

論文の内容の要旨

論文題目: 分子シャペロン Hsp70 の生化学・構造生物学的解析

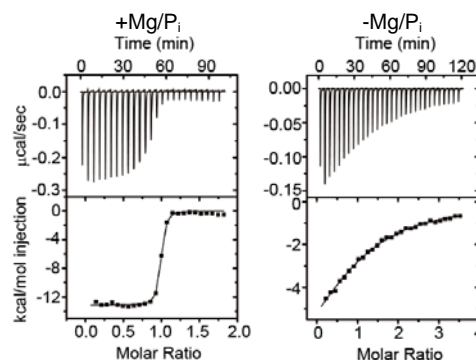
(Biochemical and Structural Analysis of the Hsp70 Molecular Chaperone)

氏名: 荒川 晶彦

Hsp70 (The 70-kDa heat shock protein) は、多くの生物に保存されている分子シャペロンで、タンパク質の適切なフォールディングや翻訳後の輸送を補助する。Hsp70 は、N 末端側のヌクレオチド結合ドメイン (NBD) と C 末端側の基質結合ドメイン (SBD) から構成され、ATP 依存的に作用する。Hsp70 に ATP が結合している時は、SBD の蓋が開いて、Hsp70 と基質の親和性は低い状態にある。ATP 加水分解反応後に Hsp70 が ADP 結合状態になると、SBD の蓋が閉じて、Hsp70 は基質をしっかりと掴んだ状態になる。その後、ADP-ATP 交換反応によって ATP 結合状態に戻ると、Hsp70 は基質を放出する。このような ATP 加水分解反応と ADP-ATP 交換反応から成る ATP サイクルによって、Hsp70 は分子シャペロンとして作用する。本研究では、生化学・構造生物学的手法を用いて、Hsp70 の作用機構を理解しようとした。

まず Hsp70 の高親和性 ADP 結合の分子機構を明らかにしようとした。Hsp70 の ADP-ATP 交換反応において ADP の解離速度は非常に遅いため、この交換反応は ATP サイクルの中で律速段階となることが知られている。そこで、ADP の結合をより詳細に理解するため、ITC (Isothermal titration calorimetry) アッセイを行った。その結果、 Mg^{2+} イオンが ADP の結合力を劇的に強め、さらに無機リン酸 (P_i) がその Mg^{2+} イオンの効果を促進することを見出した (図 1)。この Mg^{2+} イオンと P_i の作用を原子レベルで明らかにするため、 Mg^{2+} イオン・ P_i 存在下、及び非存在下での ADP 結合型 Hsp70 NBD の X 線結晶構造解析を行い、両者の結晶構造を比較した。NBD と ADP の直接の相互作用様式は同じものであったが、 Mg^{2+} イ

図 1 Hsp70 と ADP の結合実験



オンと P_i 存在下の ADP 結合型 Hsp70 NBD では, Mg^{2+} イオンが ADP の β -リン酸基に配位結合し, さらに水分子を介して Hsp70 の Asp10, Glu175, Asp199 の側鎖と相互作用していた. P_i は Mg^{2+} イオンと配位結合し, さらに Lys71, Glu175, Thr204 の側鎖と水素結合していた (図 2). ここで, Mg^{2+} イオンに水分子を介して相互作用している Asp10 と Asp199 に変異を導入したところ, ADP の結合力は著しく低下した. 以上の結果から, Mg^{2+} イオンと P_i が Hsp70 と ADP の間で相互作用ネットワークを形成し, それによって ADP の結合力を強めて ADP-ATP 交換反応を抑制することが示唆された (図 3).

図 2 Mg と P_i 存在下の ADP 結合型 Hsp70 NBD

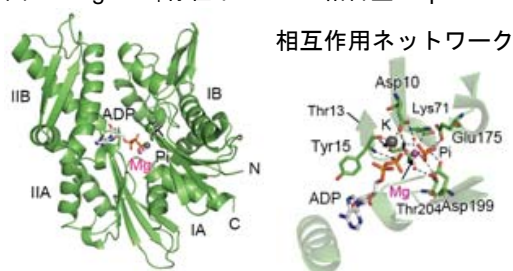
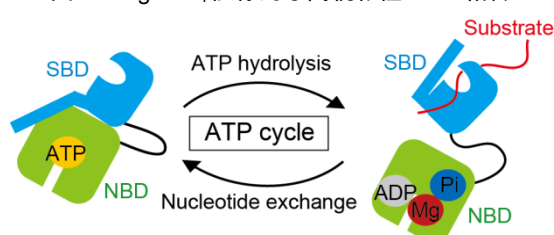


図 3 Mg と P_i 依存的な高親和性 ADP 結合



次に Hsp70 の相互作用因子 BAG5 (Bcl-2 associated athanogene 5) に注目した. BAG5 は, 3 本の α ヘリックスから成る BAG ドメインを 5 つ持ち (図 4), Hsp70 NBD に相互作用する. そして細胞内で BAG5 が過剰発現すると, Hsp70 と E3 ユビキチンリガーゼである Parkin の活性が低下し, タンパク質の凝集が促進されてパーキンソン病を発症することが報告されている. 一方, 多くの組織で BAG5 の発現が確認されており, 平常時の BAG5 の機能は明らかになっていない. 本研究では BAG5 の Hsp70 に対する作用機構を明らかにしようとした. まず, *in vitro* の結合実験により, BAG5 の 5 つある BAG ドメインの中で, C 末端側の BAG ドメイン, BD5 のみが Hsp70 NBD に強く結合することを見出した (図 4). そこで BAG5 BD5 と Hsp70 NBD から成る複合体を調製して X 線結晶構造解析を行った (図 5). 複合体の結晶構造で, NBD と相互作用している BD5 のアミノ酸残基 (図 6) をアラニン

図 4 BAG5 と Hsp70 の結合実験

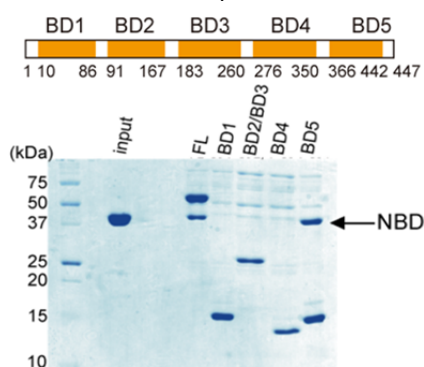


図 5 BAG5 BD5 · Hsp70 NBD の複合体の結晶構造

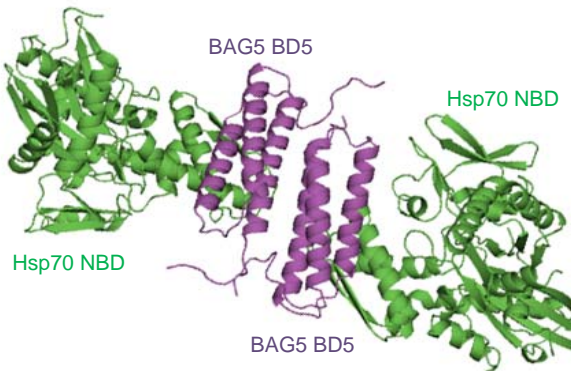
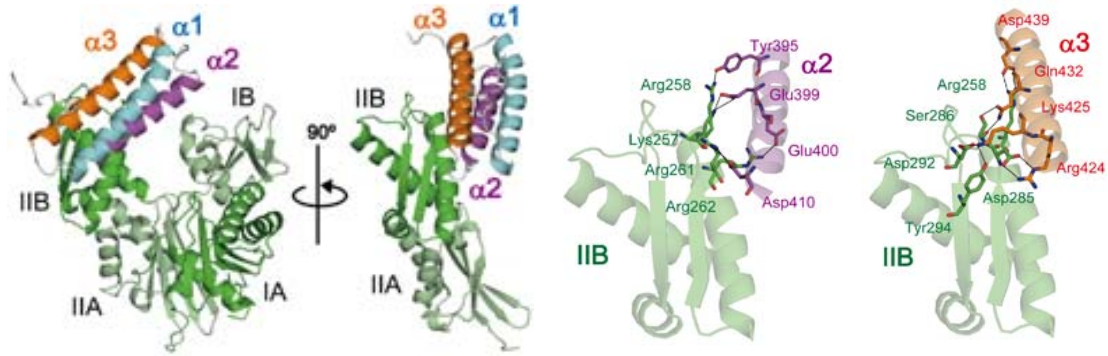
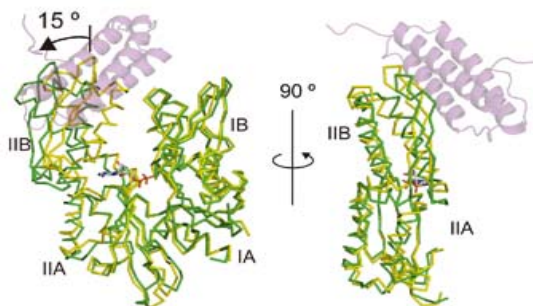


図6 BAG5 BD5 と Hsp70 NBD の相互作用様式



に置換したところ、NBD への結合活性が著しく低下した。従って、これらのアミノ酸残基がNBDとの相互作用に重要であると予想される。また、これらのアミノ酸残基は他の BAG ファミリータンパク質に保存されているのに対し、BAG5 の他の BAG ドメインには保存されていない。それによって、BAG5 の BAG ドメインの中で BD5 のみが NBD に強く相互作用すると考えられる。次に BD5 結合状態の NBD と ADP 結合型 NBD を構造比較したところ、BD5 結合状態の NBD の構造の方が全体的に開いた状態であることを見出した (図 7)。さらに ADP 結合部位に注目したところ、BD5 結合状態の NBD ではアデニン結合残基がリン酸基結合残基から離れた位置にシフトし、ADP が解離しやすい状態にあることが示唆された。実際に ITC アッセイにより、BD5 を加えると NBD と ADP の結合力が弱まることを確かめた。さらに Luciferase を用いた *in vitro* のリフォールディングアッセイを行ったところ、BAG5 は Hsp70 のリフォールディング活性を促進することを見出した。BAG5 は、BD5 を介して NBD に結合し、ADP の解離を促して Hsp70 のリフォールディング活性を促進したことから、Hsp70 のヌクレオチド交換因子として作用すると結論付けた (図 8)。一方、BAG5 が細胞内で過剰発現すると、Hsp70 は新たに ATP を取り込めず、それにより Hsp70 の活性が低下するのではないかと推測した。

図7 Hsp70 NBD の構造比較



Green: BAG5 BD5 結合型 Hsp70 NBD, Magenta: BAG5 BD5
Yellow: ADP 結合型 Hsp70 NBD, Stick model: ADP

図8 BAG5 による Hsp70 の活性化機構

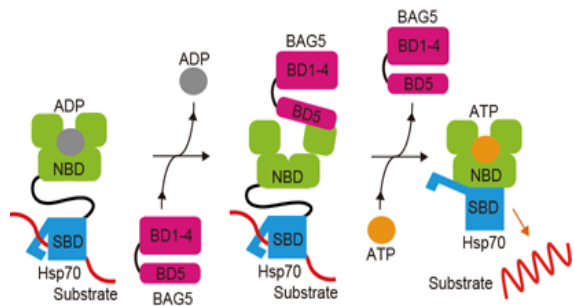
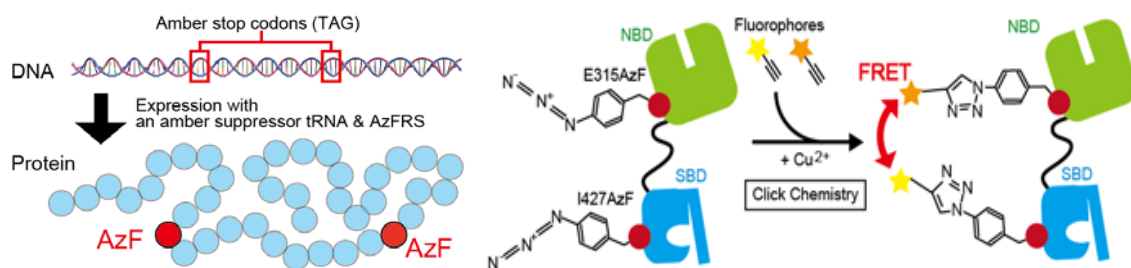


図9 分子内 FRET による Hsp70 のドメイン間相互作用解析



Mg²⁺イオンと P_iを介した相互作用ネットワークによって Hsp70 に ADP が強く結合し、ADP-ATP 交換反応は抑制される。そこで、このネットワークに関わる Asp10 と Asp199 に変異を導入して活性を測定したところ、どちらの変異体も ATP 加水分解活性を示したにも関わらず、リフォールディング活性を全く示さなかった。これらの変異体は ATP を加水分解して ATP サイクルを回すことができるが、それに伴う構造変化をすることができなくなっていると予想した。さらに結晶構造中で、Asp10 と Asp199 は Mg²⁺イオンと K⁺イオンに相互作用していたので、これらの金属イオンが Hsp70 全体の構造変化を ATP サイクルに対応させる役割を担っていると考えた。そこで、Hsp70 の NBD と SBD に非天然型アミノ酸、アジドフェニルアラニン (AzF) を 1 つずつ導入した。その後、アルキル基を持つ蛍光色素で標識し、分子内 FRET を検出することで Hsp70 の構造状態を観察しようとした (図 9)。その結果、Mg²⁺イオンと K⁺イオン存在下では Hsp70 の NBD と SBD は ATP 依存的にドメイン間相互作用するのに対し、Mg²⁺イオン又は K⁺イオンを除くと ATP 依存的なドメイン間相互作用しなくなることを見出した。さらに ADP 存在下で P_iを加えると、FRET 効率が低下してドメイン間相互作用がより抑制された。分子内 FRET の実験により、Mg²⁺イオンと K⁺イオンは ATP 依存的なドメイン間相互作用に重要で、ATP 加水分解後に生じた P_iは NBD と SBD の解離を促進することが示唆された。従って、Mg²⁺イオンと K⁺イオン、及び P_iは NBD と SBD のドメイン間相互作用を制御して、ATP サイクルに対応した Hsp70 の構造変化に重要であると考えられる。

Hsp70 は ATP サイクルに対応して構造変化しながら分子シャペロンとして作用する。ATP サイクルに対応した構造変化において、Mg²⁺イオンと K⁺イオン、及び P_iは重要であることを示した。一方、これらのイオンは相互作用ネットワークを形成することで ADP の結合力を強め、ADP-ATP 交換反応を抑制する。そこで細胞内では、BAG5 のようなヌクレオチド交換因子がその相互作用ネットワークを壊し、ADP-ATP 交換反応を促進していると考えられる。