

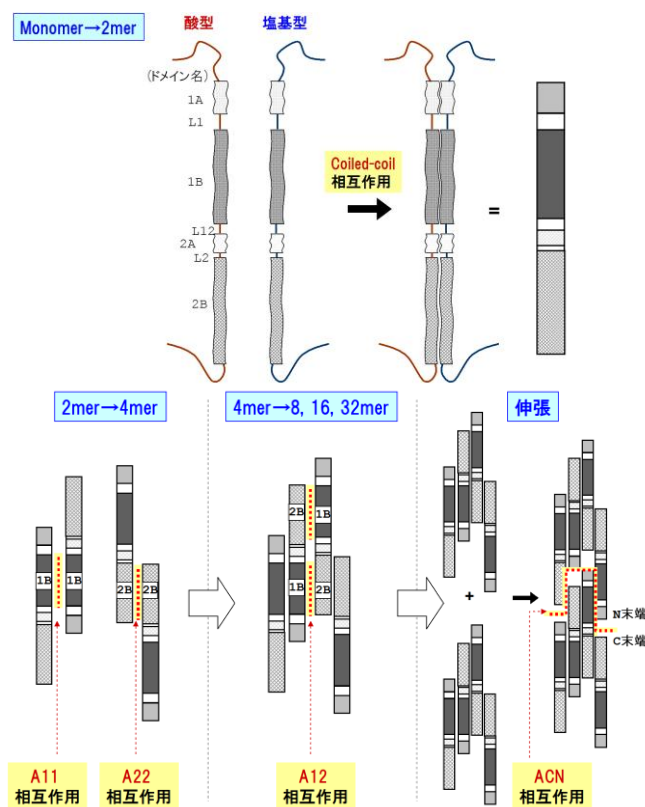
論文内容の要旨

論文題目 トリコサイトケラチン超分子複合体構造の制御系構築

氏名 石井 大輔

【緒言】

ケラチン蛋白質が構成する線維状複合体である中間径線維 (Intermediate Filament, 以下IF) は生体の種々組織たとえば皮膚や爪や毛髪さらに神経線維や細胞骨格の形成に寄与する蛋白質群である。^[1] その中で毛髪IFを構成するケラチンは、分子論的特徴として、酸型と塩基型との2種類に大別され、その両者がcoiled-coil ダイマーを形成し、このダイマーを基本単位としてテトラマー、8-mer、16-mer、32-merを形成し、32-merを単位構造体としてlateralな線維状巨視的分子を形成し、結果として毛髪の芯材として機能する(図1)。^[2] また発現上の特徴として毛胞近傍から発現するものや毛髪の伸長過程で発現するものなど複数種のIFが確認されている。^[3] IFが形成する線維構造をin vitroで再構成させる研究はSterinertらを中心に1970年代から着手されており、サイトケラチンやトリコサイトケラチンだけでなく、ビメンチンなど種々IF線維の再構成の実績が報告されている。^[1,4]



(図1) IF 構造の階層性。

IF 構造の階層性について簡単に図説する (図1)。IF は、前段でも述べた通り酸型ケラチンと塩基型ケラチンの2種類の蛋白質が形成するヘテロダイマーを最小限のビルディングブロックとしており、この酸型・塩基型ヘテロダイマーは coiled-coil 相互作用によって形成されることがわかっている。つづいてダイマー2つが、保存領域1Bドメインあるいは2Bドメインを用いて逆並行型に相互作用してテトラマーを形成する。この、1Bあるいは2Bの数字と、逆平行を意味するアンチパラレルの頭文字Aとを取って、これら相互作用は A11 相互作用あるいはA22 相互作用と定義されている。つづいてテトラマー2つがやはり逆平行に会合して8-merを形成する。この場合は一方のテトラマーの保存領域1Bドメインともう一方のテトラマーの保存領域2Bドメインとが相互作用するのでA12

相互作用と定義されている。同様の相互作用で

32量体まで形成され、その後、形成された32量体どうしが、長手方向に相互作用することでIFの伸長が実現する。この場合は一方の32量体のN末端ともう一方の32量体のC末端とが相互作用するのでACN相互作用と定義されている。以上のように、構造の階層性については明らかになっているものの、これらすべての相互作用の親和性等の物理化学的パラメタについては報告がないことに加え、作用機序は未解明であった。そこで、本研究は毛髪IFを対象とし、超分子複合体の構造形成について作用機序を熱力学的に記述し、IFの超分子複合体の構造形成を制御できる系の構築を目指した。

【実験と結果】

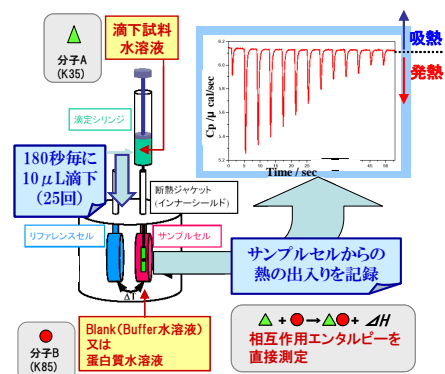
本研究では IF 線維再構成系の対象として、ヒト酸型 IF K35(旧称 hHa5)及びヒト塩基型 IF K85(旧称 hHb5)、の 2 種を用いた。IF それぞれをコードする遺伝子は化学合成によって得た。pET ベクターを用いた発現系を、それぞれについて定法に従って構築した。K35 及び K85 について、十分な発現量が確保できたことを確認した。大腸菌を宿主とした IF の大量発現を行い、収量よく獲得した。精製に際しては、回収菌体の超音波破砕物を 4%TritonX-100 によって洗浄に供したのちに超純水洗浄に供した。これらの試料について、K35 はゲルろ過にて、K85 は陰イオン交換クロマトグラフィーにてそれぞれ精製した。1 次元 SDS- PAGE によって純度 95%以上の精製物を獲得したことを確認した。

相互作用の熱力学的解析に等温熱滴定(Isothermal Titration Calorimetry; 以下ITC)を用いた。本手法の概要は、2 種の分子の間で生じる反応熱を、一方をもう一方に滴下して両者を出会わせることで測定する、というものである(図2)。IF会合体形成の各段階の熱力学パラメタを獲得するために以下の点に着目した。一点目は、IF会合体形成は溶媒条件を制御することでその会合体形成を途中で止めることができるということ(表1)、二点目は、等温熱滴定法により会合反応の開始から終了までの全熱量測定が可能であるということ、そして三点目は、2状態平衡を扱うために解析式を書き下せる、という点である。本研究では、酸型ケラチンK35を滴定シリンジに、塩基型ケラチンK85を測定セルにそれぞれロードし、K35が滴下されるごとに両者の間に発生する熱量を記録することで相互作用エンタルピーを直接測定した。測定画面には滴下ごとの熱の出入りがスパイクで表示され、上向きスパイクの場合は吸熱、下向きスパイクの場合は発熱が生じていることを意味する。スパイクの積分値をもとにしたカーブフィッティングより結合定数を算出し、直接測定したエンタルピーとこの結合定数とを用いてその他の物理化学パラメタを算出した。測定結果を図3に示す。

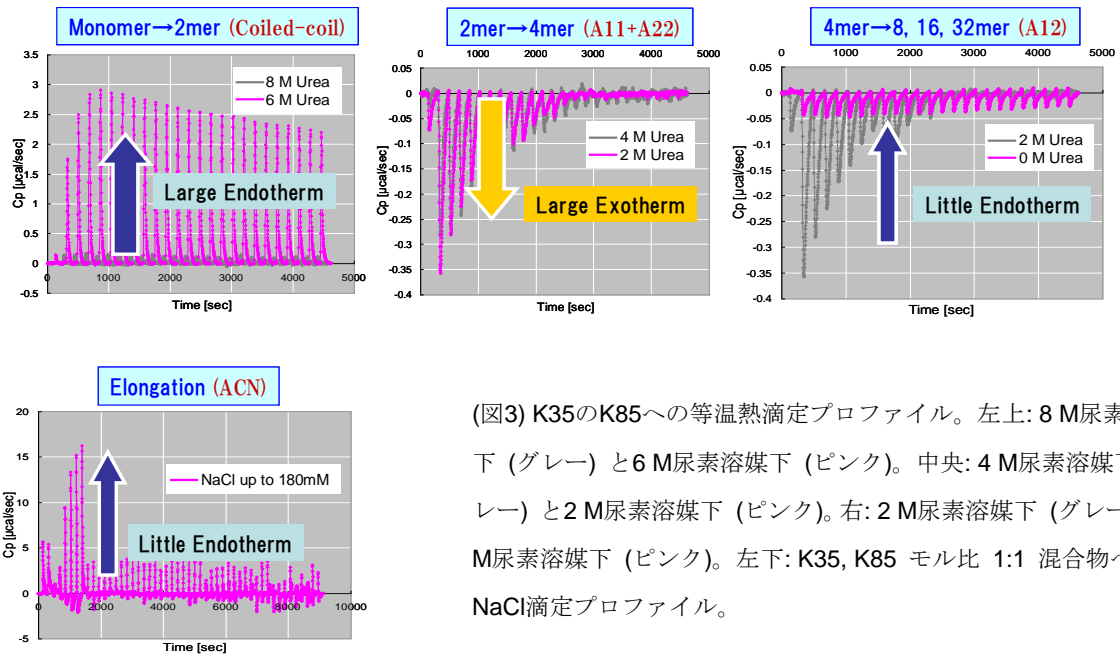
	溶媒条件	滴定条件	解析式 (二状態平衡)
monomer→dimer	8M Urea	K35→K85	単量体⇌二量体
2mer→4mer	6M Urea	↑	二量体⇌四量体
4mer→32mer	4→2→0M Urea	↑	結合表面⇌非結合表面
32mer→IF (elongation)	0M Urea + NaCl	1M NaCl → K35+K85	(全熱量測定のみ)

(表 1) IF 会合状態の溶媒依存性と対応する解析式。

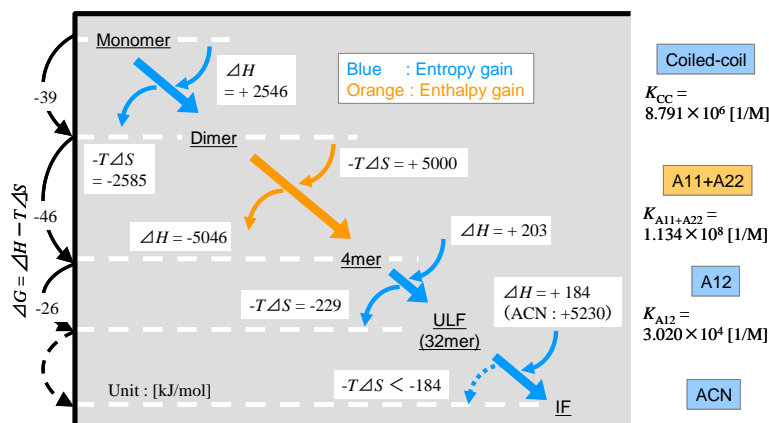
モノマーからダイマーへ、ダイマーからテトラマーへ、テトラマーから32-merへ、そして伸長、の4つの状態についてそれぞれの反応熱を測定した。それぞれの相互作用について、反応エンタルピーを獲得し、カーブフィッティングより結合定数を算出したのちに、これらエントロピーならびに自由エネルギーの値を算出した。結果の定量値を図4に示す。テトラマー形成のみ発熱反応であり、残りのダイマー形成や32-mer形成そして伸長はすべて吸熱反応であることが明らかとなった。また熱量の変化量としては、ダイマー形成およびテトラマー形成の場合が、それ以降の会合体形成と比較して一桁大きい値となっていた。結合定数も、ダイマー形成およびテトラマー形成の方が32-mer形成よりも圧倒的に大きな値を示していた。



(図 2) ITC の概要。



(図3) K35のK85への等温熱滴定プロファイル。左上: 8 M尿素溶媒下 (グレー) と6 M尿素溶媒下 (ピンク)。中央: 4 M尿素溶媒下 (グレー) と2 M尿素溶媒下 (ピンク)。右: 2 M尿素溶媒下 (グレー) と0 M尿素溶媒下 (ピンク)。左下: K35, K85 モル比 1:1 混合物への NaCl滴定プロファイル。



(図4) 各定量結果をもとに作成したケラチン相互作用のエネルギーダイアグラム。青色の矢印がエントロピー利得を、オレンジ色の矢印がエンタルピー利得を、それぞれ示す。

【考察】

IF 会合体形成の定量評価が可能となる基本実験系を構築することができた。本研究における解析結果から以下の二つの考察が可能である。(1) テトラマー形成時のエネルギー値の大きさと、テトラマー形成は A11+A22 相互作用で固有になされることより、A11+A22 相互作用が高次会合体を形成するための重要なビルディングブロックとなっていると考える。換言すると、A11+A22 相互作用を安定化させることが系全体のボトルネックであると考えられる。(2) つづいてそれ以降の高次構造形成の部分に着目すると、エネルギー値が比較的小さいことより、32-mer 形成やそれ以降の伸長反応は、テトラマー形成と比較して微妙な安定性のバランスで成立しているものと考えられる。換言すると、これら相互作用は外的因子によって容易に不安定化する可能性があるが、一方で回復の望みも十分にある。しかしながらテトラマー形成すなわち A11+A22 相互作用の部分を一たび不安定化してしまうと、その修復は大変に困難なものであると考察する。これら熱挙動から要請される各相互作用の分子機序について、以下に考察する。

i) coiled-coil 相互作用: ケラチン分子周辺の水分子の脱水和に由来するエントロピー利得が寄与しているものと考察する(図 5)。

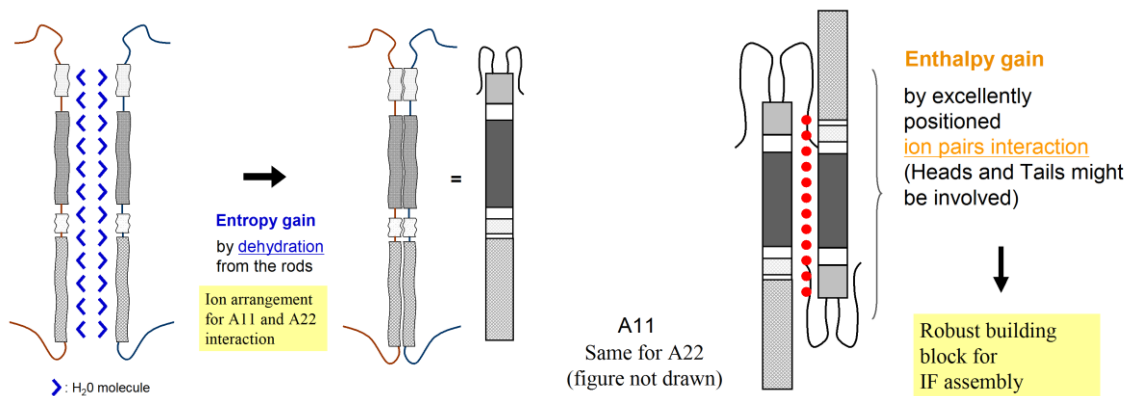
ii) A11, A22 相互作用: ダイマー分子表面の荷電残基間のイオン性相互作用に由来するエンタルピー利得が大きく寄与しており、結果として大きな発熱を検出したものと考察する(図 6)。

iii) A12 相互作用: テトラマー~16mer 分子近傍の水分子の脱水と、末端領域の分子

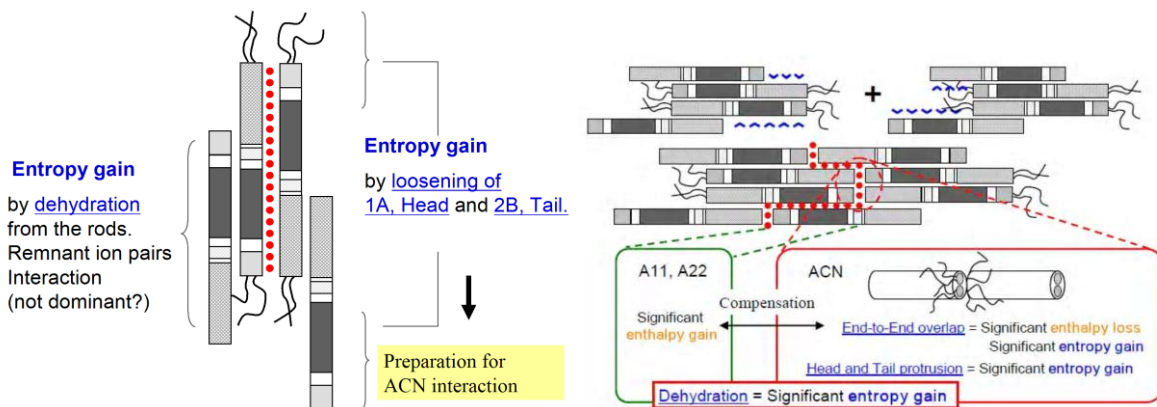
運動性の向上に由来するエントロピー利得が寄与しているものと考察する。末端領域の運動性向上は、このあとの伸長過程において重要な役割を果たす(図7)。

iv) ACN 相互作用: まず、ACN 相互作用は部分的に A11、A22 相互作用も関与している

(図8 緑色部分)。それにもかかわらず全体として吸熱すなわちエントロピー利得型である根拠は近傍水分子の脱水と iii)で示した末端領域の運動性向上との二点が大きく寄与して結果として全体でエントロピー利得となっているものと考察する(図8)。



(図5) 熱挙動から要請されるA11 相互作用分子機序。(図6) 熱挙動から要請されるA11+A22 相互作用分子機序。



(図7) 熱挙動から要請されるA12 相互作用分子機序。(図8) 熱挙動から要請されるACN 相互作用分子機序。

【引用文献】

- 【1】 Parry, D. A. D. et. al *Exp. Cell Res.* **313**, 2204-2216 (2007).
- 【2】 Parry, D. A. D. et. al *Q. Rev. Biophys.* **32**, 99-187 (1999).
- 【3】 Moll, R. et.al *Histochem Cell Biol.* **129**, 705-733 (2008).
- 【4】 Wang, H. et.al *J. Cell Biol.* **151**, 1459-1468 (2000).

【業績】

【学会発表】

Gordon Research Conference on Intermediate Filaments, poster presentation, June 2010.

Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society, poster presentation, September 2010.

Hair Science Symposium organized by the German Wool Institute, oral presentation, to be held on September 2011.

Annual Meeting of the Society of Polymer Science, Japan, poster presentation, to be held on September 2011.

【論文発表】

Ishii, D. et.al *J. Mol. Biol.* 2011.