

## 論文内容の要旨

論文題目 BAG ドメインの Hsp70 および Bcl-2 との相互作用ならびにアポトーシス抑制の  
構造論的研究

(Structure-based studies on interactions of Hsp70 and Bcl-2 with the BAG domain and apoptosis  
inhibition)

氏名 志田 明里

細胞は温度変化や酸化，浸透圧変化，化学物質の曝露など様々なストレスにさらされている。これらのストレスによりタンパク質は変性や凝集を引き起こし，正常な働きを失う。タンパク質の凝集を防ぐうえで，シャペロンによるタンパク質フォールディングの制御が重要となる。一方，本来の機能を失ったタンパク質を含む細胞はしばしば有害な作用を及ぼすため，このような細胞を消去する機構であるアポトーシスは生体内で大きな役割を果たしている。このため，シャペロンの活性やアポトーシス能の変化はガンや神経変性疾患，自己免疫疾患など，多くの疾患の病因であると考えられる。

アポトーシスの決定過程を制御するタンパク質の一種として，Bcl-2 ファミリータンパク質が知られている。Bcl-2 ファミリータンパク質には抗アポトーシス作用とアポトーシス促進作用のある分子が存在するが，これらがホモまたはヘテロダイマーを形成することにより，生物の多様な細胞応答に対応していると考えられている。Bcl-2 ファミリータンパク質との配列相同性は低いですが，Bcl-2 タンパク質と結合を示すタンパク質として BAG1 (Bcl2-associated athanogene 1) が同定された。その後，BAG1 タンパク質と同様に BAG ドメインを有するタンパク質群が BAG ファミリータンパク質と命名された。BAG ファミリータンパク質は酵母，シロイヌナズナ，線虫からヒトにいたるまで幅広い生物種で普遍的に存在することから，生体において重要な役割を担うタンパク質であると予想されており，ヒトでは BAG1 から BAG5 の 5 種類が報告されている。

BAG タンパク質は主要なシャペロンである Hsp70 と相互作用を示す。Hsp70 は C 端側の

基質結合ドメインにおいて基質タンパク質のフォールディングを行うが、この反応は N 端側のヌクレオチド結合ドメインにおける ATP の加水分解反応と密接に関わっている。BAG タンパク質は Hsp70 の ATP/ADP 交換反応を促進することによりシャペロン活性を調節しており、BAG ドメインのみでこの調節が可能であることが明らかになっている。

しかしながら一方で、BAG タンパク質は Bcl-2 の結合因子として同定されたにもかかわらず、アポトーシスの抑制における BAG ドメイン単独での機能発現や Bcl-2 との相互作用に関しては明らかにされていない。

そこで、本研究では BAG ファミリーとしての最小構成単位である BAG ドメイン単独の相互作用や機能発現の理解を目指した。第一章では、BAG ドメインが単独でアポトーシス抑制能を有することや Bcl-2 と同様にミトコンドリアに局在することを *in vivo* で示すとともに、*in vitro* において Bcl-2 と結合することを確認した。加えて、BAG ドメインの変異体解析を行い、Bcl-2 相互作用部位を同定した。この結果、BAG ドメインの Bcl-2 との相互作用面は、Hsp70 との相互作用面と重なりが見られたため、いずれかのタンパク質との二者複合体のみを形成することが示唆された。第二章では、Hsp70 のヌクレオチド結合ドメイン (NBD) のヌクレオチド非含有型の構造を新たに決定することにより、BAG ドメインの NBD への結合は、NBD のヌクレオチド結合ポケットを開いた状態に維持するために重要な相互作用であることを確認した。さらに、BAG ドメインは ADP と NBD の相互作用を阻害することにより、ATP/ADP 交換反応を調節していることが示唆された。

## 第一章 BAG ドメインの Bcl-2 との相互作用ならびにアポトーシス抑制

BAG ファミリータンパク質の一種である BAG3 は、脳、心臓、骨格筋、内分泌系などの幅広い臓器で発現が確認されており、Bcl-2 との結合やアポトーシス抑制能が報告されている。そこで、これらの機能が BAG ドメインのみでも再現可能であるのかを検証するとともに、Bcl-2 との相互作用残基の同定をタンパク質立体構造の観点から行った。

まず、BAG ドメインのみでもアポトーシス抑制能を有するかを検討した。HeLa 細胞に BAG3 の全長および BAG ドメイン (BAG3-BD) を一過性に発現させ、抗 Fas 抗体の処理によりアポトーシスを誘導した。この際に見られる DNA の断片化を TUNEL 法により検出し、DNA 断片化細胞数の割合の変化によりアポトーシス抑制能を評価した。その結果、BAG3 発現細胞のみならず BAG3-BD 発現細胞においても、DNA 断片化細胞数の割合が低下したことから、BAG3-BD がアポトーシス抑制能を有することが明らかになった。

次に、BAG3-BD と Bcl-2 の相互作用を調べた。大腸菌発現系により His タグ融合 BAG3-BD タンパク質および MBP タグ融合 Bcl-2 を発現させ、結合実験を行ったところ、これらのタンパク質間に相互作用が確認された。さらに、HeLa 細胞に BAG3-BD と Bcl-2 を共発現させ、各々のタンパク質の細胞内における発現部位を観察したところ、いずれもミトコンドリアに局在することが確認された。以上の結果から、BAG3-BD はミトコンドリアにおいて Bcl-2 と結合することによりアポトーシスを抑制することが示唆された。また、BAG3-BD

共存下では Bcl-2 のリン酸化残基である 56 番目のスレオニンがリン酸化された Thr56 リン酸化型 Bcl-2 の割合が増加していた。

続いて、相互作用部位の同定のために BAG3-BD の変異体を作製した。この時、BAG ファミリータンパク質間の保存残基、Hsp70 との相互作用残基、すでに明らかとなっている BAG3-BD および Bcl-2 の単体の立体構造ならびに Bcl-2 ファミリーの複合体構造に基づいて予測した相互作用残基、の 3 パターンの残基に変異を導入した。これらの変異体と Hsp70 の NBD ならびに Bcl-2 との相互作用を *in vitro* 結合実験および等温滴定カロリメータ (ITC) を用いた  $K_D$  測定により観察した。その結果、立体構造に基づいて相互作用残基であると予測した 457 番目のチロシン、467 番目のセリンに変異を導入した場合に BAG3-BD と Bcl-2 の結合が消失した。さらに、BAG ドメイン間で保存されている 446 番目のリジンや Hsp70 との相互作用残基である 480 番目のアルギニンへの変異も  $K_D$  を低下させた。そして、以上の残基を相互作用部位として再度複合体構造の検討を行った。これらの 4 残基により形成される相互作用面は Hsp70 との相互作用に関わる残基により形成される結合面と重なりが見られたことから、BAG3-BD は NBD および Bcl-2 の両方を同時に結合する可能性は低いことが示唆された (図 1)。このことは、ITC を用いた測定において、NBD と BAG3-BD の複合体と Bcl-2 の相互作用が検出されなかったこととも関連していた。

## 第二章 BAG ドメインとの相互作用による Hsp70 の構造変化ならびに機能調節

BAG ドメインはシャペロンタンパク質である Hsp70 の N 端側のヌクレオチド結合ドメイン (NBD) に結合する。この相互作用は NBD のヌクレオチド結合ポケットを開くような構造変化を引き起こすことが報告されていた。しかし、C 端の基質結合ドメイン (SBD) を含む Hsp70 では、BAG との相互作用を介さずに同様の構造変化が生じることが近年明らかになった。そこで、NBD の本質的な構造変化を理解するとともにシャペロン活性調節における BAG の役割の理解を深めるために、これまで報告されていなかったヒト Hsp70 のヌクレオチド非含有型 NBD 断片の構造および ATP 非水解アナログである AMPPNP との複合体構造を新たに決定した。

すでにヌクレオチド非含有型として報告されていた BAG1 の BAG ドメイン (BAG1-BD) と NBD の複合体構造や SBD を含む構造はヌクレオチド結合ポケットが大きく開いていた (open form) のに対し、ヌクレオチド非含有型 NBD は AMPPNP 結合型 NBD のような、結合ポケットが閉じた構造 (closed form) であった (図 2)。この構造では、構造の中心部に位置する 15 番目のチロシン、56 番目のリジンおよび 268 番目のグルタミン酸の間に水素結合の形成がみられた。この相互作用が NBD 内の各サブドメインを引き寄せるために、ヌクレオチド非含有型 NBD は closed form を取っていることが確認され、この closed form の NBD は AMPPNP の結合により、さらに安定化されると考えられた。一方、BAG1-BD もしくは SBD 結合時にはこれらの水素結合が消失するためにサブドメイン間の連携が失われ、open form へと移行していた。つまり、NBD は本質的には closed form をとっており、結合ポッケ

トを開いた状態に維持するためには BAG および SBD との相互作用が必要であることが示唆された。

続いて、BAG ドメインが NBD から ADP の解離を促進させることにより ATP/ADP 交換反応を促進することに着目した。この特異的な機構を考察するために、ITC を用いて NBD、BAG3-BD およびヌクレオチドの相互作用を調べた。その結果、BAG3-BD と NBD の複合体に対する AMPPNP の  $K_D$  は NBD 単独時のそれと同程度の値 ( $1.8 \times 10^{-5}$  M) であった。これに対し、ADP の  $K_D$  は NBD 単独時には  $5.5 \times 10^{-8}$  M であったが、BAG3-BD 存在下では  $3.9 \times 10^{-5}$  M に低下した。つまり、ATP と NBD の結合は BAG3-BD の影響を受けないのに対し、ADP と NBD の相互作用は BAG3-BD により大きく阻害されることが確認された。さらに、ヌクレオチド非存在下、AMPPNP 存在下および ADP 存在下の NBD に対する BAG3-BD の  $K_D$  を測定したところ、それぞれ  $7.4 \times 10^{-9}$ 、 $6.9 \times 10^{-8}$ 、 $6.4 \times 10^{-7}$  M となり、BAG3-BD はいずれの条件下においても NBD との相互作用が可能であった。以上の結果から、BAG3-BD は ADP 結合型 NBD のみならず ATP 結合型 NBD とも相互作用が可能であるが、NBD の ATP に対する結合力を保ったまま ADP に対する結合力のみを低下させることにより、ATP/ADP 交換反応を促進することが示唆された。この特異的な阻害は、AMPPNP 結合型 NBD と ADP 結合型 NBD の構造間に見られるアデニンヌクレオチドのリン酸認識部位およびアデノシン認識部位の構造の差異を反映していると考えられる。

最後に、今回決定した構造から新たに示された Hsp70 の特徴に関して報告する。ヌクレオチド非含有型 NBD は 225 番目のアスパラギン酸、227 番目のヒスチジンおよび隣接する対称分子中の 23 番目のヒスチジンにより亜鉛イオンを配位しており、この部分を介して二量体を形成すると考えられた。このことは、23 番目のヒスチジンまたは 227 番目のヒスチジンに変異を導入することで二量体形成が阻害されることや、EGTA 存在下でも二量体形成が阻害されることから示唆された。これに対し、AMPPNP 結合型 NBD の構造中では、 $\gamma$ -リン酸結合残基の構造変化に伴い亜鉛配位残基も構造変化を引き起こすため、亜鉛の配位および二量体の形成が阻害されていた。

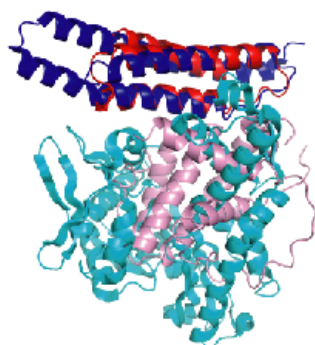


図1 BAG3-BD (赤) と Bcl-2 (ピンク) の複合体予想モデルと BAG1-BD (青) と NBD (シアン) の複合体の重ね合わせ

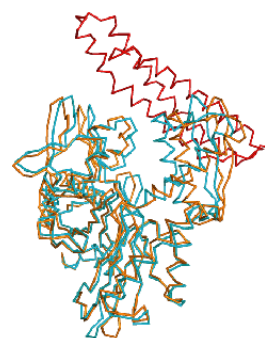


図2 BAG1-BD (赤) 結合時の NBD (オレンジ) とヌクレオチド非含有型 NBD (シアン) の重ね合わせ