

〔別紙 2〕

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 鈴 木 浩 典

熱ショック蛋白質である Hsp40 (Heat shock protein 40)は、代表的な分子シャペロンである Hsp70 のコシャペロンとして働き、蛋白質のフォールディングや会合、輸送、変性蛋白質の分解、凝集の抑制など、細胞内において重要な役割を担っている。

ヒト Hsp40 である Hdj1 は 340 アミノ酸残基からなり、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。Hdj1 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。

本論文では、X 線結晶構造解析により Hdj1 の C 末端側ドメインの単体および Hsp70 の C 末端ペプチド(⁶³⁴GPTIEEVD⁶⁴¹)との複合体の三次元構造を明らかにし、さらにその構造情報を基にした種々の変異体を作成し、その立体構造情報ならびにシャペロン活性を測定し Hdj1 と Hsp70 のシャペロン機構について三次元構造に基づいて考察している。Hdj1 の C 末端側ドメインを大腸菌で発現させ高純度のサンプルを得、PEG を沈殿剤として単体およびペプチドとの複合体の結晶を得た。さらにシンクロトロン放射光 X 線を用いて回折強度データを収集し構造を決定した。

Hdj1 の C 末端側のドメインは二量体として存在する。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 領域に分けられる。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。サイト 1 では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^{Hsp70} 側鎖が入り込むようにペプチドが結合している。このような相互作用様式から、サイト 1 が Hsp70 の C 末端認識部位である可能性が考えられる。サイト 2 ではペプチドは広く平坦な疎水性の領域と相互作用している。この領域は、

幅広いアミノ酸配列を認識できると考えられるため、サイト 2 が変性蛋白質などの基質を認識する部位である可能性が考えられる。

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 を調製した。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、変異 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。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、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。

これまで Hsp70 と変性タンパク質の結合サイトが同一であると提唱されていたが、本研究の成果により別々のサイトがあるというモデルを提唱した。このモデルであれば異なる基質認識のメカニズム、Hsp40 が二量体で存在すること、三者複合体の形成が可能であることなど合理的なコシャペロン機構を説明することが可能である。以上のように本研究は Hsp40 によるコシャペロン機構の解明に大きく貢献するものでありこれを行った学位申請者は博士（薬学）の称号を得るにふさわしいと判断した。