

論文審査の結果の要旨

氏名 志田明里

温度変化や酸化, 浸透圧変化, 化学物質の曝露など様々なストレスにさらされることにより細胞タンパク質は変性や凝集を引き起こし, 細胞はその正常な働きを失う. タンパク質の凝集を防ぐうえで, シャペロンによるタンパク質フォールディングの制御が重要となる. 一方, 本来の機能を失ったタンパク質を含む細胞はしばしば有害な作用を及ぼすため, このような細胞を消去する機構であるアポトーシスは生体内で大きな役割を果たしている. このため, シャペロンの活性やアポトーシス能の変化はガンや神経変性疾患, 自己免疫疾患など, 多くの疾患の病因であると考えられる.

BAG タンパク質は主要なシャペロンである Hsp70 に相互作用して ATP/ADP 交換反応を促進することによりシャペロン活性を調節しており, この機能は BAG ドメインのみで発揮されることが明らかになっている. しかし, BAG タンパク質は Bcl-2 の結合因子として同定されたにもかかわらず, アポトーシスの抑制における BAG ドメイン単独での機能発現や Bcl-2 との相互作用に関しては明らかにされていない.

論文提出者は, 脳, 心臓, 骨格筋, 内分泌系などの幅広い臓器で発現が確認されている BAG3 タンパク質に着目し, BAG ファミリーとしての最小構成単位である BAG ドメイン単独の相互作用や機能発現機構の解明に取り組んだ.

本論文は序章を含めた 4 章からなる. 序章は本研究の背景と目的について述べられている. 第 1 章では, BAG3 の Bcl-2 との結合やアポトーシス抑制能が BAG ドメインのみでも再現可能であるのかを検証するとともに, Bcl-2 との相互作用残基の同定をタンパク質立体構造の観点から行った. 論文提出者は, まず, BAG ドメイン (BAG3-BD) が単独でアポトーシス抑制能を有することや, *in vitro* において Bcl-2 と結合することを確認した. 次に, Bcl-2 との相互作用部位の同定のために BAG3-BD の変異体解析をおこなった. 結合能の低下が認められた変異体の変異導入残基を立体構造上にプロットし, BAG3-BD の Bcl-2 との相互作用面を観察した結果, BAG ドメインと Hsp70 との相互作用面と重なりが見られた. つまり, BAG ドメインは Bcl-2 もしくは Hsp70 のいずれかのタンパク質との二者複合体のみを形成し, それぞれのタンパク質との相互作用が独立して生じることに意義があると予想された.

第 2 章では, Hsp70 のヌクレオチド結合ドメイン (NBD) の本質的な構造変化を通じてシャペロン活性調節における BAG の役割の理解を深めるため, ヌクレオチド非含有型 NBD の立体構造を新たに決定し, 構造学的な考察を行った. 論文提出者は, これまでに報告されていた NBD タンパク質の精製法を改良することによりヌクレオチド非含有状態の NBD を単離することに成功し, ヌクレオチド非含有型 NBD ならびに,

AMPPNP との複合体構造を新たに決定した。これまでに、BAG1 の BAG ドメインとの複合体や Hsp70 の基質結合ドメイン (SBD) を含むヌクレオチド非含有型 NBD の構造が報告されており、これらの構造中ではヌクレオチド結合ポケットは大きく開いていた (open form)。しかし、新たに決定したヌクレオチド非含有型 NBD の構造は AMPPNP 結合型 NBD のような結合ポケットが閉じた構造 (closed form) であった。open form と closed form の NBD の構造比較により、closed form は構造の中心部に位置するアミノ酸間の相互作用により維持されていること、open form ではこの相互作用が消失するとともに、開いた状態を安定化するための新たな相互作用が生じていることが明らかとなった。このことは、ヌクレオチド非含有型の NBD が open form と closed form の平衡状態にあり、BAG ドメインの結合は NBD を open form を安定化するために重要であることを示している。

第3章では、本研究で得られた知見に基づき、BAG3 が Hsp70 および Bcl-2 と相互作用することによりアポトーシスの調節が確実におこなわれるメカニズム、ならびに、BAG3 の創薬ターゲットとしての可能性に関して議論されている。

なお、本論文第2章は、東京大学の横山茂之教授、菅野純夫教授、石井亮平博士 (現・コーネル大学)、荒川晶彦氏、理化学研究所の白水美香子博士、田仲昭子博士、終元睦子博士、岸下誠一郎博士 (現・ノボザイムズジャパン株式会社)、高木哲雄博士 (現・日清オイリオグループ株式会社) との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析及び検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士 (理学) の学位を授与できると認める。