

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 chaperone suppressing
protein conformational diseases.**

岡 俊彦^a、阿部 哲也^b、神前 太郎^b、中川あゆみ^b、養王田 正文^b
Toshihiko OKA^a, Tetsuya ABE^b, Taro KANZAKI^b, Ayumi NAKAGAWA^b,
Masafumi YOHDA^b

^a静岡大学、^b東京農工大学

^aShizuoka University, ^bTokyo University of Agriculture and Technology

分子シャペロンであるスモールヒートショックプロテイン SpHsp16.0 を用いて X 線溶液散乱を行った。SpHsp16.0 温度依存的に 16 量体から 2 量体へ解離するが、その過程で最大長が長くなる構造変化を起こすことが明らかになった。また変性蛋白質の凝集を抑制する過程を観測することにも成功した。

X-ray solution scattering profiles of small heat shock protein, SpHsp16.0, were measured. We revealed SpHsp16.0 lengthen its size during temperature induced 16mer-2mer dissociation. We also observed the process that SpHsp16.0 protect unfolded protein from aggregation.

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。

測定には分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* 由来の sHSP (SpHsp16.0) [3,4]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。

SpHsp16.0 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 C 末端近くに 11 残基導入したものをを用いた。SpHsp16.0 の野生型は 38 度以下では 16 量体からなる多量体を形成しているが、42 度で解離しはじめ、45 度以上で 2 量体に移行することがゲルろ過クロマトグラフィーを用いた測定により示されている[3]。そこで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、変異型ともに、25°C に比べ 50°C で原点散乱強度の減少が観測されたが、減少の割合は変異型のほうが高かった。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。また X 線溶液散乱ではゲルろ過クロマトグラフィーの結果に比べて解離の度合いが小さかった。これは蛋白質濃度が高いためと考えられる。また昇温過程において 2 量体への解離とともに、粒子の最長部分の指標となる最大長の増大が観測された。16 量体が 2 量体へ解離する際に、構造変化を伴って解離するため、構造が伸び最大長が変化すると考えられる。

次に 50°C において、SpHsp16.0 野生型および変異型にモル比で 1/16 のクエン酸合成酵素 (CS) を添加して X 線溶液散乱で測定した。50°C では CS は変性し、凝集するため前方散乱が顕著に増加する。ところが SpHsp16.0 野生型および変異型を加えたものでは凝集時に特徴的な前方散乱の著しい増加は認められなかった。これは CS の凝集が抑制され、SpHsp16.0 の多量体よりやや大きな凝集抑制体が形成されたことを示す。さら

に CS の添加量を増加させたところ、野生型では凝集が観測されたが、変異型では CS のモル比で 1/4 まで凝集抑制できた。これは変異型のほうが野生型より 2 量体へ適度に解離しているためと考えられる。また変異型で CS 添加量増加時に凝集抑制体の分子量が添加量にほぼ比例して増大することが観測された。これは凝集抑制の際に SpHsp16.0 の 2 量体の変性蛋白質を被覆するとが、被覆できる表面積に上限があるためと考えられる。

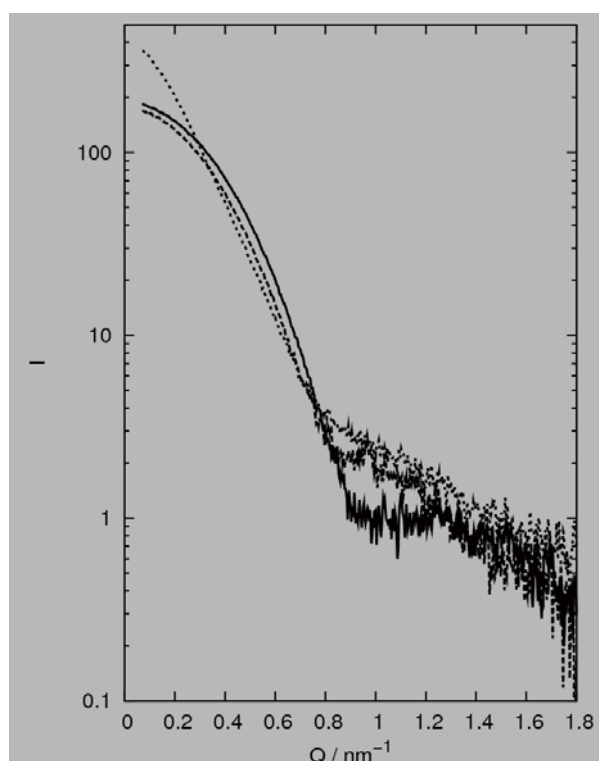


Fig.1. Profiles of solution X-ray scattering of SpHsp16.0 wild type; 25°C (solid line), 50°C (dashed line) and 50°C with CS (dotted line).

今後他の実験手法の研究とあわせて、解離過程で観測された構造変化や、凝集抑制時の構造について更なる研究を進めていく。また他のシャペロン蛋白質についても研究を広げていきたい。

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] Hirose *et al.*, *J. Biol. Chem.* (2005) 280:32586-32593
- [4] Sugino *et al.*, *Proteins.* (2009) 74:6-17

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