

スモールヒートショックプロテインの多量体から 2 量体への解離と 基質認識機構の解明

Study on the dissociation process from multimer to dimer and the substrate recognition process of small heat shock protein

岡 俊彦^a、阿部 哲也^b、神前 太郎^b、中込篤^b、米澤 哲洋^b、養王田 正文^b
Toshihiko OKA^a, Tetsuya ABE^b, Taro KANZAKI^b, Atushi NAKAGOME^b, Tetsuhiro YONEZAWA^b,
Masafumi YOYODA^b

^a静岡大学、^b東京農工大学

^aShizuoka University, ^bTokyo University of Agriculture and Technology

分子シャペロン的一种であるスモールヒートショックプロテイン(sHSP)を用いて X 線溶液散乱を行った。sHSP は温度を上昇させることにより多量体から 2 量体へ解離するが、1~10mg/ml までの X 線溶液散乱で測定可能な濃度範囲においては解離を観測することができなかった。そこで変異体を用いて測定を行ったところ、一部の変異体では温度上昇による解離を観測することができた。

X-ray solution scattering of small heat shock protein (sHSP) was measured. sHSP dissociates from multimer to dimer in the temperature rise process, thus the solution scattering at the concentration of 1 ~ 10 mg/ml were measured. However the dissociations were not observed at the concentration. Then, the solution scattering of mutant sHSPs were measured and one shows the dissociation.

背景と研究目的：

Small heat shock protein (sHSP) は分子シャペロン的一种で各種の生物に存在する。通常の生育条件では多量体を形成しているが、熱ショックや化学的ストレスなどを受けた際に多量に誘導され、2 量体へ解離する。その 2 量体に変性した蛋白質の疎水性部位に結合し、変性蛋白質を再フォールドや分解する蛋白質に受け渡し、細胞内蛋白質の劣化を防ぐ品質管理の一翼を担っている。sHSP は変性蛋白質の凝集体の形成を防いでおり、この働きにより細胞全体の機能低下を抑制していると考えられている。実際ヒトの sHSP やその相同機能をもつ蛋白質である α B クリスタリンが、コンフォメーション病と総称される変性蛋白質の繊維化や蓄積に由来する病気を抑制して

いることが示されている[1]。また血小板凝集に対して抑制効果があることも示された[2]。そこで我々は sHSP の反応機構を解明することが、細胞内の品質管理機構や sHSP についての知見を深めるとともに、各種の病気の抑制機構を本質的に理解することを可能とすると考え、sHSP の X 線溶液散乱測定を行った。

実験：

測定には分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* 由来 (SpHsp16.0) [3]、高度高熱菌 *Sulfolobus tokodaii* strain 7 由来 (StHsp14.0) [4]の sHSP を用いた。X 線溶液散乱測定は BL40B2 で行い、波長は 1Å、カメラ長 2 m とした。検出器には R-axis7 を用いた。蛋白質濃度は 1~10mg/ml とした。

また試料温度は室温または 50°C とした。

結果と考察：

SpHsp16.0 の野生型の X 線溶液散乱測定を室温と 50°C で行った。ゲルろ過測定などによる事前の測定では 50°C での 2 量体への解離が観測されていたが、X 線溶液散乱測定の結果は 50°C でもほぼ多量体を形成していることを示していた。これは蛋白質濃度がゲルろ過測定などよりも高いためであると考えられた。

つぎに StHsp14.0 の野生型と変異体について室温と 50°C で X 線溶液散乱測定を行った。変異体は IXI/V モチーフに変異を導入した WKW および FKF 変異体である[4]。野生型と WKW に関しては室温と 50°C ともに多量体を形成しており、原点散乱強度もほぼ同じ散乱曲線が得られた。一方 FKF に関しては、室温では野生型とほぼ同様の散乱曲線が得られたが、原点散乱強度の減少が観測された (Fig.1)。これは室温でも一部 2 量体へ解離していることを示す。また 50°C では散乱曲線が大きく変化し、原点散乱強度もさらに減少した (Fig.1)。これは室温では存在していた多量体が室温では 2 量体へ解離したことを示す。StHsp14.0 の事前のゲルろ過測定の結果も SpHsp16.0 と同様に溶液散乱測定の結果と一致しなかったが、溶液散乱測定では蛋白質濃度が高いためと考えられる。

また 50°C でクエン酸シンターゼの変性過程を X 線溶液散乱で測定したところ、凝集による前方散乱の増加が著しかった。一方クエン酸シンターゼに FKF 変異体を加えたものでは前方散乱の著しい増加は認められず、原点散乱強度の増加も小さく、凝集抑制反応が観測された。

今後の課題：

今後は StHsp14.0 の FKF 変異体を中心に多量体から 2 量体への解離機構とともに変性蛋白質の凝集抑制機構をより詳しく調べていきたいと考えている。

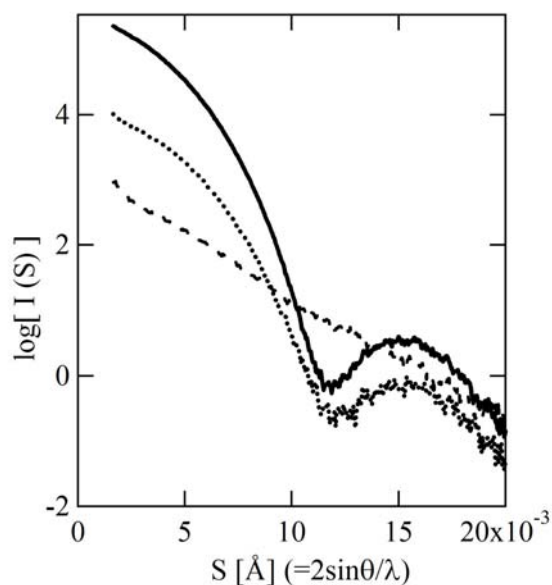


Fig.1. Profiles of solution X-ray scattering of StHsp14.0 wild-type (Solid line) and FKF mutant (room temperature: dotted line, 50°C: dashed line). Protein concentrations were 4.0mg/ml.

参考文献：

- [1]Ousman *et al.*, *Nature* (2007) 48:474-479; Ito *et al.*, *Folia Pharmacol. Jpn.* (2003) 121:27-32
- [2]Matsuno *et al.*, *Folia Pharmacol. Jpn.* (2003) 121:21-25
- [3]Hirose *et al.*, *J Biol Chem.* (2005) 280:32586-93
- [4]Saji *et al.*, *Proteins* (2008) 71:771-82

キーワード：

X 線溶液散乱

水溶液中の粒子の構造情報を X 線小角散乱を用いて調べる手法。コロイドや蛋白質水溶液などの研究に用いられる。

分子シャペロン

他の蛋白質が正しく折り畳まれるのを補助する蛋白質の総称。

コンフォメーション病

生体中の蛋白質が正常な機能を発揮する立体構造をとらないために起こる疾病の総称。

アルツハイマー病やパーキンソン病などが含まれる。その際蛋白質はアミロイド繊維などを形成する。