

氏 名 ふじ 藤 い 井 のり 智 ひこ 彦
 学位(専攻分野) 博 士 (理 学)
 学 位 記 番 号 理 博 第 3281 号
 学位授与の日付 平 成 20 年 3 月 24 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 理 学 研 究 科 化 学 専 攻
 学 位 論 文 題 目 ガンマ線照射に対するalpha A-, alpha B-crystallinの感受性の差異に関する研究

論文調査委員 (主 査) 教 授 藤 井 紀 子 教 授 杉 山 弘 教 授 三 木 邦 夫

論 文 内 容 の 要 旨

はじめに：水晶体は外界からの光を網膜に結像させるという重要な機能を有する眼の器官であり、一生を通じて透明性を維持している。水晶体を構成する蛋白質は主に alpha-, beta-, gamma-crystallin から成り、alpha-crystallin は beta-, gamma-crystallin の凝集を抑制するシャペロン機能を有している。このシャペロン機能の低下が透明性を損なう一因と考えられている。Alpha-crystallin は分子量 2 万の alpha A-crystallin (alpha A) と alpha B-crystallin (alpha B) の二種類のサブユニットから成り、300-800 kDa の会合体を形成するタンパク質である。また両者とも各々単独で会合体を形成し、共にシャペロン機能を有している。ヒトの水晶体の alpha-crystallin はなぜ alpha A または alpha B の単一成分の会合体ではなく、alpha A と alpha B から成るヘテロ会合体なのか？その理由については現在のところ不明である。本研究では、alpha A と alpha B が様々なストレスに対し応答が異なり相補的に機能しているのではないかと考え、酸化的ストレスの一つであるガンマ線を照射し、照射後の両者の構造機能変化を比較した。さらに alpha A および alpha B の照射後の相互作用変化を表面プラズモン共鳴 (SPR) で測定した。

方法と結果：ヒトリコンビナント alpha A と alpha B を大腸菌で発現させ精製した。両者とも分子量 600 kDa の会合体を形成し、シャペロン活性を有していた。Alpha A および alpha B はともにガンマ線照射によってタンパク質の cross-link および切断産物が生じた。しかしそれらの量は alpha A および alpha B で優位な差はなかった。またガンマ線照射の線量に依存して共に会合体の凝集度が増加したが alpha B の方が低い線量で大きな凝集体が形成された。シャペロン活性は未照射試料では alpha A より alpha B の方が高かった。しかし、alpha B のシャペロン活性は 0.5 kGy 照射で 1/2 になり、1 kGy ではほぼ失活していた。これに対し、alpha A はガンマ線を 3.0 kGy 照射してもシャペロン機能を保持していた。次に alpha A および alpha B 間の相互作用を SPR で分析した。本研究で用いたリガンドとアナライトの組み合わせとその表記を表に示した。SPR の測定より、未照射の AB および BB の相互作用が 1:1 結合モデルに合致した。

しかし、未照射の AA と BA 及び照射試料のすべての組み合わせの相互作用では 1:1 結合モデルに合致しなかったため、解離の速さによる比較を行った。その結果、未照射試料では解離の速さの順が AA=BA>AB=BB であった。しかし、アナライトにガンマ線を 0.5 kGy 照射したクリスタリンを用いると、すべてのクリスタリン間の解離の速さが未照射におけるそれよりも増加した。また解離の速さの順は

リガンド	アナライト	表記
alpha A	alpha A	AA
alpha A	alpha B	AB
alpha B	alpha A	BA
alpha B	alpha B	BB

BB>AB=BA>AA となり、AA, BB の解離の速さの順がガンマ線照射により逆転した。これらの結果よりシャペロン機能の低下はタンパク質の解離の速さに関連性があることが本研究によりはじめて示された。alpha A および alpha B は構造や機能が類似しているが、ガンマ線により生じるラジカル反応に対する感受性は alpha B の方が alpha A よりも高いことが初めて明らかとなった。他方、Weinreb et al. は UV A 照射したウシの水晶体で、alpha B の方が alpha A よりも機能を維持したことを報告しており、本研究のガンマ線照射に対するストレス応答と逆の結果を示した。このことより alpha A および

alpha Bは様々なストレス耐性において相補的に機能していることが強く示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究は水晶体の透明性に寄与している alpha-crystallin 会合体の alpha A-crystallin (alpha A) と alpha B-crystallin (alpha B) の二種類のサブユニットに対するガンマ線照射に対するストレス応答の差異, および alpha A と alpha B 間の相互作用が放射線照射前後でどのように変化するのかを明らかにしたものである。

水晶体の透明性はその構成タンパク質である alpha-crystallin 会合体が beta-, gamma-crystallin と相互作用することによって保持されていると考えられている。alpha-crystallin 会合体は 20 kDa の alpha A と alpha B から成る 15-40 量体のヘテロ会合体を形成している。alpha A と alpha B は性質のよく似たタンパク質であり, それぞれ単独で会合体を形成し, 両者ともにシャペロン活性を有している。それゆえ, なぜ水晶体中では alpha A または alpha B の単一成分の会合体ではなく, alpha A と alpha B から成るヘテロ会合体なのかについては不明であった。水晶体は光に曝露されているので日常的に酸化的ストレスを受けている器官である。申請者は様々なストレスに対する応答が alpha A と alpha B で異なり, それらのストレス耐性において相補的に機能しているのではないかという作業仮説を立て, ヒト alpha A と alpha B の組換え体を調製し, これに酸化的ストレスの一つであるガンマ線を照射し, 照射後の両者の構造機能変化を比較した。その結果, alpha B はガンマ線照射によって大きな凝集体を形成し, シャペロン活性も著しく低下したのに対し, alpha A はガンマ線を照射しても会合体は安定でシャペロン活性も保持していた。このことより alpha A は alpha B と比較してガンマ線照射に対して耐性が強いことが初めて明らかとなった。さらに申請者は照射前後の alpha A および alpha B の相互作用変化を表面プラズモン共鳴 (SPR) で初めて測定した。その結果, ガンマ線照射前は alpha B より alpha A のほうが解離は速かったが, ガンマ線照射すると解離の速さは逆転した。またガンマ線照射した alpha B をアナライトとし, リガンドに alpha A を用いたときと alpha B を用いたときで解離の速さを比較すると, alpha B-alpha B の方が alpha A-alpha B よりも速かったことから alpha A は alpha B の解離を抑制していることが明らかとなった。このことが alpha-crystallin が alpha A と alpha B から構成されるヘテロ会合体で存在する理由の一つではないかと考えられた。他方, UV A 照射に対する応答性は本研究で得た結果と逆に alpha B の方が強いという報告があり, 本研究の結果と合わせると alpha A と alpha B は様々なストレス耐性において補い合っていると強く示唆された。これらの新しい知見は当該分野の研究の発展に大きく寄与したものである。

以上により, 本論文は博士 (理学) の学位論文として十分に価値あるものと判断し, 論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果, 合格と認めた。