

## 審査の結果の要旨

氏名 原 英之

本研究は、プリオン伝播現象における「種の壁」の分子機構解明を目指し、*S. cerevisiae*由来のSup35を中心に用い「種の壁」を規定している部位、及びその反応機構を、遺伝学的・生化学的手法による解析から解明することを試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 分子遺伝学的手法により、プリオン伝播における「種の壁」を規定しているドメインの探索を行った。タンパク質因子の機能ドメインを同定する手段として、分子遺伝学的手法は極めて効率が良い。そこで、*S. cerevisiae*と*K. lactis*のSup35を用いて、各ドメイン同士を交換したキメラ体を作製し、プリオン伝播の評価を行った。この際に、全長 685 残基からなる Sup35 のドメイン分けについては、従来の Nドメイン(1-123 残基)、Mドメイン(124-253 残基)、それから Cドメイン(254-685 残基)といった分け方を採用しなかった。その理由は、構成するアミノ酸に違いはあるが、近縁異種酵母においてリピート配列が保存されていることから、従来の Nドメインを、グルタミンが豊富な NQドメイン(1-41 残基)、それからリピート配列を有する NRドメイン(42-123 残基)に、さらに分割できると考えたからである。また、プリオン伝播を評価する系として、プラスミドシャッフリング法を用いた評価系を確立した。この手法は、2 つ以上のプラスミド(キメラ体)を選択培地により、確実に取捨選択することができ、プリオン伝播評価系としては最適である。ここでは、キメラ体を用いた探索から、「種の壁」必須ドメインとして NQ ドメインを同定することができ、これまでほとんど具体的な知見が得られていなかった、「種の壁」を超えたプリオン伝播の分子機構に関する知見が得られた。
2. 同定した NQ ドメインの「種の壁」を超えたプリオン伝播における役割を明確にした。ここでは、中屋敷らの提唱した準プリオン状態(Nakayashiki *et al.*, 2001)に注目して、プリオン伝播の分子機構の解明に取り組んだ。本研究では、この準プリオン状態が、プリオン伝播を完了するまでの一つの過程であると考え、Sup35 同士の細胞内での相互作用の解明を試みた。その結果、NQ ドメイン同士の相互作用が、予想

通り存在することが明らかになった。また、驚くべきことに、NR ドメイン同士の相互作用も、前者の相互作用ほど安定ではないが、存在することも明らかになった。このことは、準プリオン状態つまり共凝集状態が、NR ドメイン同士という弱い相互作用でも成立するが、プリオン伝播を可能にするには、「種の壁」を規定している NQ ドメイン同士の相互作用、及びプリオンの安定性に寄与している NR ドメイン同士の相互作用が共に必要であることを示している。

3. NQ ドメインの Sup35 分子内における位置、及び構成アミノ酸が種の特異性に及ぼす影響について評価した。ここでは、まず、NQ ドメインが N 末端に存在することに注目し、NQ ドメインを N 末端及びそれ以外の部位においた場合のプリオン伝播について検討した。その結果、NQ ドメインは、N 末端に存在しないと、プリオン伝播が起こらないことが明らかとなった。次に、NQ ドメインを構成するアミノ酸のうちで、芳香族アミノ酸としてのチロシンに注目し、この部位に変異を導入した。ここで作製した変異体を用いてプリオン伝播について検討したところ、プリオン伝播における種の特異性においては、チロシンの芳香族アミノ酸としての性質が、重要な役割を果たしていることが明らかになった。

以上、本論文はプリオン伝播において *S. cerevisiae* の NQ ドメイン、中でもチロシンの芳香族アミノ酸としての重要性が明らかとなり、種の特異性を認識するアミノ酸の手がかりが得られた。また、プリオン伝播において、NQ ドメインが種の特異性を決定しており、NR ドメインはプリオンの維持に関与しているという機構を明らかにした。本研究の成果は「種の壁」を規定しているドメインのみならず、アミノ酸までも同定したことから、プリオン伝播における「種の壁」の分子機構の理解を深める上で重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。