

学位審査報告書

(ふりがな)	なかむら じゅんじ
氏 名	中村 純治
学位（専攻分野）	博 士 （ 理 学 ）
学 位 記 番 号	理 博 第 号
学 位 授 与 の 日 付	平成 年 月 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 生物科学 専攻
(学位論文題目)	
ノックアウトマウス作製による高分子量ストレスタンパク質 Hsp110/105 の機能解析	
論 文 調 査 委 員	(主査) 森 和俊 教授 平野 丈夫 教授 細川 暢子 准教授

理 学 研 究 科

(続紙 1)

京都大学	博士（理学）	氏名	中村 純治
論文題目	ノックアウトマウス作製による高分子量ストレスタンパク質 Hsp110/105 の機能解析		
(論文内容の要旨)			
生物は高温環境下におかれた場合、その温度上昇を感知して一群の熱ショックタンパク質（HSP）の発現を誘導し対応するシステムを備えている．熱ショックタンパク質は熱ショックのみならず種々のストレスによっても発現が誘導され、ストレスにともなう細胞傷害からの防御応答に関与する．また熱ショックタンパク質の多くは正常時でも恒常的に発現しており、タンパク質の生合成、高次構造の形成、細胞内輸送、あるいは不要タンパク質の分解に関与する分子シャペロンとして機能することが明らかにされている．熱ショックタンパク質はそれぞれの分子量に基づき、HSP110, HSP90, HSP70, HSP60, HSP40 および低分子量 HSP（25-28 kDa）ファミリーに分類される． Hsp110/105 は、HSP70 ファミリーのサブグループである HSP110 ファミリーに属する哺乳類高分子量ストレスタンパク質である．本研究では生体内での Hsp110/105 の機能を明らかにするために、<i>Hsp110/105</i> ノックアウトマウスを作製し、個体発生と成長におよぼす影響について解析した．その結果、ノックアウトマウスはメンデル則にしたがって出生し、生理的条件下では、体重や体長、寿命などにおいて野生型マウスと比較して有意な表現型の差を示さなかった．Hsp110/105 はマウスのほぼすべての組織で発現しているが、なかでも脳内の神経細胞で強く発現しており、脳虚血時には、Hsp70 とともに Hsp110/105 の発現が顕著に誘導されることが報告されている．そこで、<i>Hsp110/105</i> ノックアウトマウスを用いて脳虚血ストレス時における Hsp110/105 の機能を解析した．脳虚血病態モデルとして中大脳動脈閉塞による一過性局所脳虚血を負荷した．30 分間閉塞し再灌流 24 時間後に組織学的に解析したところ、ノックアウトマウスでは梗塞巣体積と神経学的障害症状スコアが野生型マウスと比較して有意に減少することが明らかになった．これらの結果から、脳虚血・再灌流の病態時に Hsp110/105 は神経細胞に対する保護効果を示さず、むしろ傷害的に機能している可能性が示唆された． 次に Hsp110/105 の細胞傷害的な作用機序について詳細に解析するために、<i>Hsp110/105</i> ノックアウトマウス胎仔から樹立した繊維芽細胞を用いて、ホタルルシフェラーゼを用いたリフォールディングアッセイを行なった．繊維芽細胞に <i>Hsp70</i> 遺伝子を導入すると、熱変性したホタルルシフェラーゼが再活性化され、さらに同時に <i>Hsp110/105</i> 遺伝子を導入したところ、Hsp110/105 の発現量に依存して、ホタルルシフェラーゼの再活性化が抑制された．すなわち、Hsp110/105 は Hsp70 のフォールディング活性に対して抑制的に機能することが明らかになった． 本研究の結果から、虚血性脳障害時における Hsp110/105 と Hsp70 の機能的な連関が明らかになり、特に梗塞巣においては、Hsp110/105 が Hsp70 の負の制御因子として働き、脳虚血による神経細胞傷害を増悪させる可能性が示唆された．			

(論文審査の結果の要旨)

Hsp110/105 は HSP110 ファミリータンパク質と総称される約 100 kDa の分子量をもつ熱ショックタンパク質の一員で、哺乳動物細胞のサイトゾルに局在する。構造的には HSP70 ファミリータンパク質と類似しており、広義の HSP70 ファミリーに属する。Hsp110/105 は、Hsp70 とは異なり Foldase シャペロンとして機能しないものの、Holdase シャペロンとして機能することや、Hsp70-Hsp40 のフォーディングサイクルにおいてコシャペロンとして働くことから、生体内において重要な機能を担うタンパク質であると考えられていた。本研究では、遺伝子ターゲティング法を用いて *Hsp110/105* ノックアウトマウスを作製した。その結果、ノックアウトマウスは生理的条件下では雌雄ともに正常に出生・成長し、表現型の異常は観察されないことが示された。本研究の結果より、これまでの予想に反して、Hsp110/105 の生理的機能はマウス個体の発生・発育期において必須ではないことが明らかにされた。

また、海馬 CA1 領域の神経細胞は、軽度の全脳虚血あるいは一過性局所脳虚血負荷により遅発性神経細胞死を起こす。この時 *Hsp70* とともに *Hsp110/105* の発現が亢進することから、Hsp110/105 が虚血耐性の獲得に関与する可能性が報告されていたが、梗塞巣内の神経細胞における Hsp110/105 の機能については十分に解明されていなかった。本研究では、*Hsp110/105* ノックアウトマウスに一過性局所脳虚血負荷を加えた結果、虚血・再灌流 24 時間後の梗塞巣体積が約 30% 減少し、また神経学的障害症状スコアが有意に改善することが示された。さらに、ノックアウトマウス胎仔由来の株化繊維芽細胞を用いて、Hsp70 のリフォールディング活性におよぼす Hsp110/105 の効果を検討したところ、Hsp110/105 は Hsp70 のリフォールディング活性を抑制することが示された。脳虚血・再灌流による複合ストレスが加わると、神経細胞内のタンパク質は変性し、凝集体を形成しやすい状態になるが、虚血ストレスにより誘導された Hsp70 の分子シャペロン機能により、神経細胞死が抑制されることが知られている。本研究の結果から、Hsp110/105 は Hsp70 のリフォールディング活性を抑制することで、神経細胞に対して傷害的に働く可能性が示唆された。

本研究の成果は虚血性脳障害時における Hsp110/105 の分子機構の一端を明らかにしたものであり、Hsp110/105 と Hsp70 の機能的な連関を解明する上で重要な知見を提供するとともに、脳梗塞の予防や治療にも寄与するものであると考えられる。よって、本論文は博士（理学）の学位論文として価値あるものと認められる。なお、本学位授与申請者は、平成 22 年 10 月 26 日、論文内容とこれに関連した分野について試問した結果、合格と認められた。