

論文審査の結果の要旨

氏名 荒川 晶彦

Hsp70 は広く保存された分子シャペロンで、タンパク質の適切なフォールディングや翻訳反応後の輸送などを補助する。Hsp70 は N 末端側にあるヌクレオチド結合ドメイン (NBD) と C 末端側にある基質結合ドメイン (SBD) から構成され、ATP 加水分解反応と ADP-ATP 交換反応から成る ATP サイクルに対応して構造変化しながら作用する。5 章から構成される本論文では、生化学と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ている。

第 1 章は序論であり、研究の背景と概要が述べられている。

第 2 章では、Hsp70 の ATP サイクルにおいて ADP-ATP 交換反応が律速段階となる原因を明らかにしている。まず論文提出者は、ADP が Hsp70 に Mg^{2+} イオンと無機リン酸 (P_i) 依存的に強く結合することを生化学実験により示した。さらに X 線結晶構造解析により ADP 結合型 NBD の構造を明らかにし、 Mg^{2+} イオンと P_i を介した相互作用ネットワークが Hsp70 と ADP の間接的な相互作用を担って、ADP の結合を強めていると推測した。さらに Mg^{2+} イオンと P_i を介した相互作用ネットワークに関わるアミノ酸残基に変異を導入すると、ADP に対する親和性は低下することを示した。以上の結果から、 Mg^{2+} イオンと P_i 依存的に ADP は Hsp70 に強く結合し、それにより ADP-ATP 交換反応が抑制されていると結論付けている。

第 3 章では、Hsp70 の NBD に相互作用する BAG5 に注目している。まず論文提出者は、生化学実験により BAG5 の C 末端側にある BAG ドメイン (BD5) が NBD に強く相互作用することを示した。そして BD5 と NBD から成る複合体の X 線結晶構造解析を行った。複合体の構造から、BD5 は NBD のヌクレオチド結合ポケットを開いて ADP の解離を促すことが示唆された。実際に生化学実験により、BD5 は NBD の ADP に対する親和性を下げることが示した。さらに BAG5 は、BD5 を介して Hsp70 のリフォールディング活性を促進することを明らかにした。以上の結果から、BAG5 は Hsp70 のヌクレオチド交換因子として作用すると結論付けている。

第 4 章では、まず Hsp70 の Asp10 又は Asp199 に変異を導入すると、ATP 加水分解活性は維持されているにも関わらず、シャペロン活性は失われることを示した。論文提出者はこの理由として、この 2 つの変異体は ATP サイクルを

回すことができるが、それに対応して構造変化することができなくなっていると予想した。ここで、第 2 章で明らかにした ADP 結合型 NBD の結晶構造中で、Asp10 と Asp199 は Mg^{2+} 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 ATP サイクルに対応した Hsp70 の構造変化に重要であると仮説を立てた。この仮説を検証するため、論文提出者は非天然型アミノ酸アジドフェニルアラニンを用いた分子内 FRET の実験系を確立して、Hsp70 の構造状態を観察した。その結果、通常 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、 Mg^{2+} イオン又は K^{+} イオンを除くと ATP 依存的にドメイン間相互作用しなくなることを明らかにした。また ADP と P_i は NBD と SBD のドメイン間相互作用を協働的に抑制することも示した。これらの結果から、 Mg^{2+} イオンと K^{+} イオン、 P_i は Hsp70 のドメイン間相互作用を制御し、ATP サイクルに対応した Hsp70 の構造変化を可能にすると結論付けている。

第 5 章では総合討論が述べられている。まず、 Mg^{2+} イオンと K^{+} イオン、 P_i を介した相互作用ネットワークは、Hsp70 の構造変化や ADP の結合に重要であることを述べている。また、Hsp70 は ADP が強く結合する様に設計されているため、BAG5 などのヌクレオチド交換因子の重要性が指摘されている。

この様に、新規性のある結果と論理的な考察により、Hsp70 の作用機構が詳細に明らかにされた。

なお、本論文の第 2 章は、東京大学の横山茂之教授（現・理化学研究所 領域長）、理化学研究所の白水美香子、半田徳子博士との共同研究であり、第 3 章は横山茂之教授、白水美香子博士、半田徳子博士、理化学研究所の大沢登博士、木川隆則博士、林文晶博士、東京大学の志田明里博士（現・中外製薬株式会社）との共同研究であり、第 4 章は横山茂之教授、白水美香子博士、坂本健作博士、向井崇人博士との共同研究であるが、各章の内容に関して論文提出者が主体的に研究、分析、検証、及び論文執筆を行っていることから、論文提出者の寄与が十分であり、論文提出者は独自に研究を遂行できる能力を有していると判断する。

従って、博士（理学）の学位を授与できると認める。