

コンフォメーション病抑制などを期待される
分子シャペロンの反応機構の解明
**Study of reaction mechanism of molecular chaperon contributing to
suppression of protein conformational diseases.**

岡 俊彦^a、阿部 哲也^b、神前 太郎^b、中込篤^b、中川あゆみ^b、養王田 正文^b
Toshihiko OKA^a、 Tetsuya ABE^b、 Taro KANZAKI^b、 Atushi NAKAGOME^b、 Ayumi NAKAGAWA^b、
Masafumi YOHTA^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 とヒートショックにより変性した蛋白質との相互作用を観測し、変性蛋白質の凝集抑制を観測した。

X-ray solution scattering profiles of small heat shock protein (sHSP) were measured. The reaction processes were measured that sHSP inhibits aggregation of heat-denatured protein.

背景と研究目的：

生体内ではさまざまな環境変化に対処し、生体機能を維持するためのシステムが構築されている。例えば細胞に急激に熱を加えると分子シャペロンと呼ばれる蛋白質の発現量が増加する。分子シャペロンには変性した蛋白質の正常な折れたたみを助ける機能を持つものや、変性蛋白質と結合して変性蛋白質の凝集体形成を防ぐものなどがあり、常温でも細胞中に多数存在してこれらの役割を果たしている。

Small heat shock protein (sHSP) は分子シャペロンの一種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。

実験方法、結果および考察：

測定には高度高熱菌 *Sulfolobus tokodaii* strain 7 由来の sHSP (StHsp14.0) [3]を用いた。X 線溶液散乱測定は BL40B2 で行い、波長は 1 Å、カメラ長 2 m とした。検出器には R-axis7 を用いた。

StHsp14.0 の野生型および変異体を X 線溶液散乱で測定した。変異体は IXI/V モチーフに変異を導入した WKW、FKF、FKI、IKF 変異体である[4]。まず温度依存的な多量体から 2 量体への解離を調べるために、25°C、50°C で計測した。野生型に関しては温度変化が無くとも多量体を形成していた。一方変異体に関しては、25°C に比べ 50°C で原点散乱強度の減少が観測された。これは温度上昇により一部が 2 量体へ解離していることを示す。

次に 50°C において、野生型 StHsp14.0 存在下でクエン酸合成酵素 (CS) 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 (Fig.1)。これは CS が凝集したためだと考えられる。したがって野生型 StHsp14.0 は 50°C では凝集抑制能を持たないことを示す。一方、StHsp14.0 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かった。これは、CS の凝集が抑制され、StHsp14.0 の多量体よりも大きな凝集抑制体が形成されたことを示す。したがって StHsp14.0 の 2 量体への解離が凝集抑制反応には必須であることが分かった。また原点散乱強度、慣性半径などから凝集抑制により形成される粒子はサイズがあまり大きくなっていないことも分かった。CS と StHsp14.0 の濃度比にもよるが、凝集抑制体には CS1 個または 2-3 個程度が含まれていることが示された。

今後の課題：

今後さらに凝集抑制のメカニズムを明らかにするために、CS よりも小さな基質蛋白質の利用や、由来の異なる sHSP についての更なる測定が必要である。また他の分子シャペロンについても X 線溶液散乱を用いて基質その相互作用、複合体形成について調べていく。

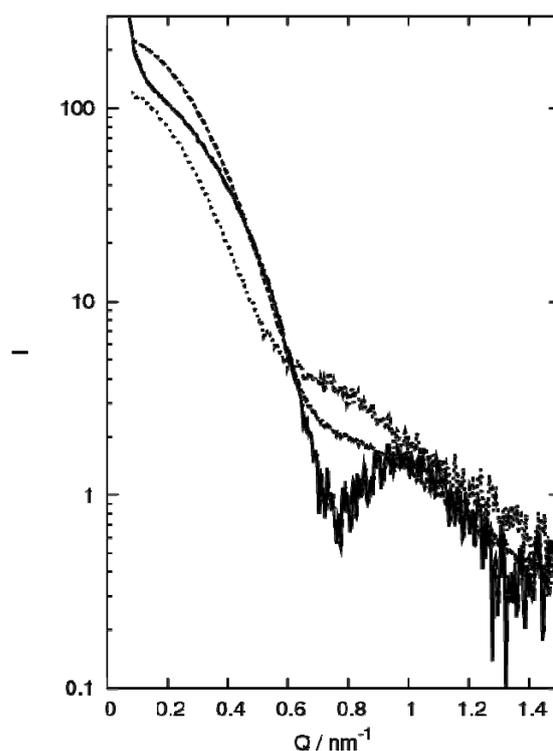


Fig.1. Profiles of solution X-ray scattering of StHsp14.0 with Citrate Synthase; wild-type (solid line), WKW (dashed line) and FKF (dotted line) mutants.

参考文献：

- [1] Shalina *et al.*, *Nature* (2007) 448:474-479;
- Ito *et al.*, *Folia Pharmacol. Jpn.* (2003) 121:27-32
- [2] Matsuno *et al.*, *Folia Pharmacol. Jpn.* (2003) 121:21-25
- [3] Saji *et al.*, *Proteins* (2008) 71:771-82

キーワード：

スモールヒートショックプロテイン、X 線溶液散乱、変性、凝集抑制