

(様式2)

学位論文の概要及び要旨

氏 名 岩佐 尚徳 印

題 目 変性蛋白質の構造変化とその特性に関する研究

学位論文の概要及び要旨

大腸菌の熱ショック蛋白質であるコシャペロニンGroES (Hsp10)は、シャペロニンGroELと呼ばれるHsp60の補因子として働き、様々な蛋白質のフォールディング反応を補助する分子シャペロンとして知られている。しかしながら、蛋白質変性剤である塩酸グアニジン (Gdn-HCl) による特異的条件下において、GroESはアルツハイマー病に代表される神経変性疾患に共通して見られる蛋白質の凝集体「アミロイド線維」を形成する。神経変性疾患の原因蛋白質には溶液中で明確な立体構造を形成しない天然変性蛋白質であるものが多い。GroESのアミロイド線維は完全な変性状態から形成されることから、この実験系は、神経変性疾患と密接に関わり重要な課題である天然変性蛋白質のアミロイド線維メカニズムを理解するための良いモデル系になると考えられた。本研究では、原子レベルの分解能情報を取得できる溶液NMR (核磁気共鳴) 分光法を用いて、GroESのアミロイド線維形成メカニズムを詳細に調べた。

溶液NMR測定に必要な試料は、安定同位体 $[^{15}\text{N}]$ または $[^{15}\text{N}, ^{13}\text{C}]$ を含む培地中で大腸菌を培養し発現させることでラベル化し、その後の単離精製により $[^{15}\text{N}]\text{-GroES}$ または $[^{15}\text{N}, ^{13}\text{C}]\text{-GroES}$ を調製した。得られたラベル化GroESを1.6 M Gdn-HClによるアミロイド線維形成条件下に置き、溶液NMR分光法による一連の実験を行った。まず、変性直後のGroESについて二次元 $^1\text{H}\text{-}^{15}\text{N}$ HSQC測定を行ったところ、スペクトル上に現れたGroESの主鎖ピークは変性蛋白質に典型的な結果となり、 ^1H 軸では~1 ppmという限られた化学シフトの分散を示した一方で、 ^{15}N 軸では~24 ppmに渡って比較的良い分散を示した。HSQC上に検出されたGroESの主鎖ピークをアミノ酸配列上の個々の残基へと帰属するために、 $\text{C}\alpha$ と $\text{C}\beta$ の観測に通常使用される三次元CBCANHとCBCA(CO)NHに加え、精度を上げるために ^{13}C Oを観測する三次元HN(CA)COとHNCOの測定と解析を行った。Asn2とVal10は化学シフトの狭い分散が原因でHSQCスペクトル中に同定できなかったものの、GroES 97残基中、92個のピーク (N末端のMet, Pro5, Pro56を除く) の帰属に成功した。

この情報をもとに、アミロイド線維形成反応の経時的な $^1\text{H}\text{-}^{15}\text{N}$ HSQC測定を25°Cで行った。大変興味深いことに、アミロイド線維形成に伴って28日目では全てのアミノ酸残基のピーク

強度が全体的にゆっくりと76%まで減少した一方で、Val43-Leu57の15残基に渡る領域においては30-50%までの著しいピーク強度の減少が観測された。この変化に相応して、28日目のスペクトル中には新たな位置にGly46とGly52のピークが検出された。NMRの結果は、アミロイド線維形成過程中にVal43-Leu57に構造変化が起こった、可溶性の中間体分子種が観測されたことを示唆した。この領域は、以前に同定されたアミロイド線維中で堅い β -シート構造をとる核部位Asp58-Lys74とは異なり、その直前に位置する結果となった。蛋白質の主鎖のダイナミクスを反映する ^{15}NH の緩和について調べる ^1H - ^{15}N NOE、縦緩和速度定数 R_1 、横緩和速度定数 R_2 のデータ測定と解析を行った結果、「初期の変性状態」と「中間体分子種の集団」との間にはダイナミクス全体としては顕著な変化は見られなかった。この結果から、可溶性の中間体分子種はモノマーの状態であることが示唆された。

次に、Val43-Leu57の領域で起こる構造変化のメカニズムについて調べる実験を行った。GroESは1.6 M Gdn-HClによる変性状態から可逆的に7量体へとリフォールディングできることから、この性質を利用してnative-PAGEを行った。その結果、Gdn-HCl中で7-35日間インキュベーションしたGroESサンプルにおいて、正しく7量体へとリフォールディングできない複数の中間体分子種の分離に成功した。この分子種の形成に要するタイムスケールは、NMR測定で観測された中間体の形成に要する時間と一致した。Native-PAGEゲル中に見られた中間体分子種に対してリシルエンドペプチダーゼによるゲル内消化を行い、その抽出物に対してMALDI-TOF massによる測定を行った。Massスペクトル測定はNMRで検出された初期の構造変化を引き起こす部位が含まれる35-55番目のペプチド (STRGEVLAVGNGARILGENGG EVK (M+H)⁺ = 2198.18) に焦点を置いた。測定の結果、1 Daまたは2 Daの質量増加が観測された。この結果とNMRで観測されたAsn45, Gly46, Asn51, Gly52のピークにおける顕著な変化の結果を併せて考えると、Asn-Gly配列に起こる共有結合性の転位反応とつじつまが合っていた。この反応はアスパラギン残基が脱アミド化し、Asn-Glyの α 位のペプチド結合が β 位のペプチド結合へと転位することで、 β -アスパラギン酸残基を生じる反応である。

転位反応が真にアミロイド線維形成のトリガーを引くかどうかを確かめるため、Asn-Gly配列の転位反応が起こらない変異体となるシングル変異体N45AとN51A、そしてダブル変異体N45A/N51AのGroESを作製し、37°Cで振とうすることによってアミロイド線維形成実験を行った。アミロイド線維に特異的に結合するThioflavin-T蛍光色素を用いた蛍光強度測定の結果、核形成に要する時間はN45A/N51Aで12時間、N51Aで22時間となり、野生型の6時間と比べて長引く結果を得た。N45A変異体では5時間となり、野生型のものとおよそ同じ時間となった。シングルN51A変異体の効果が最も大きかったことから、特にAsn51-Gly52における β 転位がGroESのアミロイド線維形成を促進する重要な役割を担っていることが実証された。

本研究では、アミロイド線維形成条件下の変性状態GroESの主鎖ピークを初めて帰属し、隣接するAsn-Gly配列部位の構造変化が線維核領域に先立ってGroESのアミロイド線維形成の引き金となることを明らかにした。これらの成果は、神経変性疾患に関連する天然変性蛋白質の線維形成メカニズムに重要な知見を与え、意義深いと考えられる。