

論文審査の結果の要旨

論文提出者氏名 大間 陽子

本論文は、20 種類のホモポリアミノ酸領域を、細胞内局在・細胞毒性・相互作用という 3 つの観点から網羅的に比較解析したものである。これまで、タンパク質中のホモポリアミノ酸領域に関しては、それらの伸長による疾患が知られているポリグルタミン・ポリアラニンに関する研究が多く、20 種類すべてのホモポリアミノ酸を同一の系で解析した研究は、皆無であったため、数多くの新規的で興味深い知見が得られた。

まず、細胞内局在は、各ホモポリアミノ酸領域（約 30 残基）を YFP の融合タンパク質として培養細胞で発現させた。その結果、それぞれ特徴的な細胞内局在を示し、多様なホモポリアミノ酸の性質の多様さが示唆された。塩基性アミノ酸であるポリアルギニン、ポリリシンはともに、細胞質に局在すると同時に 2~3 個の核内凝集体を形成した。ポリシステイン、ポリチロシンは核に比較的強く局在し、どちらも凝集体を持たないものの方が多かったものの、ポリシステインは細胞質に、ポリチロシンは細胞質や核に凝集体を持つという特徴が見られた。ポリアラニン、ポリスレオニン、ポリヒスチジン、ポリトリプトファン、ポリメチオニン、ポリバリン、ポリイソロイシン、ポリフェニルアラニン、ポリロイシンの 9 種は、いずれも核外のみで局在したが、このうち、ポリアラニンとポリスレオニンは凝集体を形成しなかったが、その他の 7 種はいずれも凝集体を形成した。特に、ポリロイシン、ポリフェニルアラニン、ポリイソロイシン、ポリバリンの 4 種は、核周辺部に大きな凝集体が観察された。また、それらのホモポリアミノ酸は、ウエスタンブロットによる免疫染色においても、予想分子量よりも高度に高分子量化した染色パターンが得られ、疎水性の高いホモポリアミノ酸ほど、細胞内で高度に凝集することが明らかとなった。

次に、それら 20 種類のホモポリアミノ酸を細胞内で発現させた際の細胞毒性を、トリパンブルー染色法による生存率測定や、アポトーシスの指標であるカスパーゼ 3 の蛍光基質 (Ac-DEVD-MCA) の切断による活性測定によって行った。その結果、生存率測定においては、ポリイソロイシン発現時の生存率が一番低く、ポリシステイン、ポリバリン、ポリフェニルアラニンの順となった。また、カスパーゼアッセイでは、ポリロイシン、ポリバリン、ポリイソロイシン、ポリシステインの順に、高いカスパーゼ 3 活性が認められた。これらのホモポリアミノ酸は、いずれも細胞内で凝集体を形成し、また免疫染色においても高分子量化が見られていたホモポリアミノ酸である。アミノ酸の疎水度と、それがポリマーとなったホモポリアミノ酸の細胞毒性をプロットしてみると正の相関が見られ、疎水性の高いホモポリアミノ酸ほど高い細胞毒性を有することが明らかとなった。原因タンパク質の凝集、沈着による疾患は、ポリグルタミン病だけではなく、様々な神経変性疾患において

報告されている。タンパク質の凝集とその毒性の関係は、これらの多くの神経変性疾患の発症機構解明において注目されている問題である。本研究は 20 種のホモポリアミノ酸を発現させ、その疎水性の違いによる凝集体形成とそれに伴う細胞毒性の違いを明らかにしたものであり、以上の問題を初めて統一された系で明確に示したものである。また、ホモポリアミノ酸領域は様々なタンパク質中に存在するが、アミノ酸の種類によってその存在頻度が異なる。ヒトのタンパク質をデータベース検索してみると、本研究において高い細胞毒性を示したホモポリアミノ酸の数が少ない。この希少さの要因の一つが、ホモポリマーとなった時の細胞毒性であるという可能性が本研究によって示唆された。

最後に、約 30 残基の各ホモポリアミノ酸領域（約 30 残基）同士の相互作用を酵母 2 ハイブリッド法によって解析した。その結果、ポリイソロイシン、ポリロイシン、ポリフェニルアラニンなど、培養細胞内で凝集体を形成する種類のホモポリアミノ酸同士において強い相互作用が見られ、ホモポリアミノ酸領域同士の自己凝集が凝集体形成の核となっている可能性が示された。また、ポリイソロイシンとポリロイシン、ポリロイシンとポリバリンなど、凝集を起こしやすい幾つかの異種の疎水性ホモポリアミノ酸の間においても相互作用が見られたことから、凝集体の形成には疎水性相互作用自体も大きく関与していることが明らかとなった。また、ポリアラニン（29 残基）同士においての比較的強い相互作用が見られたので、さらにいくつかの長さ（6、18、29 残基）で試してみたところ、ポリアラニンの長さ依存的な相互作用が見られた。18 残基同士では相互作用は見られなかった一方で、29 残基と 18 残基の間では相互作用が見られたことから、一定の長さを超えた（生理的に存在しない長さの）ポリアラニン鎖がそれ以下の（生理的に存在する）長さのポリアラニン鎖と異常な相互作用を引き起こす可能性が示唆された。また、ネイティブ PAGE の結果より、ポリアラニン 30 残基は、23 残基以下のポリアラニンと比較して異なる立体構造をとっている可能性が示唆された。

本論文は、20 種類それぞれのホモポリアミノ酸領域がもつ特徴的な性質を明らかにするだけでなく、ホモポリアミノ酸の細胞毒性がタンパク質の進化に影響を与えた可能性や、既に報告のあるポリグルタミンやポリアラニンに関しても新たな洞察を生むものとして、大変意義のあるものである。したがって、本審査委員会は博士（学術）の学位を授与するにふさわしいものと認定する。