

氏 名	おお の みち こ 太 野 路 子
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 1618 号
学位授与の日付	平 成 19 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研 究 科 ・ 専 攻	農 学 研 究 科 食 品 生 物 科 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	Studies on Role of the C-terminal Region of Mouse Heat Shock Protein 72 in Biological Defense Systems (生体防御におけるマウス熱ショックタンパク質72のC末端領域の役割に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 北 畠 直 文 教 授 吉 川 正 明 教 授 河 田 照 雄

論 文 内 容 の 要 旨

マウス熱ショックタンパク質72 (Heat shock protein 72:Hsp72) は、生物に普遍的に保存された熱ショックタンパク質 Hsp70 ファミリーに属する。Hsp72 分子は、熱をはじめとする種々のストレスによって細胞内に誘導される分子種であり、ストレスによって引き起こされるタンパク質の変性・凝集阻止を介助する分子シャペロンとして働いている。最近、Hsp70 分子には、分子シャペロンとしての機能の他に、細胞傷害性 T 細胞を効率的に誘導するアジュバントとしての機能が報告されてきた。また、細胞の壊死に伴い細胞外に漏出した Hsp70 分子がマクロファージや樹状細胞などの自然免疫細胞を活性化させることも見出されてきた。免疫細胞との相互作用を裏付ける事実として、免疫細胞上に、数種の Hsp 分子に対する受容体も同定されてきている。しかしながら、シャペロン機能や免疫機能といった生体防御機能にかかわる Hsp 分子の構造的特徴については未だ明らかではない。本論文では、誘導型のマウス Hsp72 分子において機能があまり解明されていない C 末端領域に着目し、この領域が、シャペロン機能や免疫細胞との相互作用に果たす役割について解析し、主に以下のことを明らかにした。

マウス Hsp72 分子は、N 末端側から、ヌクレオチド結合ドメイン、基質結合ドメインとそれに続く C 末端領域から構成されており、C 末端領域は 2 つの α -ヘリックスと一定の構造をとらないフレキシブルな尾部とから成っている。C 末端領域の機能について検討するために、全長のマウス Hsp72 と C 末端側を順次欠失させた変異体を大腸菌により作製した。C 末端領域の欠失が構築した変異体の構造に及ぼす影響を、遠紫外 CD スペクトルや Trp 蛍光スペクトルを測定して調べたところ、完全長の Hsp72 と欠失変異体との間に構造の大きな変化は観察されなかった。また、昇温に伴う 222 nm における円偏光二色性の変化を指標にタンパク質の熱安定性について調べたところ、熱変性温度には大きな差はなく、C 末端領域の欠失は Hsp72 の熱安定性にも大きな影響を与えないことを見出した。一方、それぞれの組換え体をゲルろ過に供し存在状態を解析したところ、完全長とフレキシブルな尾部を欠失した変異体はダイマーやオリゴマーとしても存在したが、 α -ヘリックスを欠失した変異体はモノマーでのみ存在した。また、基質への影響を検討すると、9 残基のアミノ酸からなる小さいペプチド基質は C 末端を欠失した変異体にも結合したが、分子サイズ 15 kDa の大きな基質の還元カルボキシ α -ラクトアルブミンは α -ヘリックスを欠失した変異体には結合しなかった。これらの結果から、マウス Hsp72 の C 末端領域は、オリゴマー形成ならびにサイズ依存的な基質結合を調節する機能をもつことを明らかにした。

第二に、免疫細胞との相互作用にかかわる Hsp72 の作用部位と結合特性について明らかにした。免疫細胞としてはマウスの株化細胞である P388D1 lymphoid neoplasm を用いた。ビオチン化した完全長の Hsp72 を P388D1 細胞と反応させたところ、Hsp72 は用量依存的かつ飽和的に細胞に結合した。この結合は、非標識の同リガンド存在下において減少したことから特異的な結合であり、細胞表面には Hsp72 を認識する受容体が存在することを示した。C 末端側を順次欠失させた変異体の結合を調べると、フレキシブルな尾部を欠失した変異体で結合能が大きく減少し、さらに α -ヘリックスを欠失させると結合能は消失した。しかし、Hsp72 の C 末端領域のみでは P388D1 細胞に結合せず、基質結合ドメインが細胞への

結合には必要であることを見出した。また、C末端のフレキシブルな尾部を欠失した変異体との拮抗実験から、P388D1細胞上には、少なくとも2種以上のHsp72に対する受容体が存在することを明らかにした。Hsp70ファミリーに属するタンパク質は生物種間で比較的良く保存されているものの、C末端領域の配列が種間で多様性に富んでいることを鑑みると、これらの結果は、Hsp72のC末端領域が自己・非自己の識別あるいは生物にとっての安全・危険を見極めるシグナルとして働く可能性を示唆するものである。

第三に、Hsp72は、通常ストレスによって誘導され、細胞質内に存在するが、細胞が異常の際、この異常を知らせるシグナルとして細胞の表面に提示される可能性について検討した。マウス肺癌由来LL/2細胞を非致死的な42°Cでの熱ストレスに曝すと、生細胞の表面においてもHsp72が提示されることを見出した。この際、若干の死細胞表面においてもHsp72の漏出が亢進することを明らかにした。そこで、異常な生細胞や死細胞に応答することが知られているナチュラルキラー細胞やマクロファージとHsp72分子との反応について解析した。その結果、完全長のHsp72はいずれの細胞とも結合したが、N末端のヌクレオチド結合ドメインのみから成る変異体は両者に結合しなかった。一方、Hsp72のC末端を欠失させるに従って、変異体と結合するナチュラルキラー細胞やマクロファージの割合が増加し、また、結合強度も増加することを明らかにした。これらの結果から、Hsp72は、ネクローシスなどの細胞死の場合だけでなく、非致死的なストレス条件下においても生細胞表面に特異的に発現し、自然免疫を司るナチュラルキラー細胞やマクロファージによって認識されるシグナルとして働くこと、さらに、C末端が切断されたHsp72の断片がより効果的なシグナルであることを明らかにした。

論文審査の結果の要旨

マウス熱ショックタンパク質72 (Heat shock protein 72: Hsp72) は、原核生物から真核生物に至るまで進化的に保存されたHsp70ファミリーに属するタンパク質であり、熱などのストレスによって細胞内に誘導され、変性タンパク質の凝集を阻止するなどの分子シャペロンとして重要な生理的機能を担っている。一方、本来、細胞内に局在するHspがストレス刺激などに伴い細胞外に提示されることによって、Hspが生体の異常を示す情報伝達因子として働いていることが示されている。しかしながら、生体防御におけるHspの構造的特性についてはほとんど明らかにされていない。本論文では、マウス誘導型Hsp72を用いて、機能の未だ明確でないC末端領域に着目し、シャペロン機能や免疫機能の生体防御に対するHsp72のC末端領域の役割について考察しており、成果として評価できる点は以下のとおりである。

(1) C末端領域の機能について検討するために、全長のマウスHsp72とC末端側を順次欠失させた変異体を大腸菌により作製し、組換え体の存在状態やC末端領域の基質結合能に及ぼす影響を検討した。その結果、マウスHsp72のC末端領域は、タンパク質の高次構造や熱安定性に大きな影響を及ぼさないにもかかわらず、分子会合ならびに基質のサイズ依存的な結合調節という機能を司ることを見出した。

(2) マウスの株化細胞であるP388D1 lymphoid neoplasmとの特異的な結合にかかわるHsp72の部位として、Hsp72の基質結合ドメインを含むC末端領域が重要であることを見出し、P388D1細胞上には、少なくとも2種類以上のHsp72に対する受容体が存在することを明らかにした。この結果は、Hsp72のC末端領域が自己・非自己の識別あるいは生物にとっての安全・危険を見極める生体防御シグナルとして働く可能性を指摘している。

(3) マウス肺癌由来LL/2細胞を用いて、ストレスによって誘導されるHsp72が細胞の異常を知らせるシグナルとして生細胞の表面に提示されることを見出し、自然免疫を司るナチュラルキラー細胞やマクロファージによって認識されるシグナルとして働くこと、さらに、C末端が切断されたHsp72の断片がより効果的なシグナルであることを明らかにした。

以上のように、細胞内でのシャペロン機能や細胞外環境における免疫細胞との相互作用などの生体防御においてマウスHsp72のC末端領域が果たす役割について生化学的および細胞学的に解析し、Hsp72の新たな機能について知見をもたらしたもので、これらの成果は、食環境学、細胞免疫学、生理機能学の分野に寄与するところが多い。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成19年2月15日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。