

論文 / 著書情報
 Article / Book Information

題目(和文)	出芽酵母の脱凝集シャペロンHsp104と基質タンパク質の相互作用機序の解明
Title(English)	
著者(和文)	奥田桃子
Author(English)	Momoko Okuda
出典(和文)	学位:博士(工学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第9813号, 授与年月日:2015年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:田口 英樹,大谷 弘之,櫻井 実,上野 隆史,近藤 科江
Citation(English)	Degree:., Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第9813号, Conferred date:2015/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	要約
Type(English)	Outline

平成 26 年度 学位論文

出芽酵母の脱凝集シャペロン Hsp104 と
基質タンパク質の相互作用機序の解明

東京工業大学大学院

生命理工学研究科 生体分子機能工学専攻

奥田 桃子

指導教員 田口 英樹

【緒言】

タンパク質は不安定であり、しばしば凝集体を形成する。細胞には、凝集体の形成を防ぐシャペロンに加えて、いったん形成した凝集体を脱凝集するシャペロンがあることも知られている。出芽酵母の熱ショックタンパク質のひとつ Hsp104 は、ATP 依存的に Hsp70/40 (Ssa1/Ydj1) と協同して凝集したタンパク質をほぐし、活性のある状態に再生するシャペロンである。Hsp104 は六量体のリング構造を形成し、その中心の孔に基質を通すことで脱凝集を行なうと考えられている。Hsp104 の機能や作用機序は、主に生化学的手法や蛍光顕微鏡を用いた生細胞イメージングによって明らかにされてきたが、Hsp104 と基質タンパク質の相互作用の詳細や Hsp104 の動態については未解明である。そこで本研究では、Hsp104 と基質タンパク質の相互作用や脱凝集プロセスに着目し、Hsp104 と基質タンパク質の相互作用機序を明らかにすることを目的とした。

第 1 章 序論

本論文の背景および目的を記した。タンパク質のフォールディングと凝集体の形成について概説し、Hsp104 の機能や作用機序に関する知見について述べた。これまで行われてきた Hsp104 に関する研究に対しての課題を明示し、本研究の目的とアプローチを述べた。

第 2 章 ポリグルタミンにプリオン伝播性を付与するペプチドと Hsp104 の相互作用

出芽酵母内でアミロイドを形成するポリグルタミンにプリオンのような伝播性を付与するペプチド（プリオン化ペプチド）と Hsp104 の直接的な相互作用を解析した。まず、プリオン化ペプチド、およびプリオン化ペプチドの疎水性アミノ酸、芳香環アミノ酸を Ala、Ser、Thr に置換した変異体を融合した GFP を作製した。このプリオン化ペプチド融合 GFP を用いてゲルろ過を行なったところ、Hsp104 と相互作用している様子が見られた。ゲルろ過で見られた相互作用をより定量的に評価するために、FCS を用いて測定し、解離定数を算出したところ、プリオン化ペプチドは Hsp104 と強い親和性を、変異体は弱い親和性を示した。これらの結果より、Hsp104 は疎水性アミノ酸と強い親和性を示すことが示唆された。

第 3 章 凝集体のサイズ分布を評価する実験系の構築

本章では、Hsp104 の基質となる凝集体の性質を個別に調べる実験系を構築した。凝集したルシフェラーゼは、Hsp104/Ssa1/Ydj1 存在下で脱凝集することが知られている。そこで、凝集体の物性を詳細に解析する第一歩として、蛍光標識したルシフェラーゼ凝集体を斜光照明蛍光顕微鏡で直接観察し、1 粒子レベルで凝集体のサイズ分布を解析した。Hsp104 存在下では凝集体のサイズは小さくならないが、Ssa1/Ydj1 もしくは Hsp104/Ssa1/Ydj1 存在下ではサイズが小さくなることが明らかになった。さらに、斜光照明蛍光顕微鏡では解析することができない小さな凝集体に関しては、蛍光相関分光法（FCS）で凝集体の大きさを

経時的に測定した。その結果、Ssa1/Ydj1 存在下では凝集体の大きさに変化は見られなかったが、Hsp104/Ssa1/Ydj1 存在下では、凝集体は小さくなり、天然構造のルシフェラーゼと区別が付かないサイズとなった。このように、複数の手法を組み合わせることで、脱凝集の際の Hsp104/Ssa1/Ydj1 による凝集体のサイズ変化を明らかにした。また、Ssa1/Ydj1 は Hsp104 が存在しない条件で大きな凝集体が形成されるのを防ぐことが示唆された。

第 4 章 1 分子蛍光イメージングを用いた Hsp104 と凝集体の結合・解離観察

Hsp104 とルシフェラーゼ凝集体の相互作用における Hsp104 の動態を追うために、これらの結合・解離を 1 分子レベルで観察する実験系を確立した。まず、Cy5 で蛍光標識したルシフェラーゼ凝集体を biotin-neutravidin 結合を介してスライドガラス上に特異的に固定した。ここに、Cy3 で蛍光標識した Hsp104 および ATP を添加して全反射蛍光顕微鏡で観察したところ、Cy5-ルシフェラーゼ凝集体の位置に Cy3-Hsp104 の輝点が明滅する様子が見られた。この結合・解離の頻度は、Ssa1/Ydj1 依存的に上昇した。次に、Hsp104 がルシフェラーゼ凝集体に結合して解離するまでの時間を統計的に解析したところ、Ssa1/Ydj1 の有無に関わらず指数関数的に減少する 2 つの成分の反応からなることが示された。すなわち、Hsp104 は結合してから解離するまでの時間が速い成分 (3~4 秒) と遅い成分 (~30 秒) に分かれた。この 2 成分の割合は Ssa1/Ydj1 の有無で異なり、Ssa1/Ydj1 存在下では遅い成分の割合が増加した。また、この時間を Hsp104 の ATPase 加水分解速度と比較したところ、遅い成分において Hsp104 は凝集体に対して“processive”に作用している可能性が示唆された。

第 5 章 総括

本論文のまとめとその意義とともに、今後の展望について述べた。特に、本研究で構築した Hsp104 の 1 分子蛍光イメージング実験系の有用性や将来性について述べた。

【発表論文】

Odani W.*, Urata K.*, Okuda M.*, Okuma S., Koyama H., Pack CG., Fujiwara K., Nojima T., Kinjo M., Kawai-Noma S., Taguchi H. *Contributed equally to this work.

Peptide sequences converting polyglutamine into a prion in yeast. (2015) *FEBS Journal* **282**, 477-490

Okuda M., Niwa T., Taguchi H.

Single-Molecule Analyses on the Dynamics of Heat Shock Protein (Hsp104) and Protein Aggregates. *The Journal of Biological Chemistry* in press (2015)