

No. 1

学力確認結果の要旨 連研第859	
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
実施年月日	平成28年 1月 9日
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。) <input checked="" type="radio"/> 口答 <input type="radio"/> 筆答	
<p>主査および副査は、平成28年1月9日の公開審査会において学位申請者に対して学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について諮問を行った。具体的には別紙のような質疑がなされ、いずれも満足できる回答を得ることが出来た。</p> <p>その結果、審査委員会は、申請者が大学院連合農学研究科博士課程修了者の学力および識見を有するもと認め、農学の分野に貢献する研究成果を提供したことにより、博士(農学)の学位を与えるに十分な資格を持つものと認めた。</p>	

学位申請者  
氏名

釜田 佳季

【質問1】 使用した細胞HEK293はリゾチームを発現してない細胞を使っているが、アミロイドーシスを起こす細胞は使わなかったのか？

【回答1】 強制的に大量発現させることにより細胞毒性を観察することが目的であったため、発現しない細胞の方が明確に違いが出ると予想したからである。また、アミロイドジェニックリゾチームは全身性アミロイド病なので多くの細胞で発現しており、今回使った細胞はヒトの胚由来の腎細胞であり、アダルト細胞では発現してくると推定される。

【質問2】 小胞体ストレスではIRE1経路のみが亢進している結果だが、他のUPRは何故、活性化していないのか？

【回答2】 今回のリゾチーム変異体のフォールディング機構において小胞体シャペロンGRP78/BiPとの会合したままであることから、恐らく、GRP78/BiPが不足する事態となってGRP78/BiPを増強しなくてはならない。そのため、もっともGRP78/BiPを増強できるIRE1-XBP1-GRP78/BiPの経路が動いたものと推定される。PERKのような翻訳停止は導入したベクターのプロモーターが強いので、制御出来ないと思われる。実際、RNAiで翻訳を抑制すれば小胞体ストレスは緩和した。

【質問3】 その場合、小胞体ストレスの時間的な経緯は調べたのか？ 今回の実験ではあまり細胞死などに変化は見られないとのことだが、長期間培養ではもっと毒性を観察できるのではないか？

【回答3】 今回使った試料は72時間培養のものを用いた。小胞体ストレスと細胞傷害に関してはタイムコースを取っていない。72時間以上の培養になると細胞がコンフルエント状態が継続し、それによる影響が出来てきて正確なデータが得られないと思われる。また、ステーブル細胞の作製もしたが、解析は進んでいない。

【質問4】 アミロイドジェニック変異体は何故、分泌されなくなるのか？ また、変異がアミロイドーシスに関係しているのか？

【回答4】 分泌が極端に低下しているのはまずはフォールディングされたものが少ないのが理由にあげられる。フォールディングに直接関与するGRP78/BiPは変異体と結合したままとなっており、この状態では分泌までは到底至らない。それらが凝集体となり、小胞体内に蓄積することから分泌は不可能となっている。ある特定の変異がアミロイドーシスの原因となっているのは明らかであり、アミロイドーシスにならない変異もあるが、今回用いた変異には実際患者がいる。

【質問5】 免疫染色でリゾチームが発現しているものとしてないものがあるが？

【回答5】 トランスフェクション効率が20~30%なので、導入できなかった細胞は染色され

てないを考える。先に述べたようにステーブル細胞の場合はほぼ染色される。

【質問6】リゾチームの変異体が原因でアミロイドーシスとなる患者は40～50代に発症する  
場合が多いが、何故だろうか？

【回答6】リゾチーム変異体でも生物機能は維持しており、分泌されれば免疫作用を示している。  
しかし、若い時は分子シャペロンが正常に働き、フォールディングされ、分泌も多いと思われる  
が、年齢を重ねると細胞の働きが衰え、フォールディング機能も低下するため40～50代で発症  
するのではないかと考える。

【質問7】細胞において凝集体が蓄積することのメリットはあるのか？例えば凝集体がウイルス  
感染の予防になっている？

【回答7】それについては明確な回答を持ってないが、細胞にとって不必要なタンパク質が大量  
に生じた場合、分解が追いつかず、細胞内に蓄積することで細胞へのダメージを軽減している  
のかもしれない。また、そのような凝集体はオートファージで分解されれば、アミノ酸源になる。  
また、凝集体がウイルス感染の予防になっているかの質問には何とも言えない。ウイルスが小胞体  
を利用して分泌タンパク質を合成するときに阻害作用を示すかもしれない。

【質問8】小胞体分子シャペロンGRP78/BiPは分子種としては1種類か？

【回答8】ヒトにおいては1種類である。

【質問9】野生型と変異体はアミノ酸が1箇所変異しているにすぎないが、何故、フォールディ  
ングに失敗して小胞体内に蓄積するのか？

【回答9】これまでのタンパク構造解析の結果、野生型もアミロイドジェニックリゾチームの構  
造にはほとんど差がない。変異はアミロイド線維形成コア領域周辺に限られており、この領域の  
フォールディングの際、GRP78/BiPとの相互作用に問題が生じ、結合したまま解離することなく、  
この複合体が凝集すると思われる。

【質問10】I56Tのフォールディング速度をin vitroの実験で調べた結果では野生型とその速度  
は変わらないとされている。何故、GRP78/BiPにトラップされるのか？

【回答10】GRP78/BiPとの相互作用は結晶解析で明らかになった構造では理解できない。野生  
型と変異体のフォールディング過程での相互作用であり、天然変性中間体に違いがあるのではな  
いのかと思われる。例えば、フォールディング終了後にはすぐさまGRP78/BiPは解離するが、変  
異体の場合、解離速度が遅く、コア領域のフォールディングが終わらないまま分子が閉じてしま  
うのかもしれない

【質問11】本実験で使った細胞でアミロイド線維は出来ているのか？

【回答11】アミロイド線維は確認していない。ただ、アミロイド線維の検出に使うThioflavin  
Sには変異体はポジティブであり、野生型は染色されない。そこがもっとも重要な点で病気の患

者にはアミロイド線維が認められることから細胞レベルで再現ができると大きなインパクトになると考えられる。

【質問 1 2】 この病気のアミロイド線維は細胞の中か、外か？

【回答 1 2】 細胞内に蓄積したものがアミロイド線維となるのか、分泌されたものが線維化するのか、あるいは細胞死により分解されずに残った凝集体が線維化するのかまだ、解っていない。他の病気のアミロイド線維の蓄積を見ても様々な蓄積パターンがあるので、リゾチームも詳しく調べて見る必要がある。

【質問 1 3】 この細胞-小胞体ストレス系は食品などのアミロイド線維予防剤のスクリーニングに使えると思うが？

【回答 1 3】 その可能性は十分あると考える。これまで小胞体ストレスによる細胞研究は異常タンパク質発生のときの品質管理が中心で、小胞体ストレス機構の研究が主で、ストレス緩和剤の開発などの観点では研究は行われて来なかった。実際、異常なタンパク質の細胞内蓄積させ、小胞体ストレスを引き起こさせるこの系はストレス緩和剤あるいはアミロイド線維形成阻止剤の開発に利用できると強く思われる。