

## 論文の内容の要旨

論文題目 ヒト熱ショック蛋白質 Hdj1 のコシャペロン機構に関する構造生物学的研究

氏名 鈴木 浩典

### 【背景と研究目的】

ヒト熱ショック蛋白質 Hsp40 は Hsp70 のコシャペロンで、340 アミノ酸残基(分子量 38,044)からなる。そのポリペプチド鎖は N 末端側の J-domain と C 末端側のドメインに分けられる。Hsp40 は、J-domain が Hsp70 の ATPase 活性の促進に、C 末端側のドメインが変性蛋白質などの基質および Hsp70 の C 末端との相互作用に関与することで、Hsp70 と協同して変性蛋白質を正常な三次元構造へと折りたたむ。Hsp40 がハンチントン病患者において見られる細胞内でのハンチントン凝集を抑制することが報告され、Hsp40 が細胞内での蛋白質の凝集を伴う疾病であるフォールディング病に関与する可能性が注目されている。

本研究では、ヒト Hsp40 である Hdj1 の C 末端側のドメインを単体および Hsp70 の C 末端ペプチド(<sup>634</sup>GPTIEEVD<sup>641</sup>)との複合体の三次元構造を X 線結晶構造解析により明らかにし、Hsp40 のコシャペロン機構に関する知見を得ることを目的とした。

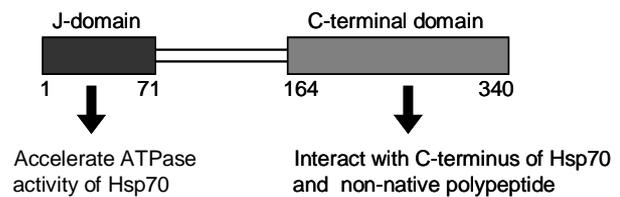


図 1. Hdj1 のドメイン概略図

### 【発現、精製と結晶化】

Hdj1 の C 末端側ドメインを大腸菌で発現させ、硫酸アンモニウムによる分画および 3 段階のカラムクロマトグラフィーにより精製し、結晶化サンプルとした。SDS-PAGE およびゲルろ過カラムでの溶出時間から、Hdj1 の C 末端側ドメインは溶液中でダイマーとして存在する。PEG3350 を結晶化剤とするハンギングドロップ蒸気拡散平衡法により、pH 6.0 の条件下で空間群  $P2_1$  に属する単体(Peptide-free)およびペプチドとの複合体(Complex I)の結晶を得た。また、pH 8.8 条件下で空間群  $C2$  に属するペプチドとの複合体結晶

(Complex II–IV)を得た。

### 【X線結晶構造解析】

回折強度データ測定は、KEK Photon Factory および SPring-8 シンクロトロン放射光 X 線、または回転銅対陰極型 X 線発生装置を用い、結晶を 100 K の窒素気流中に置いて行なった(表 1)。

Peptide-free 結晶について、Au を結合させた重原子同型置換体を調整し、異常分散効果を利用した単一重原子同型置換法により初期位相を決定した。溶媒領域の電子密度の平均化と、非結晶学的対称性に基づくダイマー分子の電子密度平均化により、位相を改善した電子密度をもとに三次元構造モデルを構築し、その後構造精密化を行なった。その他の結晶については、Peptide-free の構造を初期モデルにした分子置換法により位相を決定し、構造の精密化を行なった。

表 1. 回折強度データ収集と構造精密化

|                                     | Peptide-free | Complex I   | Complex II   | Complex III | Complex IV  |
|-------------------------------------|--------------|-------------|--------------|-------------|-------------|
| Construct                           | D161–I340    | D161–I340   | S151–I340    | P155–I340   | P155–I340   |
| X-ray source                        | BL-6A*       | BL-5A*      | CuK $\alpha$ | BL38B1**    | BL38B1**    |
| Space group                         | $P2_1$       | $P2_1$      | $C2$         | $C2$        | $C2$        |
| Unit cell parameters                |              |             |              |             |             |
| $a$ (Å)                             | 103.3        | 104.7       | 111.1        | 111.1       | 193.1       |
| $b$ (Å)                             | 40.9         | 41.1        | 50.9         | 51.3        | 40.6        |
| $c$ (Å)                             | 62.7         | 62.9        | 90.2         | 90.2        | 128.6       |
| $\beta$ (°)                         | 96.6         | 97.4        | 114.8        | 114.8       | 115.8       |
| Resolution limit (Å)                | 1.85         | 1.85        | 2.51         | 1.90        | 2.80        |
| Completeness (%)                    | 96.6         | 99.1        | 98.2         | 95.7        | 99.9        |
| $R_{\text{merge}}$ ( $I$ )          | 0.101        | 0.056       | 0.058        | 0.109       | 0.106       |
| No. of protomers/ASU <sup>†</sup>   | 2            | 2           | 2            | 2           | 4           |
| No. of peptide/ASU <sup>†</sup>     |              | 3           | 4            | 5           | 8           |
| $R_{\text{work}} / R_{\text{free}}$ | 0.224/0.263  | 0.221/0.247 | 0.220/0.269  | 0.217/0.263 | 0.255/0.323 |

<sup>†</sup> Asymmetric unit, \* Photon Factory, \*\* SPring-8

### 【全体構造】

Hdj1 の C 末端側のドメインはプロトマーが非結晶学的な 2 回軸で関係付けられた、ねじれた蹄鉄型のホモダイマーとして存在する(図 2)。プロトマーは 11 本の  $\beta$  鎖(アミノ末端から  $\beta$ 1–11)と 3 本の  $\alpha$  ヘリックス( $\alpha$ 1–3)で構成される。プロトマーは大きく 3 つのドメイン、即ち Domain I, Domain II, C-terminal helix 領域に分けられ

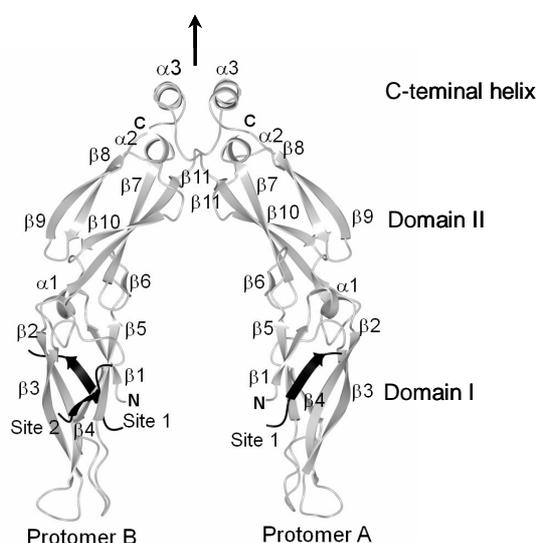


図 2. Complex I の構造

Hdj1 分子を灰色のリボンモデルで、結合したペプチド分子を黒色のリボンモデルで示す。非結晶学的な 2 回軸を矢印で示す。

る。Domain Iは3本鎖の $\beta$ シート( $\beta 1$ ,  $\beta 4$ と $\beta 5$ ), 2ターンの $\alpha$ 鎖( $\alpha 1$ )と2本鎖の逆平行 $\beta$ シート( $\beta 2$ と $\beta 3$ )で構成される。Domain IIは4本鎖の $\beta$ シート( $\beta 6$ ,  $\beta 7$ ,  $\beta 10$ と $\beta 11$ ), 2ターンの $\alpha$ 鎖( $\alpha 2$ )と2本鎖の逆平行 $\beta$ シート( $\beta 8$ と $\beta 9$ )で構成される。C-terminal helix領域はC末端に存在する3ターンの $\alpha$ 鎖( $\alpha 3$ )とループ領域(アミノ酸残基 321–327)から成る。Domain IIの $\alpha 2$ およびC-terminal helix領域に存在する疎水性のアミノ酸残基がダイマー界面に集まっており、疎水性の相互作用によってダイマーが形成される。

### 【ペプチド結合部位】

ペプチドはDomain Iにプロトマーあたり2箇所(サイト1, サイト2)に結合している。ペプチドの結合様式は、いずれの複合体構造においても同様のため、以下、分解能が高く、ペプチドの電子密度が明瞭に確認できたComplex IIIについて述べる。サイト1において、ペプチドはHdj1中の $\beta 2$ と逆平行 $\beta$ シートを形成する(図3A)。ペプチドのGlu638<sup>Hsp70</sup>, Glu639<sup>Hsp70</sup>, C末端のカルボキシル基が、Hdj1の表面に存在するLys184, Lys181, Lys182とそれぞれ静電相互作用している。

Peptide-free構造と比較すると、ペプ

チドの結合に伴い、Hdj1のHis166側鎖の向きが変化し、Hdj1表面に疎水性のポケットが現れ、そのポケットにIle637<sup>Hsp70</sup>側鎖が入り込むようにペプチドが結合している。

サイト2においては、ペプチドはHdj1中の $\beta 4$ と逆平行 $\beta$ シートを形成する(図3B)。Glu638<sup>Hsp70</sup>, Asp641<sup>Hsp70</sup>およびC末端のカルボキシル基がLys217, Lys306, Lys213と静電相互作用を形成している。Pro635<sup>Hsp70</sup>およびIle637<sup>Hsp70</sup>は広く平坦な疎水性の領域と相互作用している。

### 【変異体の解析】

構造解析の結果明らかとなった2つのペプチド結合部位が、変性蛋白質のリフォールディングに必要なのかを調べるために、サイト1またはサイト2のアミノ酸残基を変異させたHdj1, およびダイマー化に関わるC-terminal helix領域を欠損した単量体Hdj1を調製した。K182A(サイト1変異体), T216K(サイト2変異体)については、C末端側ドメインの結晶構造解析を行い(表2), 一方の結合部位(サイト1またはサイト2)に変異を導入しても、もう一方の結合部位(サイト2またはサイト1)に構造変化が起きておらず、ペプチドの結合が可能であることを確認した。Hdj1のコシャペロン活性を変性ルシフェラーゼの酵素活性の回復を指標に評価したところ、サイト1, サイト2を変異させたHdj1, および単量体Hdj1のコシャペロン活性は、野生型に対して有意に低下していた(図3)。このことから、Hdj1がコシャペロンとして機能するためには、Hdj1がダイマーとして存在し、かつサイト1とサイト2の両方が必須であることが示唆された。

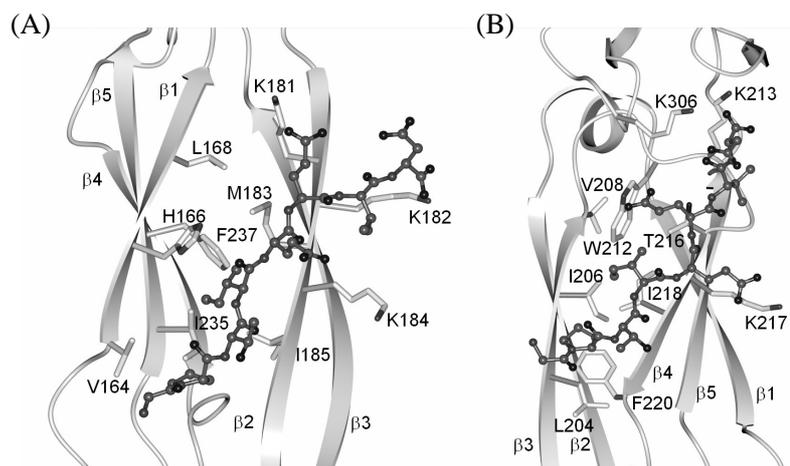


図3. ペプチド結合部位の構造

(A)サイト1, (B)サイト2。ペプチドをball & stickモデルで、Hdj1分子をリボンモデルで示す。Hdj1分子のうちペプチドとの相互作用に関わるアミノ酸残基の側鎖をstickモデル示す。

表 2. 回折強度データ収集と構造精密化

|                                     | K182Acomplex | T216K       | T216Kcomplex |
|-------------------------------------|--------------|-------------|--------------|
| Construct                           | D161-I340    | D161-I340   | D161-I340    |
| X-ray source                        | AR-NE3A*     | BL-5A*      | BL-5A*       |
| Space group                         | $P2_1$       | $P2_1$      | $P2_1$       |
| Unit cell parameters                |              |             |              |
| $a$ (Å)                             | 104.2        | 104.0       | 104.3        |
| $b$ (Å)                             | 41.0         | 41.1        | 41.0         |
| $c$ (Å)                             | 62.6         | 62.6        | 62.6         |
| $\beta$ (°)                         | 97.6         | 97.1        | 97.1         |
| Resolution limit (Å)                | 1.95         | 2.70        | 2.00         |
| Completeness (%)                    | 97.0         | 98.4        | 98.5         |
| $R_{\text{merge}}(I)$               | 0.096        | 0.078       | 0.088        |
| No. of protomers/ASU <sup>†</sup>   | 2            | 2           | 2            |
| No. of peptide/ASU <sup>†</sup>     | 3            |             | 2            |
| $R_{\text{work}} / R_{\text{free}}$ | 0.222/0.251  | 0.229/0.267 | 0.224/0.251  |

<sup>†</sup> Asymmetric unit, \* Photon Factory

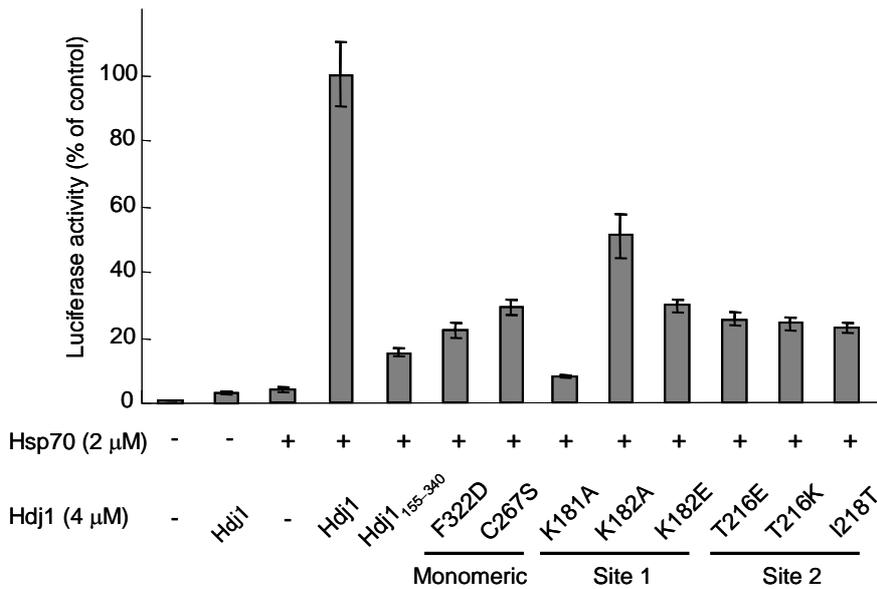


図 3. 変性ルシフェラーゼのリフォールディングに対する変異 Hdj1 の効果

### 【考察】

本研究では、ヒト Hsp40 である Hdj1 の C 末端側ドメインの構造および Hsp70 の C 末端ペプチドに対する 2 つの結合部位を明らかにした。特にサイト 2 に関しては、構造解析の結果新たに明らかとなった結合部位である。ペプチドとの特異的な相互作用が見られたことから、サイト 1 が Hsp70 の C 末端結合部位である可能性が考えられる。一方、サイト 2 は、幅広いアミノ酸配列を認識できると考えられるため、基質蛋白質の結合部位である可能性が考えられる。

本研究により得られた知見から、以下のような Hsp40 のコシャペロン機構が考えられる。まず、ホモダイマーとして存在する Hsp40 の一方のプロトマーがサイト 2 を介して変性蛋白質などの基質を結合する。次

に、もう一方のプロトマーがサイト1を介して Hsp70 の C 末端領域と結合し、三者複合体を形成する。この段階で、Hsp40 を介して、基質と Hsp70 が近接し、Hsp70 が基質を効率的に受け取ることが可能になる。その後、Hsp40 の N 末端に存在する J-domain により、Hsp70 の ATPase 活性が促進され、Hsp70 による基質のリフォールディングが進むと考えられる。

【参考文献】

1. Suzuki, H., Noguchi, S., Arakawa, H., Tokida, T., Hashimoto, M. & Satow, Y. (2010) *Biochemistry*, **49**, 8577–8584.
2. Suzuki, H., Noguchi, S., Arakawa, H., Tokida, T., Hashimoto, M. & Satow, Y. (2010) *Acta Crystallogr. Sect. F* **66**, 1591–1595.