figure.8

小胞体ストレス関連遺伝子のタンパク質発現の解析。HEK293 細胞にヒトリゾチームを発現させ、トランスフェクション後 72 時間に細胞を回収し、トータルライセイト中のタンパク質をウェスタンブロットで検出した。トップパネル：ヒトリゾチーム、セカンドパネル：XBP-1s、サードパネル：eIF2 α 、フォースパネル：p-eIF2 α 、フィフスパネル：ATF6 α 、シックスパネル：Cleaved caspase-3、ボトムパネル：内在性コントロール GAPDH を検出。セカンドパネルからフィフスパネルまでのポジティブコントロールレーンは、小胞体ストレスを誘導するツニカマイシン (2 μ g/ml) で処理した細胞ライセイトを用いた。Cleaved caspase-3 のポジティブコントロールレーンは、アポトーシス誘導剤 (カンプトテシン、7 μ g/ml) で処理した細胞ライセイトを用いた。

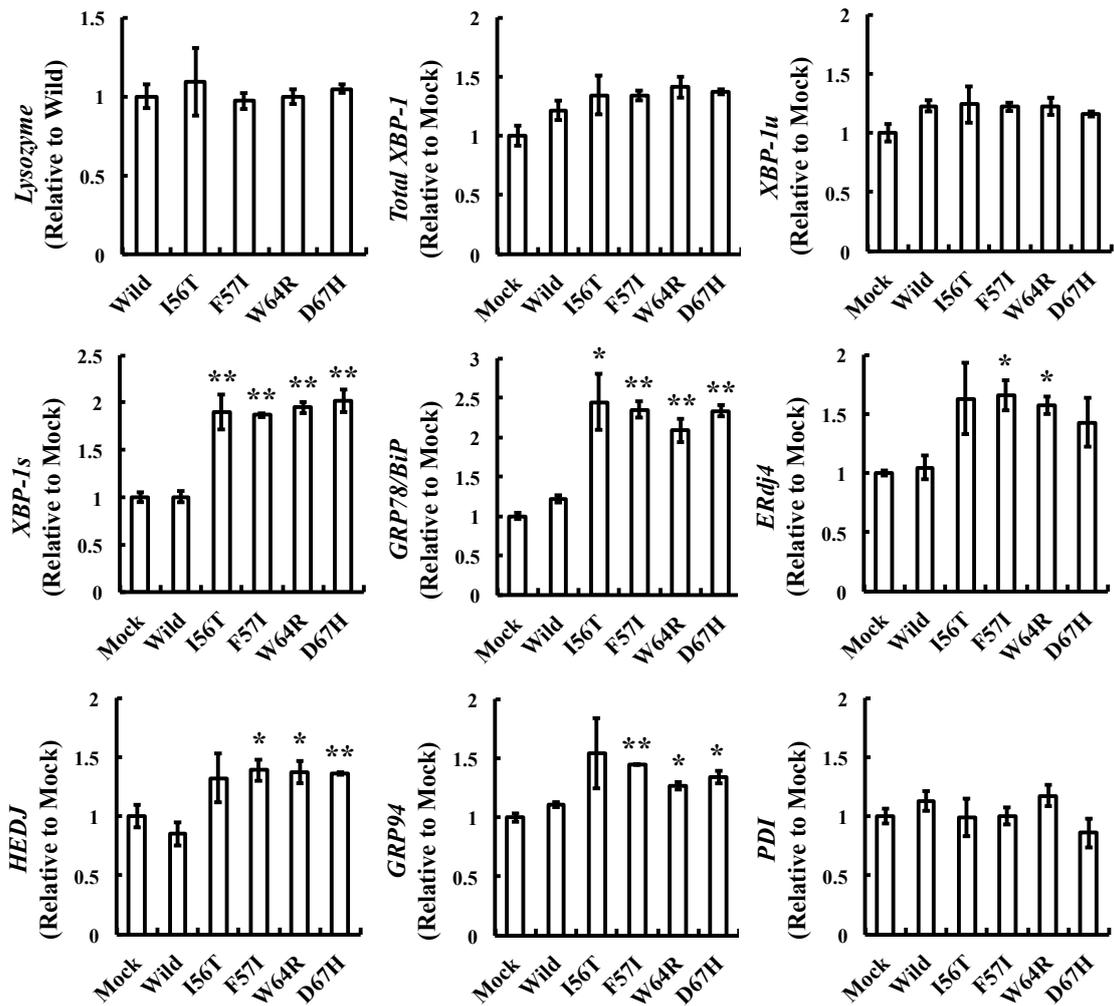


Figure.9A

小胞体ストレス関連遺伝子の転写レベルでの発現解析。トランスフェクション後 72 時間の細胞からトータル RNA を回収し逆転写後、リアルタイム PCR で各遺伝子の相対定量を行った。リゾチームは野生型に対する相対定量値を示し、それ以外は Mock 細胞の発現に対して相対定量値を算出した。グラフは $n=3$ の平均値±標準誤差を示している。野生型に対する各変異体の有意差検定は t 検定を用いた (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)。

A : リゾチーム、*XBP-1*(Total)、*XBP-1u*、*XBP-1s*、*GRP78/BiP*、*ERdj4*、*HEDJ*、*GRP94*、*PDI*

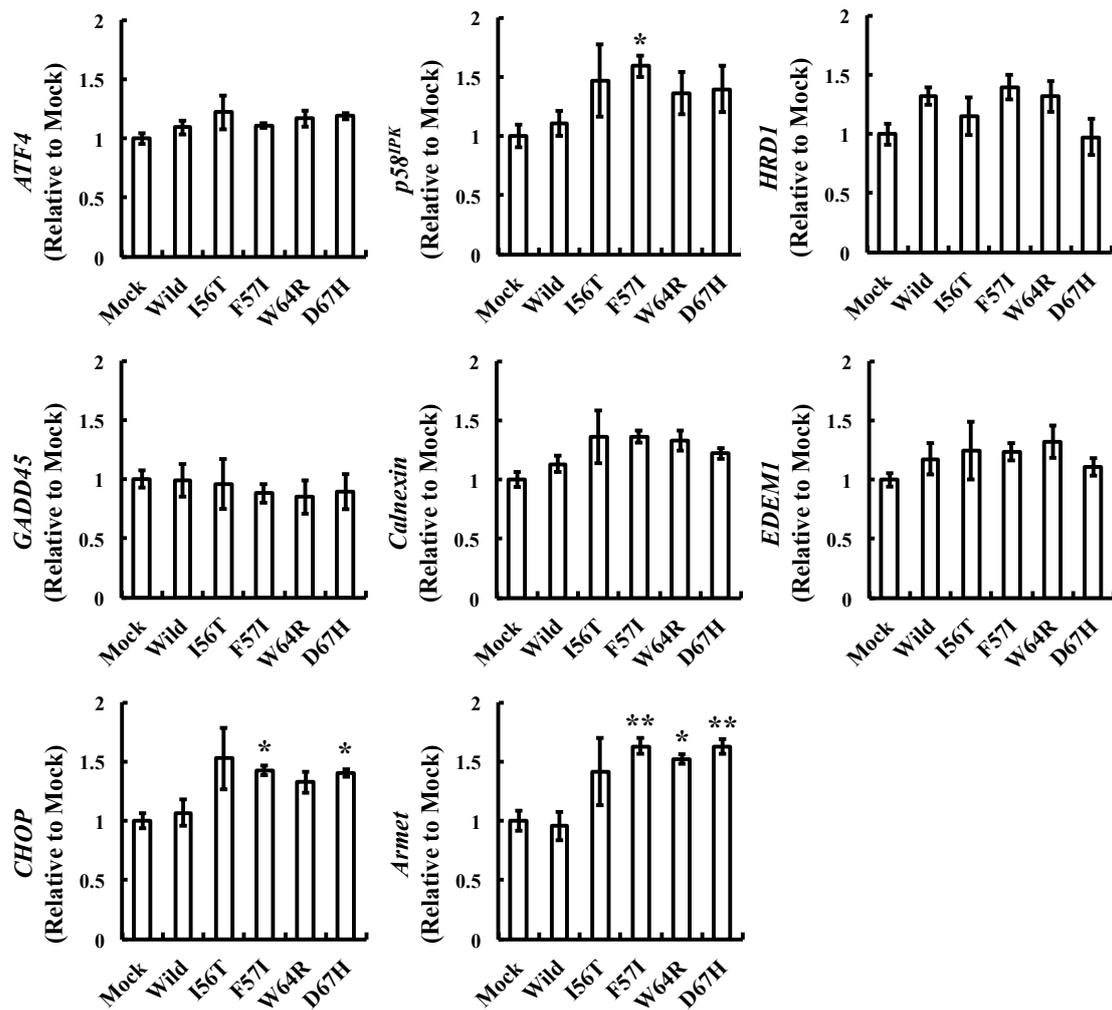


Figure.9B

小胞体ストレス関連遺伝子の転写レベルでの発現解析。トランスフェクション後 72 時間の細胞からトータル RNA を回収し逆転写後、リアルタイム PCR で各遺伝子の相対定量を行った。Mock 細胞の発現に対して相対定量値を算出した。グラフは $n=3$ の平均値±標準誤差を示している。野生型に対する各変異体の有意差検定は t 検定を用いた (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)。

B : *ATF4*, *p58^{IPK}*, *HRD1*, *GADD45*, *Calnexin*, *EDEM1*, *CHOP*, *Armet*

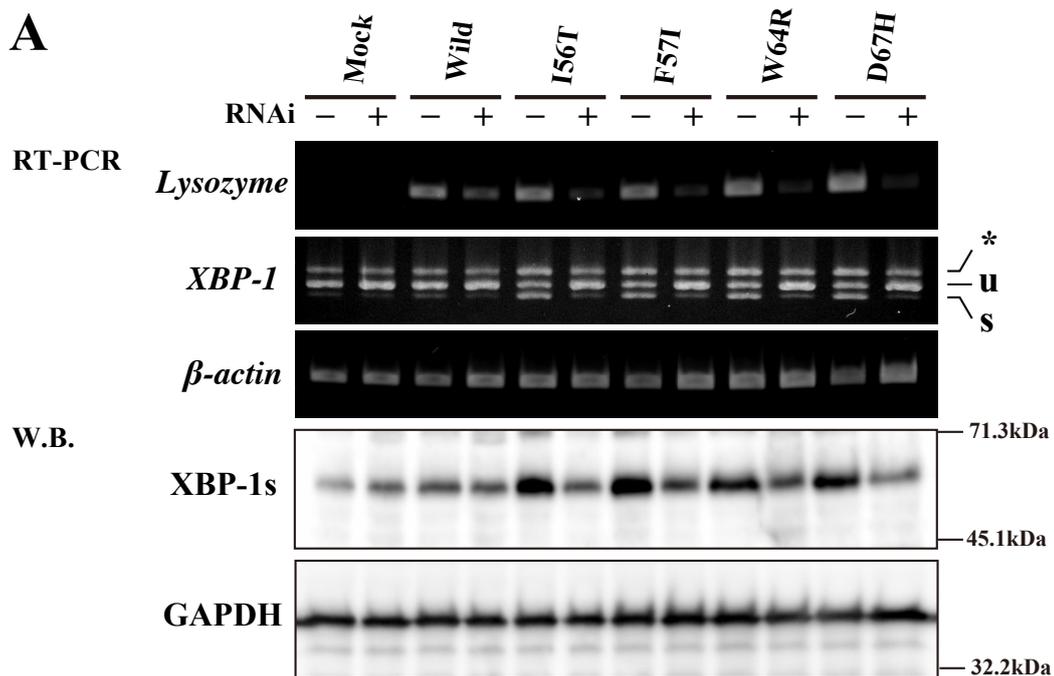


Figure.10A

ヒトリゾチーム遺伝子発現抑制による小胞体ストレスの低減。ヒトリゾチーム遺伝子を導入した HEK293 細胞に対し、RNAi 法を用いてヒトリゾチームの発現を抑制した。

A : XBP-1 のスプライシング解析。トップパネルはヒトリゾチーム mRNA、セカンドパネルは *XBP-1* mRNA (u、s、* はそれぞれ unspliced、spliced、uspliced と spliced のハイブリッドを示している)。フォースパネルは XBP-1s (spliced XBP-1 product) のウェスタンブロット。*β-actin* (mRNA) と GAPDH (protein) は、内在性コントロールに用いた。

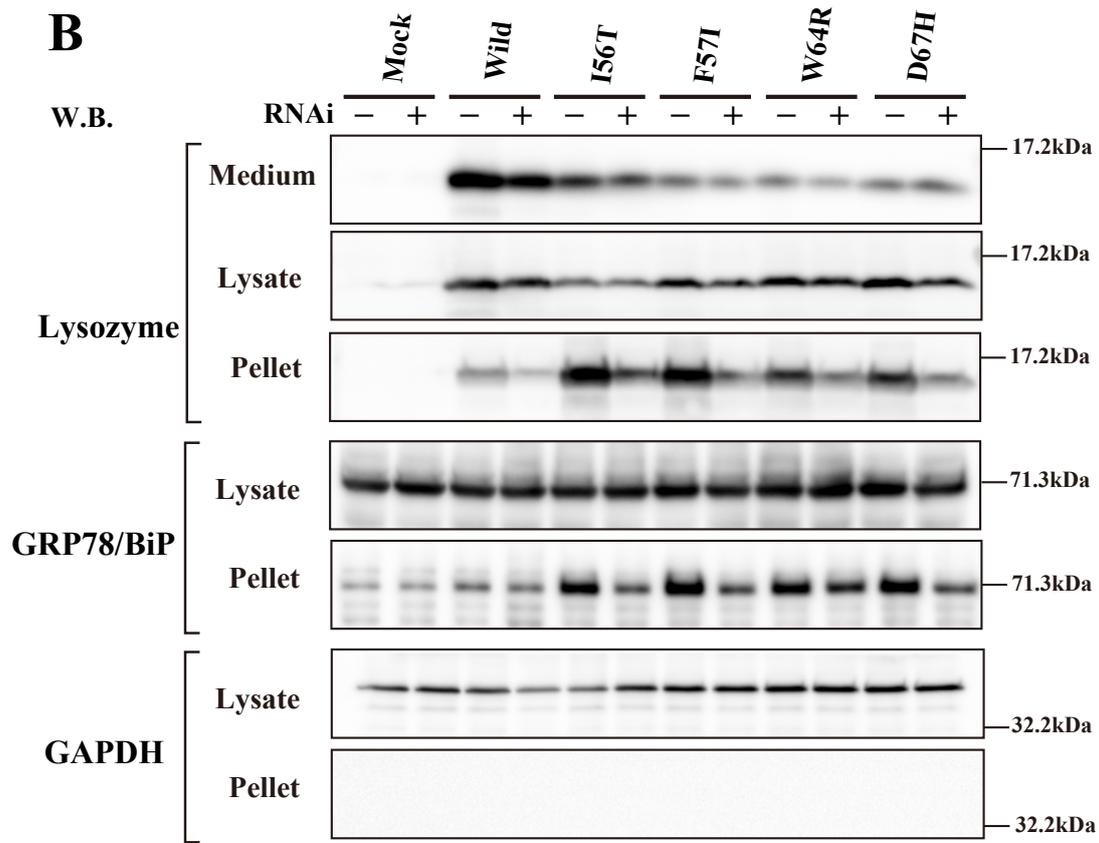


Figure.10B

ヒトリゾチーム遺伝子発現抑制による小胞体ストレスの低減。

B：培地上清・ライセイト・ペレット（トップパネル・セカンドパネル・サードパネル）中に含まれるヒトリゾチームと、ライセイト・ペレット（フォースパネル・フィフスパネル）中に含まれる GRP78/BiP のウェスタンプロット解析。内在性コントロールには GAPDH を用いた。

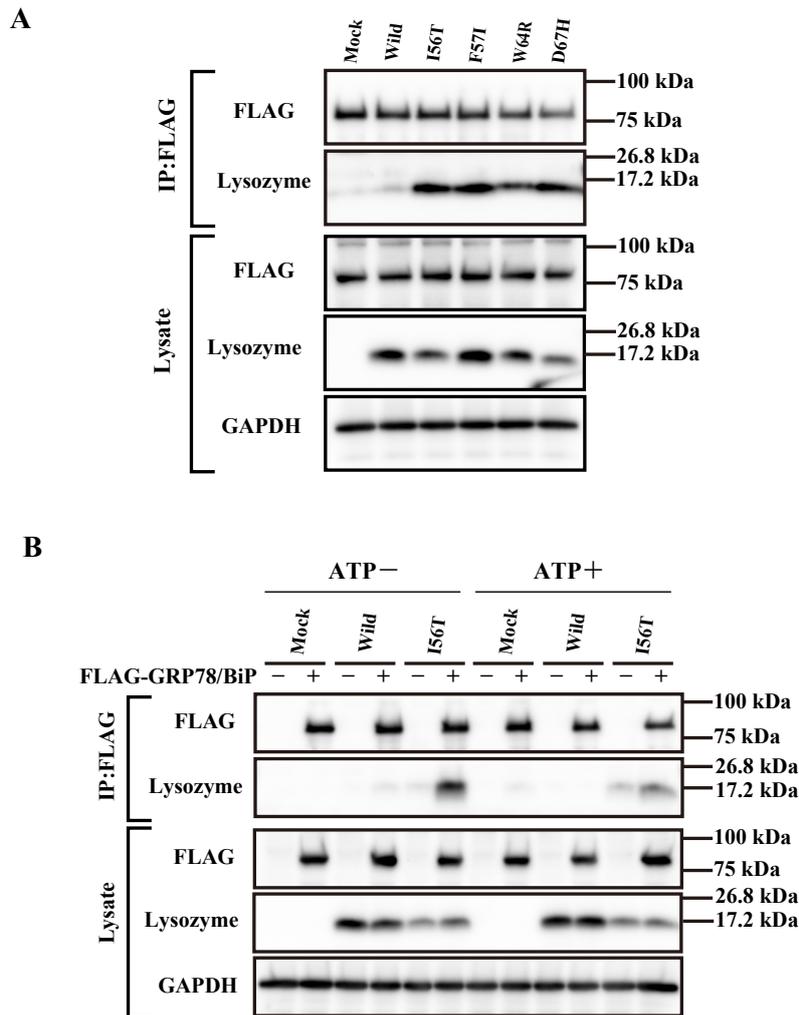


Figure.11

免疫沈降によるヒトリゾチームと GRP78/BiP の相互作用解析。HEK293 細胞に FLAG-GRP78 発現ベクターをトランスフェクションし、24 時間後にヒトリゾチーム遺伝子を導入し、さらに 48 時間インキュベートした。免疫沈降に用いたライセイト調製は試料調製および実験方法を参照。抗 FLAG 抗体で免疫沈降を行い、共沈降したヒトリゾチームをウェスタンブロットで検出した (IP:FLAG パネル)。A : トップパネルは FLAG-GRP78/BiP 、セカンドパネルは共沈降したヒトリゾチーム。下の 3 つのパネルは免疫沈降に用いたライセイト中に含まれる FLAG-GRP78、ヒトリゾチーム、GAPDH を検出したもの。

B : ATP の有無による GRP78/BiP との相互作用の変化。免疫沈降の方法は Fig.11A と同様である。ATP⁻ は、免疫沈降の際ライセイトにグルコースとヘキソキナーゼを添加し、内在性の ATP を消費させた。ATP⁺ はライセイトに ATP (1mM) を添加して、過剰に ATP が存在する状態にした。

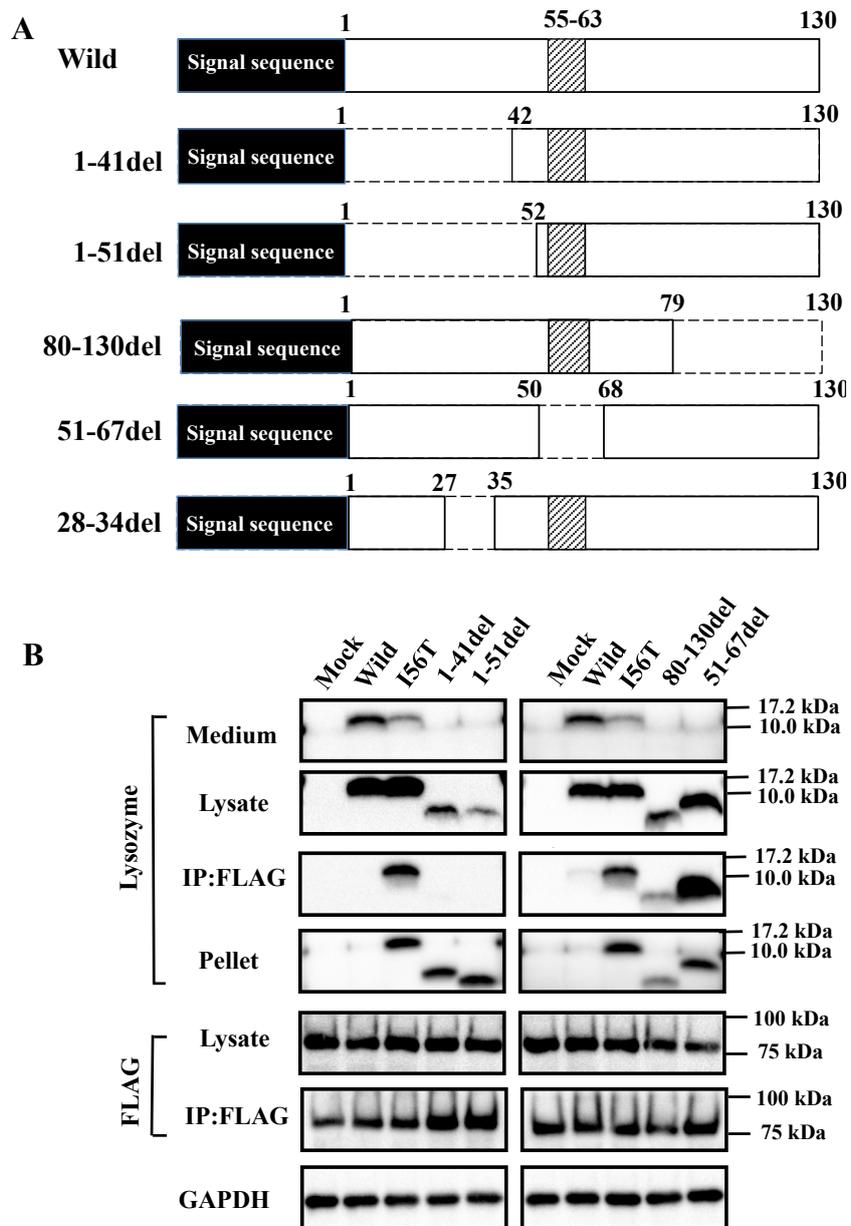


Figure.12A, B

ヒトリゾチームの GRP78/BiP 結合領域の探索。A：作製したヒトリゾチーム欠損体の模式図。N 末端の 1-41 と 1-51 残基を削った欠損体 (1-41del、1-51del)、C 末端の 80-130 残基を削った欠損体 (80-130del)、内部の 51-67 残基を削った欠損体 (51-67del)、28-34 残基の α -helix (GRP78/BiP 結合すると推定した、Fig.16A 参照) を削った欠損体 (28-34del)。B：GRP78/BiP と 4 つの欠損体 (1-41del、1-51del、80-130del、51-67del) の相互作用解析。FLAG-GRP78/BiP と欠損体を共発現させ、Fig.11 と同様の方法で免疫沈降を行った。

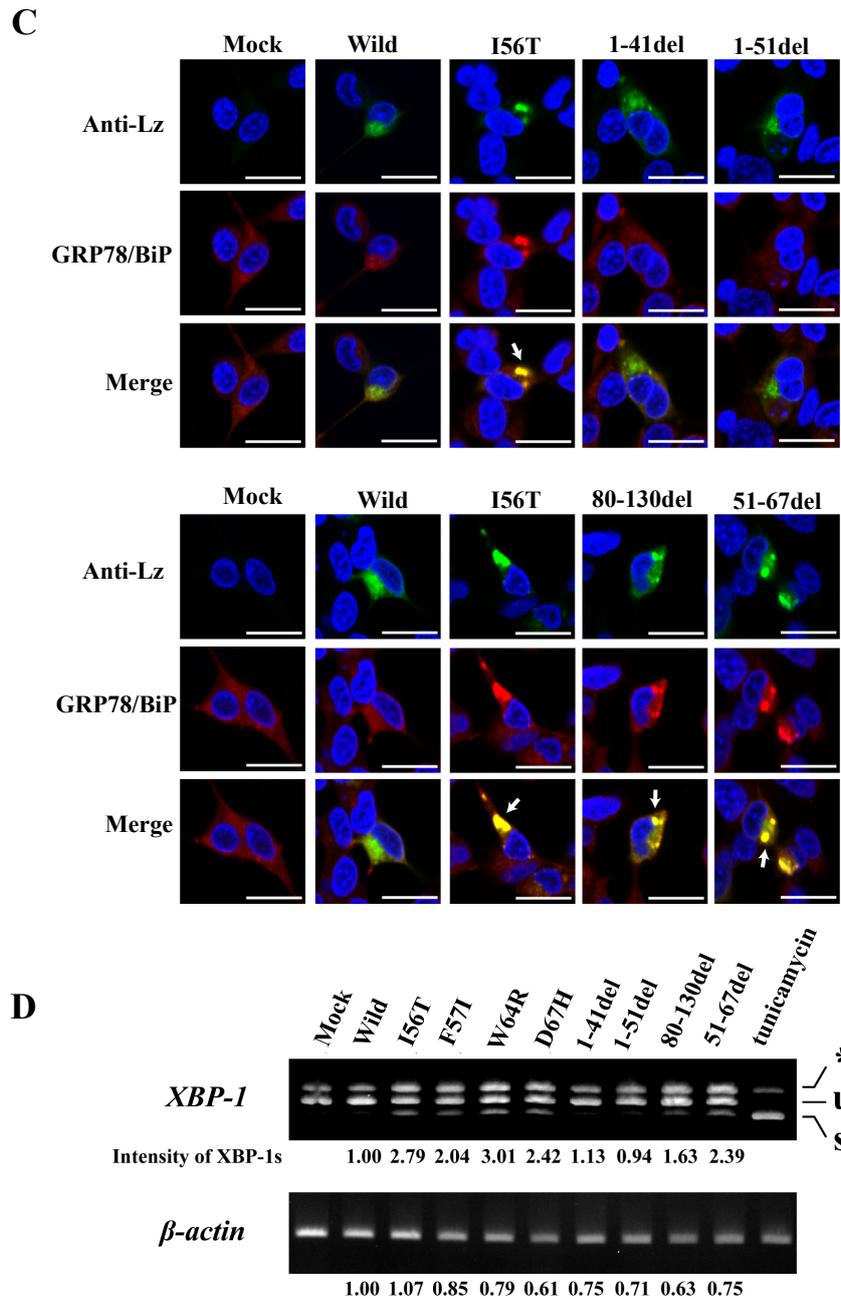


Figure.12C, D

ヒトリゾチームの GRP78/BiP 結合領域の探索。C : ヒトリゾチームと GRP78/BiP との免疫蛍光染色。ヒトリゾチーム遺伝子 (変異体を含む) 導入後 72 時間の細胞を固定し、Fig.7B と同様の方法で染色・観察を行った。トップパネルはヒトリゾチーム (緑)、セカンドパネルは GRP78/BiP (赤)、ボトムパネルは重ね合わせの画像。スケールバーは、20 μ m。D : RT-PCR による *XBP-1* のスプライシングの解析。方法は、Fig.10A と同様の方法で行った。パネル下の数値は、*XBP-1s* のバンド強度を数値化したもの (野生型を 1.00 とした)。

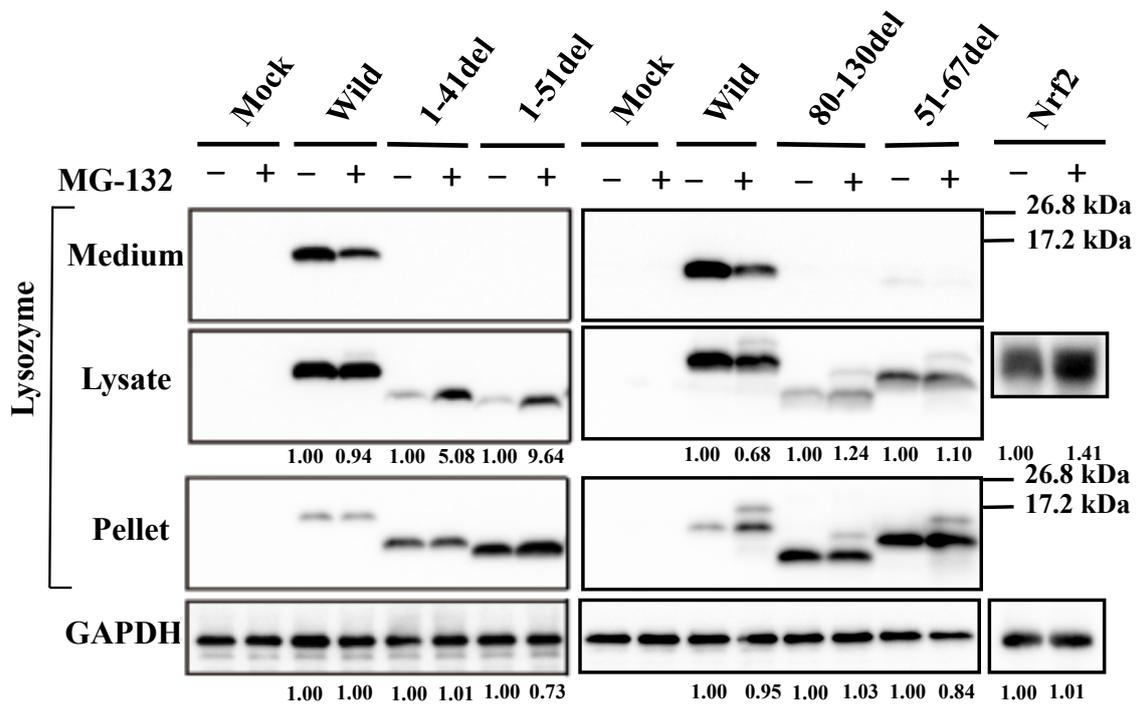


Figure.13

MG-132 処理によるヒトリゾチーム欠損体発現への影響。Fig.12A で示したヒトリゾチーム欠損体を導入した細胞を、MG-132 で処理した。方法は、Fig.1B と同様の方法である。パネル下の数値はバンド強度を表しており、未処理区を 1.00 として処理区の相対値を示している。MG-132 処理で Nrf-2 のバンド強度が上昇していたため、プロテアソーム阻害は引き起こされている。

A

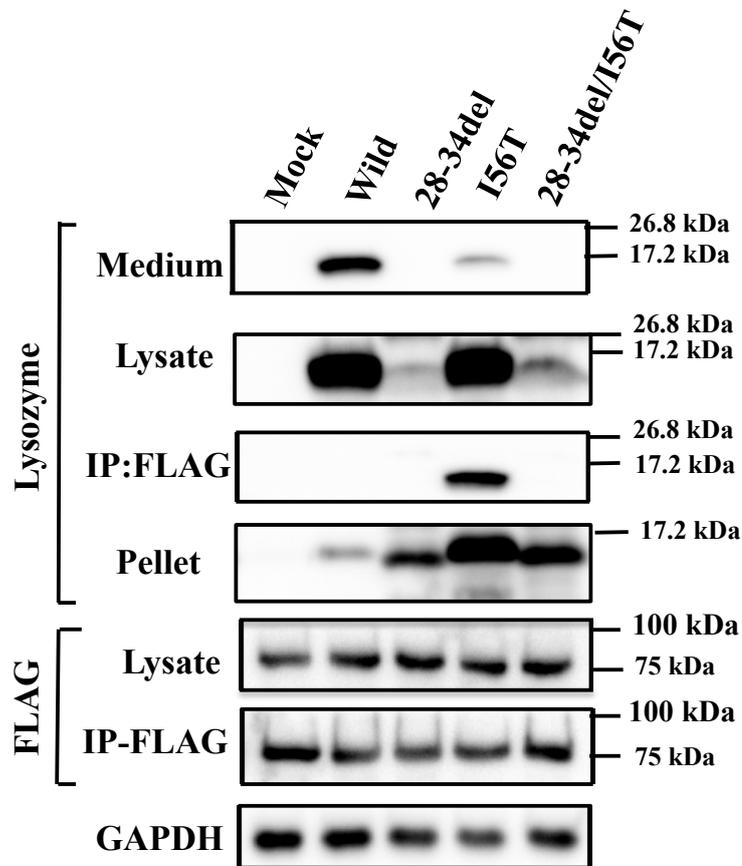
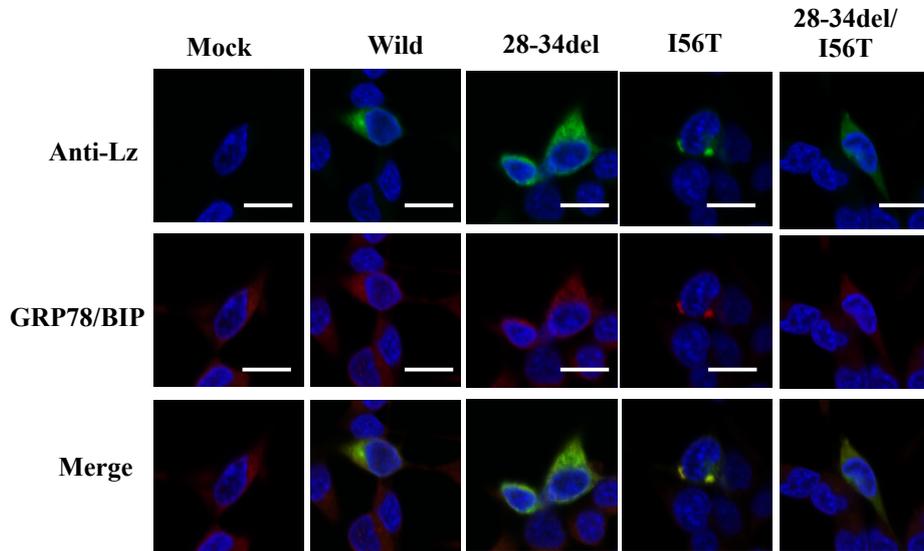
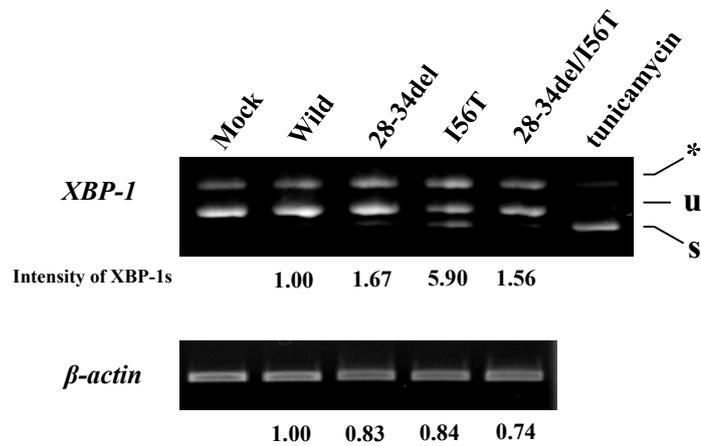


Figure.14A

野生型および I56T 変異体における、28-34 欠損体の GRP78/BiP との相互作用。A : FLAG-GRP78/BiP と 28-34 欠損体を共発現させ、Fig.11 と同様の方法で免疫沈降を行った。トップパネルは培地上清、セカンドパネルはライセイト画分、サードパネルは抗 FLAG 抗体で免疫沈降した画分、フォースパネルはペレット画分、以上の 4 つはヒトリゾチームを検出した。フィフスパネルとシックスパネルはライセイトと免疫沈降画分の FLAG-GRP78/BiP を検出した。ボトムパネルは内在性コントロールの GAPDH (ライセイト画分)。

B**C****Figure.14B, C**

野生型および I56T 変異体における、28-34 欠損体の GRP78/BiP との相互作用。B : ヒトリゾチームと GRP78/BiP の局在。トランスフェクション後 72 時間の細胞を固定し、Fig.7B と同様の方法で染色・観察を行った。トップパネルはヒトリゾチーム（緑）、ミドルパネルは GRP78/BiP（赤）、ボトムパネルは重ね合わせの画像。スケールは、20 μ m。C : RT-PCR による *XBP-1* のスプライシングの解析。方法は、Fig.10A と同様の方法で行った。パネル下の数値は、*XBP-1s* のバンド強度を数値化したもの（野生型を 1.00 とした）。内在性コントロールには、 β -actin を用いた。

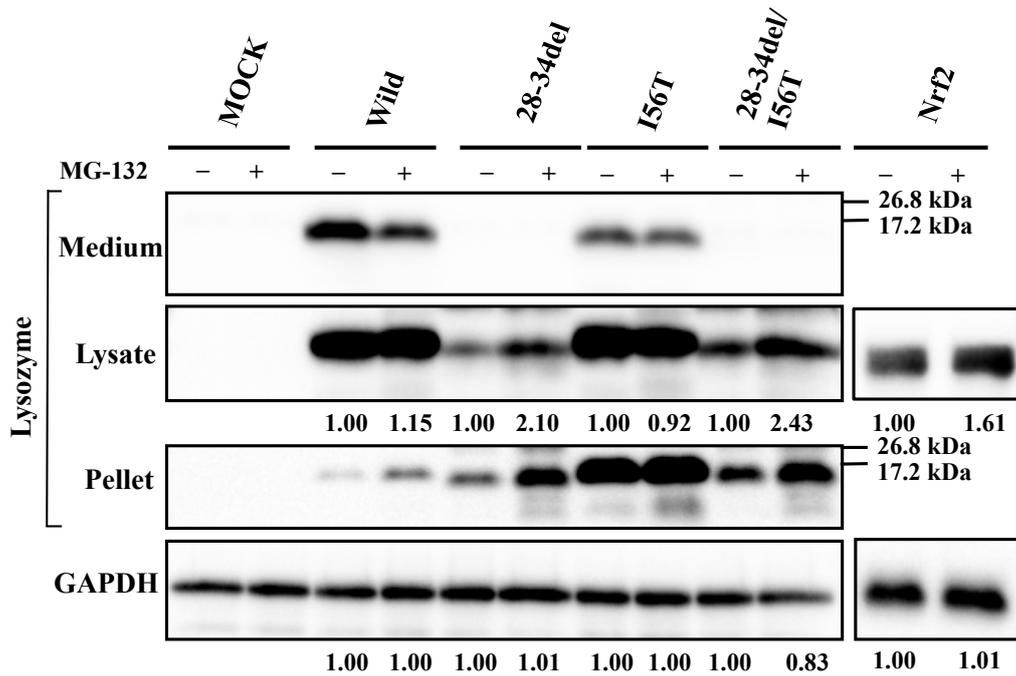


Figure.15

野生型および I56T 変異体における、28-34欠損体の MG-132 処理によるタンパク質量の変化。トランスフェクション 24 時間後、プロテアソーム阻害剤 MG-132 で処理し、各画分中のタンパク質量の変化をウェスタンブロットで検出した。パネル下の数値は、それぞれの未処理区の強度を 1.00 とし、相対値を算出した。MG-132 処理で Nrf-2 のバンド強度が上昇していたため、プロテアソーム阻害は引き起こされている。

A

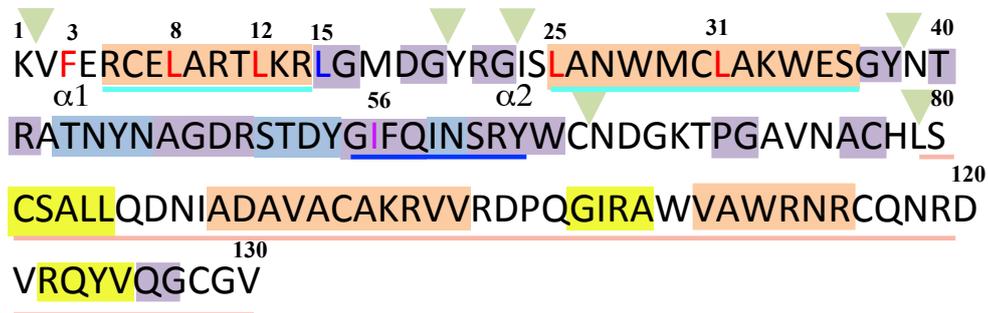
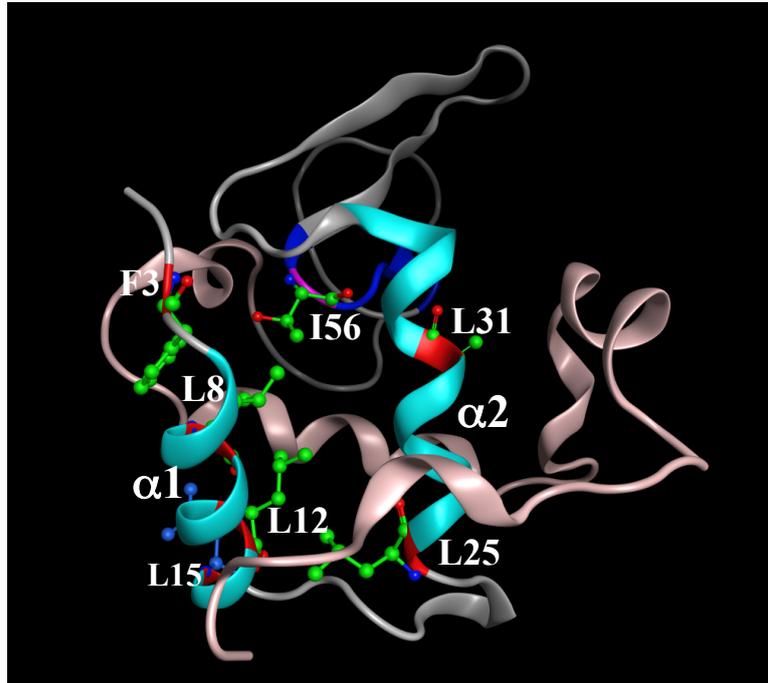


Figure.16A

ヒトリゾチームの $\alpha 1$ -および $\alpha 2$ -helix 存在する疎水性アミノ酸への変異導入。A：今回導入した変異箇所（F3、L8、L12、L15、L25、L31）を3Dダイアグラム（トップ）と、配列（ボトム）でともに赤色で示した。I56はマゼンタ色で示した。 $\alpha 1$ -および $\alpha 2$ -helix（それぞれヒトリゾチームの5-14残基と25-34残基）は、シアン色で示した（配列の方はアンダーライン）。肌色は、C末端の配列（80-130残基）を示している。アミロイド線維形成のコア領域（55-63残基）を青色で示した。配列の方の色掛けは、二次構造を示している。ライトブラウンは α -ヘリックス、黄色は β 310ヘリックス、ライトパープルはターン、灰色は β ストランド、緑色の三角形は β ブリッジをそれぞれ示している。

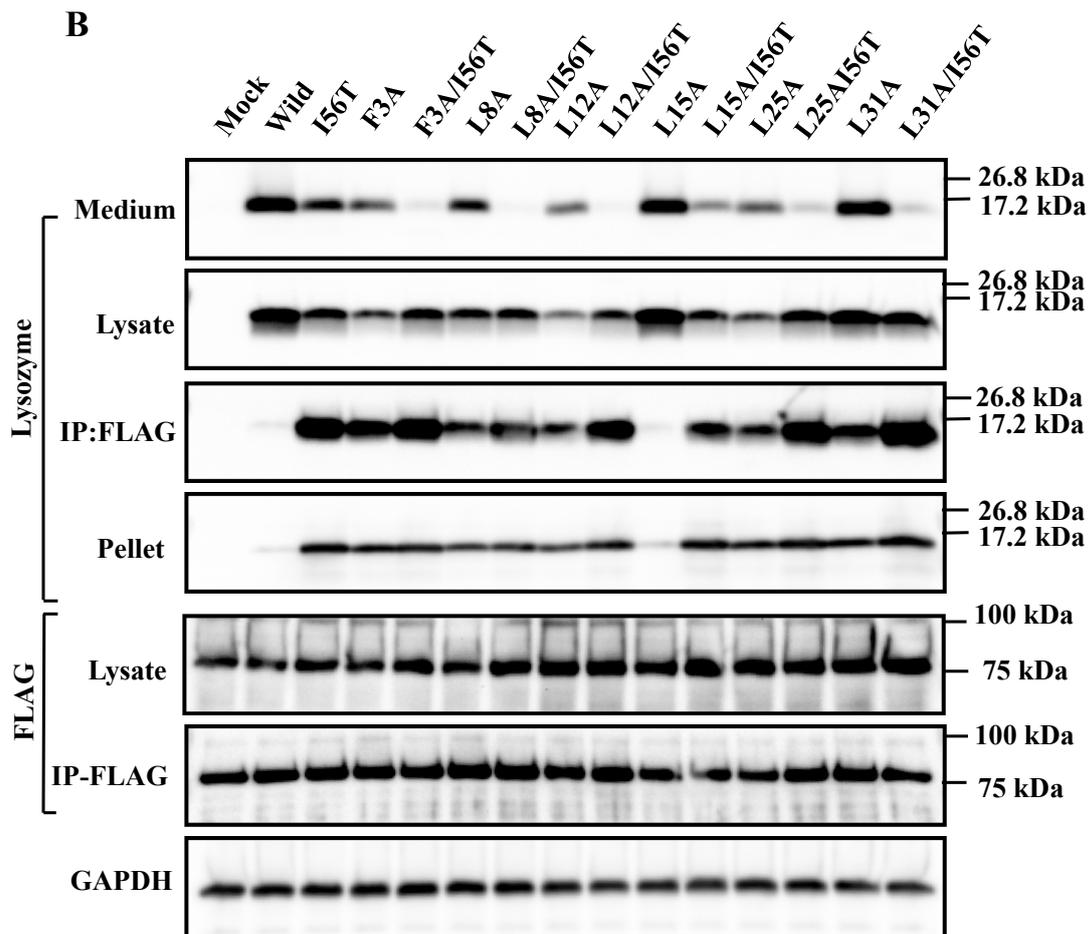


Figure.16B

ヒトリゾチームの $\alpha 1$ -ヘリックスおよび $\alpha 2$ -ヘリックスに存在する疎水性アミノ酸への変異導入。B: アラニン置換による GRP78/BiP との相互作用解析。上記の疎水性アミノ酸 (F3、L8、L12、L15、L25、L31) それぞれをアラニンに置換したヒトリゾチーム変異体と FLAG-GRP78/BiP を共発現させ、Fig.11 と同様の方法で免疫沈降を行った。変異導入は野生型および I56T をベースに行った (F3A、F3A/I56T 等)。上の 4 つのパネルは各画分について抗ヒトリゾチーム抗体でヒトリゾチームを検出したもの。フィフスパネルとシックスパネルはライセイト画分・ペレット画分の FLAG-GRP78/BiP を検出したもの。内在性コントロールは GAPDH を用いた。

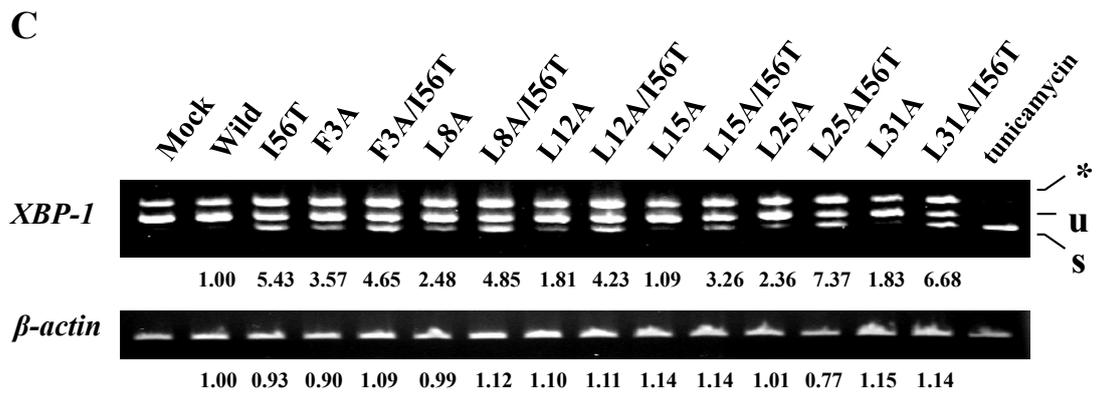


Figure.16C

ヒトリゾチームの $\alpha 1$ -ヘリックスおよび $\alpha 2$ -ヘリックスに存在する疎水性アミノ酸への変異導入。C: RT-PCRによる*XBP-1*のスプライシングの解析。方法は、Fig.10Aと同様の方法で行った。Fig.16Bで作製した変異体について、トランスフェクション後72時間のトータルRNAを抽出し、逆転写後PCRの鋳型に用いた。パネル下の数値は、*XBP-1s*のバンド強度を数値化したもの(野生型を1.00とした)。

A

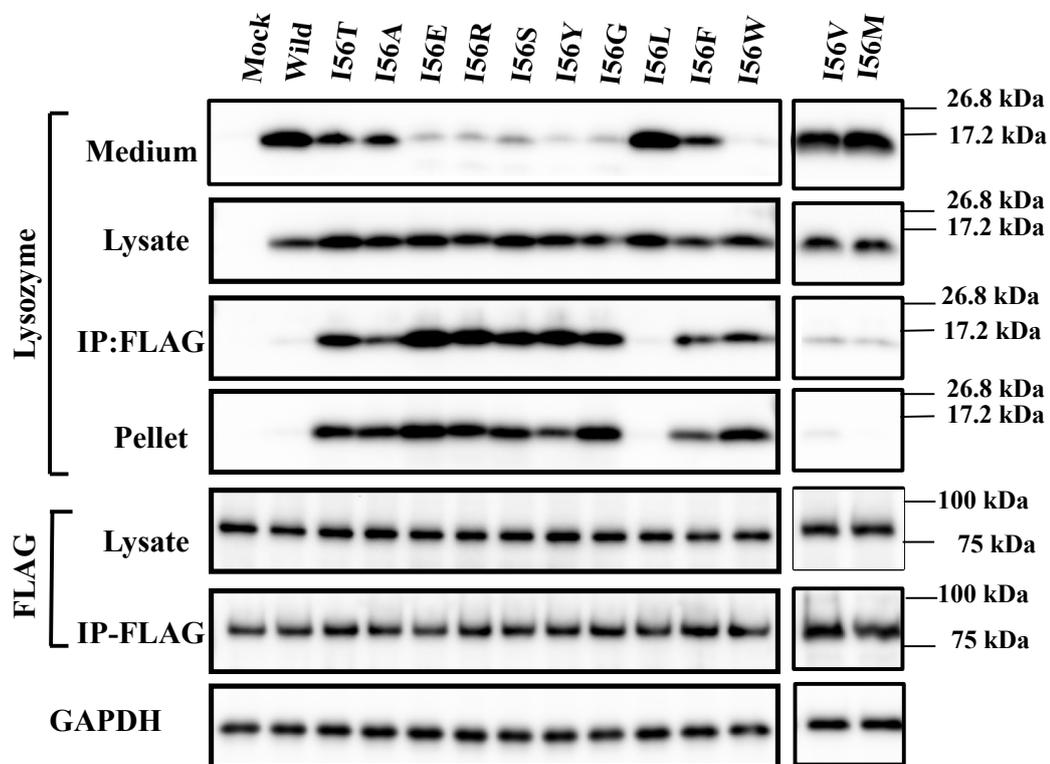


Figure.17A

I56 変異体の GRP78/BiP との相互作用解析。A : 56 番目のイソロイシンを別のアミノ酸に置換した変異体と FLAG-GRP78/BiP を共発現させ、Fig.11 と同様の方法で免疫沈降を行った。上の 4 つのパネルは、各画分に含まれるヒトリゾチームについて、ウェスタンブロットで検出した。フィフスパネルとシックスパネルは、免疫沈降に用いたライセイト (Lysate) と免疫沈降画分 (IP-FLAG) に含まれる FLAG-GRP78/BiP をそれぞれ検出した。内在性コントロールには GAPDH を用いた。

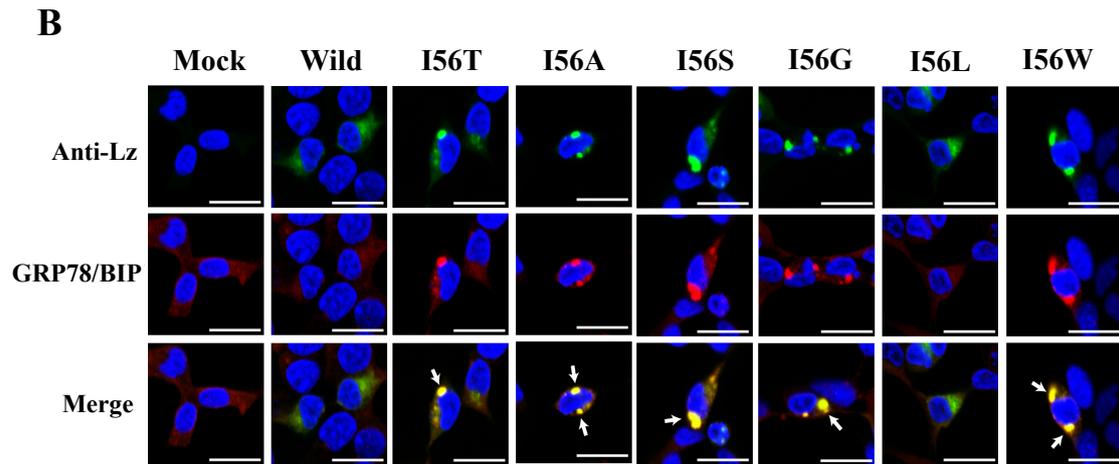


Figure.17B

I56 変異体の GRP78/BiP との相互作用解析。B : I56 の各変異体について、GRP78/BiP とヒトリゾチーム局在を解析。トランスフェクション後 72 時間の細胞を固定し、Fig.7B と同様の方法で染色・観察を行った。トップパネルはヒトリゾチーム (緑)、ミドルパネルは GRP78/BiP (赤)、ボトムパネルは重ね合わせの画像。スケールは、20 μ m。

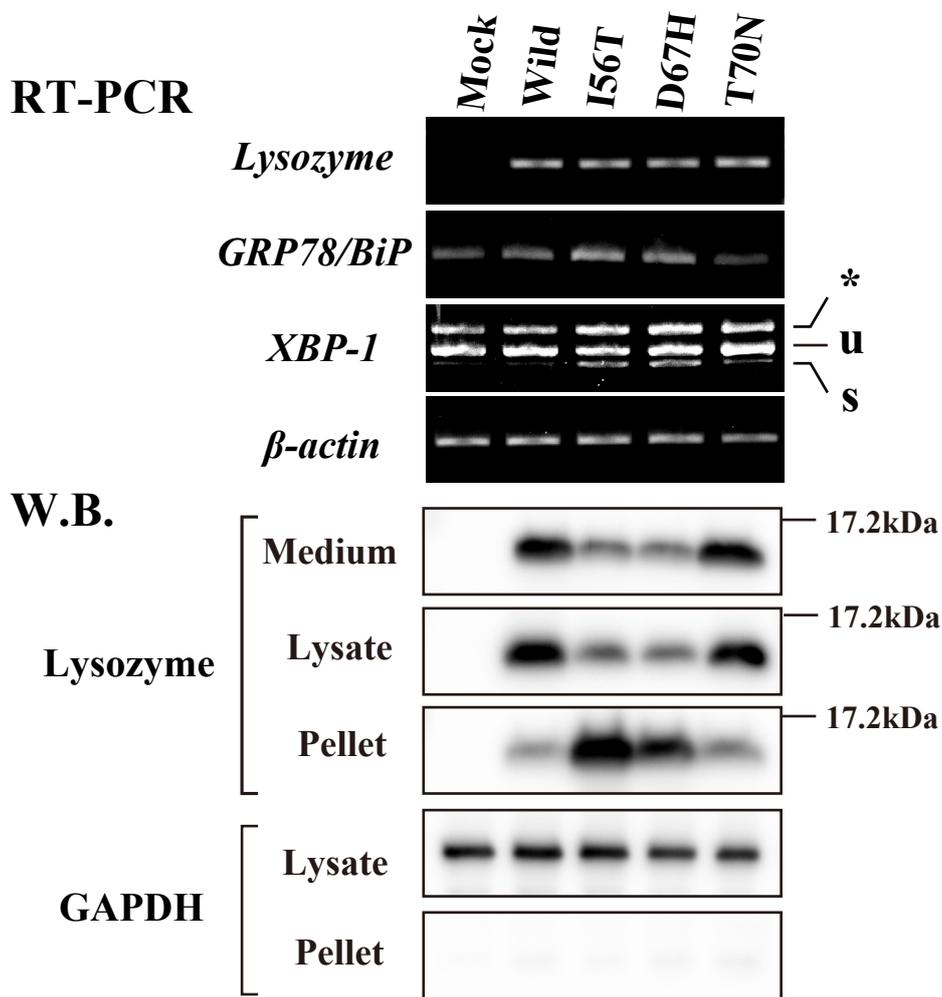


Figure.18

トランスフェクション後 72 時間のヒトリゾチーム変異体 (T70N) の発現。Fig.2A のウェスタンブロットと Fig.10A の RT-PCR と同様の方法で解析した。T70N はアミロイドーシスを引き起こさない変異体であり、野生型ヒトリゾチームとほぼ同様の傾向を示している。

謝辞

本研究を遂行し、本研究論文を執筆するにあたり、全構成にわたりご懇意なるご指導、ご鞭撻を賜りました鹿児島大学大学院連合農学研究科 応用生命科学専攻 先端応用生命科学講座 杉元 康志 教授に深甚なる感謝の意を表します。

本研究を遂行するにあたり、技術指導ならび様々のご助言を賜りました九州大学大学院 農学研究院 昆虫ゲノム科学研究分野 日下部 宜宏 教授に心よりお礼申し上げます。

本研究を通して、有益なるご助言や議論、ご協力を賜りました鹿児島大学農学部の諸先生方および、先端バイオテクノロジー研究室専攻生の皆様に深く感謝申し上げます。

最後に、学位を取得するにあたり、ここまで支援し応援してくれた父、母、協力してくれた兄、姉、友人たちに感謝いたします。本当にありがとうございました。