

コンフォメーション病抑制を行う
分子シャペロン関連蛋白質の反応機構の解明
**Study of reaction mechanism of molecular chaperone suppressing
protein conformational diseases.**

岡 俊彦^a、石田竜一^b、阿部 哲也^c、神前 太郎^c、友成 太一^c、守谷 和騎^c、
伊藤 英晃^b、養王田 正文^c

Toshihiko OKA^a, Ryuichi ISHIDA^b, Tetsuya ABE^c, Taro KANZAKI^c, Taichi TOMONARI^c,
Kazuki MORIYA^c, Hideaki ITOH^b, Masafumi YOYODA^c

^a静岡大学、^b秋田大学、^c東京農工大学

^aShizuoka University, ^bAkita University, ^cTokyo University of Agriculture and Technology

分子シャペロンである HSP60 を用いて X 線溶液散乱を行った。HSP60 は ATP 非存在下でシングルリングであるが、ATP 存在下では一部がダブルリング化していた。また HSP10 存在下ではよりダブルリング化が促進される。またミトコンドリア移行シグナルが付加した HSP60 ではこれらの傾向がより強まることが分かった。

X-ray solution scattering profiles of HSP60, were measured. We revealed HSP60 formed single-rings without ATP, but a part of HSP60 formed double-rings with ATP. The ratio of double-rings were increased with HSP10. HSP60 with a transfer signal sequence to mitochondria formed much double-rings than HSP60 without the sequence.

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。

真核生物のミトコンドリアに存在する I 型シャペロニン HSP60 は 7 量体からなるシングルリングを形成しており、シャペロンとしての機能以外に、アポトーシスにも関与していることが知られている。この HSP60 は ATP

を利用し、さらに補因子 HSP10 と結合することにより複合体を形成して変性蛋白質を折り畳む。しかしこの過程での構造変化については研究が進んでいない。そこで我々は HSP60 の HSP10 存在下、ヌクレオチド存在下での構造変化を調べた。また HSP60 は細胞質で発現されミトコンドリアに移行するが、細胞質では HSP60 にミトコンドリア移行シグナルが付加している[1]。この移行シグナル付 HSP60 についても同様の条件での構造変化を調べた。

測定にはヒト由来の HSP60、HSP10 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。

まずヌクレオチドの存在の有無による

HSP60 の構造変化を調べたところ、ATP 添加時のみ零点散乱強度 $I(0)$ 、慣性半径 R_g に増大が見られた (Fig.1)。一方で ADP、AMP-PNP 添加時とヌクレオチド無しでは顕著な差は見られなかった。このことはシングルリングで存在する HSP60 の一部が、ATP 添加によりダブルリング化することによると考えられた。

さらに HSP60 に HSP10 を加えた状態でのヌクレオチドの存在の有無による構造変化を調べたところ、ATP 添加による $I(0)$ 、 R_g の変化量はさらに増大した。ところがヌクレオチド無しでは HSP10 添加による $I(0)$ 、 R_g の変化はほとんど無かった。これは HSP60 のダブルリング化が ATP、HSP10 の存在によりさらに促進されたためと考えられる。HSP60 と HSP10 の存在下では HSP60 のダブルリング化とともに HSP60 に HSP10 が結合する可能性もあるが、 $I(0)$ の増加量からはどの程度結合しているかは判断できなかった。

よって HSP60 のダブルリング化には ATP 結合による構造変化が重要であると考えられる。さらに HSP10 存在下では ATP 結合による構造変化がより安定化しダブルリング化が促進される。

移行シグナル付 HSP60 に関しても同様の実験を行った。移行シグナル付 HSP60 に ATP を添加すると、移行シグナルなしよりもダブルリング化が進んだ。また HSP10、ATP 存在下では移行シグナル付では $I(0)$ の増加からダブルリング化と HSP10 の結合が起きていることが明らかとなった。またダブルリング化の割合は移行シグナル無しよりも大きくなっていった。

移行シグナル付 HSP60 でもダブルリング化の傾向はシグナル無し HSP60 と同じであ

ったが、より度合いが高くなっていった。移行シグナルは HSP60 の赤道ドメインに存在する N 末端に付加している。この移行シグナルがどのようにダブルリング化の安定化に寄与しているかは今後の課題である。

また分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* 由来の Small heat shock protein の蛋白質凝集抑制能[2]について、温度や基質の量への依存性を調べた。

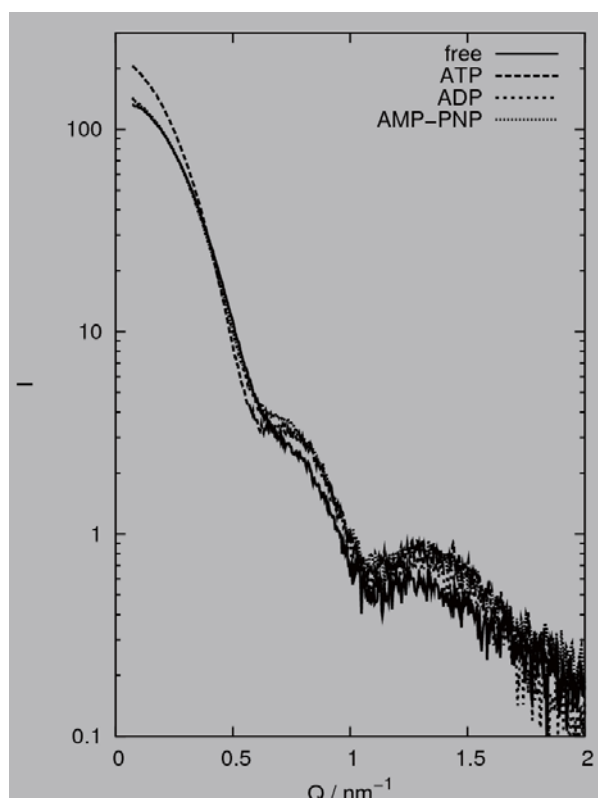


Fig.1. Profiles of solution X-ray scattering of HSP60 with and without nucleotides.

参考文献

- [1] Itoh H, et al., *Eur. J. Biochem.*, (2002) 269 5931-5938
- [2] Hirose *et al.*, *J. Biol. Chem.* (2005) 280:32586-32593; Sugino *et al.*, *Proteins.* (2009) 74:6-17

キーワード

分子シャペロン、HSP60、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