

論文 / 著書情報  
Article / Book Information

題目(和文)	出芽酵母の脱凝集シャペロンHsp104と基質タンパク質の相互作用機序の解明
Title(English)	
著者(和文)	奥田桃子
Author(English)	Momoko Okuda
出典(和文)	学位:博士(工学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第9813号, 授与年月日:2015年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:田口 英樹,大谷 弘之,櫻井 実,上野 隆史,近藤 科江
Citation(English)	Degree:., Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第9813号, Conferred date:2015/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	審査の要旨
Type(English)	Exam Summary

## 論文審査の要旨及び審査員

報告番号	甲第	号	学位申請者氏名	奥田 桃子		
論文審査 審査員		氏名	職名		氏名	職名
	主査	田口 英樹	教授	審査員	大谷 弘之	准教授
	審査員	上野 隆史	教授			
		近藤 科江	教授			
櫻井 実		教授				

## 論文審査の要旨 (2000 字程度)

本論文は「出芽酵母の脱凝集シャペロン Hsp104 と基質タンパク質の相互作用機序の解明」と題し、5 章から構成されている。

第 1 章「序論」では、タンパク質のフォールディングと凝集形成についての概説に続き、出芽酵母の脱凝集シャペロン Hsp104 は Hsp70/40 (Ssa1/Ydj1) と協同して脱凝集を行なうことと Hsp104 の構造について述べている。これまで行なわれてきた Hsp104 に関する研究に対しての課題を明示し、本研究の目的を述べている。

第 2 章「ポリグルタミンにプリオン伝播性を付与するペプチドと Hsp104 の相互作用」では、当研究室にてスクリーニングしたペプチドと Hsp104 の直接的な相互作用を生化学的手法によって解析した結果について述べている。出芽酵母内でアミロイドを形成するポリグルタミンにプリオニックな伝播性を付与するペプチド (プリオン化ペプチド)、およびプリオン化ペプチドの疎水性アミノ酸をセリン、トレオニン、アラニンに置換した変異ペプチドの相互作用をゲルろ過によって検出している。さらに、この相互作用を定量的に評価するために蛍光相関分光法 (FCS) を用いて測定し、解離定数を算出したところ、プリオン化ペプチドは Hsp104 と強い親和性を、変異ペプチドは弱い親和性を示したことを示している。これらの結果より、Hsp104 は疎水性アミノ酸と強い親和性を示すと述べている。

第 3 章「凝集体のサイズ分布を評価する実験系の構築」では、生化学的に扱いが困難とされている凝集体のサイズ分布を評価する実験系を構築し、Hsp104/Ssa1/Ydj1 が行なう脱凝集反応における凝集体のサイズ変化を解析した結果について述べている。Hsp104 のモデル基質であるルシフェラーゼ凝集体を蛍光標識し、斜光照明蛍光顕微鏡 (HILO) で観察することにより、凝集体を 1 粒子レベルで解析する実験系を構築したことを述べている。また、各シャペロン存在下におけるルシフェラーゼ凝集体を HILO で観察することにより、ルシフェラーゼ凝集体のサイズ分布を明らかにしている。さらに、HILO を用いた観察で見分けることのできなかつたルシフェラーゼ凝集体のサイズ分布については、FCS を用いて経時的に測定したことにより、その差を明らかにしたことを述べている。このように、複数の手法を用いて凝集体のサイズを特徴づけ、Hsp104/Ssa1/Ydj1 が行なう脱凝集反応における凝集体のサイズ分布を明らかにしたことを述べている。

第 4 章「1 分子蛍光イメージングを用いた Hsp104 と凝集体の結合・解離観察」では、Hsp104 とルシフェラーゼ凝集体の相互作用における Hsp104 の動態を 1 分子レベルで明らかにした結果を述べている。まず、Hsp104 とルシフェラーゼ凝集体の結合・解離を可視化する実験系の構築について述べている。スライドガラス上に biotin-neutravidin リンカーを介して蛍光色素 Cy5 で標識したルシフェラーゼを固定し、蛍光色素 Cy3 で標識した Hsp104 と ATP を添加して全反射蛍光顕微鏡で観察したところ、Cy5-ルシフェラーゼ凝集体の位置に Cy3-Hsp104 の輝点が明滅する様子が見られたことを示している。この結合・解離の頻度は、Ssa1/Ydj1 依存的に上昇したことを述べている。また、Hsp104 とルシフェラーゼ凝集体の結合時間を統計的に解析した結果、Ssa1/Ydj1 の有無に関わらず指数関数的に減少する 2 つの成分から成る、すなわち結合・解離の速い成分と遅い成分が存在することを明らかにしている。この 2 成分の割合は、Ssa1/Ydj1 の有無で異なり、Ssa1/Ydj1 存在下では結合・解離の遅い成分が増加したことを示している。さらに、この結合時間と Hsp104 の ATP 加水分解速度を比較したところ、Hsp104 は凝集体に対して“processive”に作用していることが示唆されたことを述べている。

第 5 章「総括」では、本研究の成果、その意義とともに今後の展望について述べている。

これを要するに、本研究で得られた Hsp104 と強い親和性を示すアミノ酸の傾向、基質である凝集体のサイズ変化、そして 1 分子レベルで明らかにした Hsp104 と凝集体の相互作用における Hsp104 の動態に関する知見は、工学上ならびに工業上貢献するところが大きい。よって、本論文は博士 (工学) の学位論文として十分な価値があるものと認められる。