

(様式 2)

学位論文の概要及び要旨

氏 名 福井 直也 印

題 目 蛋白質工学的手法を駆使したシャペロニン GroEL のアミロイド線維凝集抑制機能開発に関する研究

学位論文の概要及び要旨

アルツハイマー病やパーキンソン病等の重篤な疾患の発症に関与していると考えられている要因の一つとして近年、天然変性タンパク質が注目されている。しかしながら、発症に直接的な影響を及ぼすその凝集経路及び凝集の抑制に関しては依然として不明な点が多い。例えば、生体内に存在している分子シャペロンである HSP40, HSP70, HSP104 等による天然変性タンパク質の凝集抑制効果は多数報告されているが、HSP60 では少数の報告しかされていない。そこで本研究では、大腸菌由来の HSP60 である GroEL による天然変性タンパク質の凝集抑制機構に注目し、研究を行った。シャペロニン GroEL は、60 kDa のサブユニットが 7 量体リングを形成し、2 つのリングが背中合わせにつながった 14 量体構造をとっている。サブユニットはアピカルドメイン、インターメディアイトドメイン、エクアトリアルドメインの 3 つのドメインからなる。各ドメイン間に存在している 2 つの Hinge と呼ばれる部位は GroEL の構造変化の支点となる。以前の研究において、Hinge II 部位における 192 番目の Gly 残基を最も大きいアミノ酸残基である Trp 残基に置換した変異体 GroEL G192W 変異体が作製され、そのシャペロニン機能の解析が行われた。その結果、ATP 非存在下でもアピカルドメインが上がっている「Open 構造」となっていることが判明している。そこで、本研究では、アミノ酸側鎖の大きさを表す指標であるファンデルワールス体積に注目し、Gly192 を様々なアミノ酸残基に置換した GroEL G192X 変異体を作製してより詳細な機能解析を行った。GroEL G192X 変異体は、置換したアミノ酸残基が大きくなるにつれてアピカルドメインの動作も抑制されていた。これらの変異体を使用して、A β 1-40 ペプチドと α -Synuclein のようなアミロイド線維化が生じる変性タンパク質との親和性を調べた。その結果より、G192X 変異体と変性タンパク質の親和性は、置換したアミノ酸残基のファンデルワールス体積の増加に比例して増加することを発見した。さらに、 α -Synuclein の線維化におけるいくつかの GroEL G192X 変異体及び GroEL WT 存在下における影響を比較した

ところ、GroEL G192X 変異体は線維形成を非常に強く抑制することが判明した。これに伴い、電子顕微鏡観察の結果においても形成される線維の形状が異なっているようにみられた。さらに、 α -Synuclein の線維形成段階における異なる時期での GroEL の添加は、G192X 変異体と GroEL WT では違う様相を示した。これらのことから、 α -Synuclein の線維化における GroEL WT と G192X 変異体は、アミロイド線維形成において異なった段階に影響していることが考えられた。Gly192 は置換したアミノ酸残基によりアピカルドメインの動作を調節した結果、アミロイド線維を形成するタンパク質との親和性が変化したことが線維形成に影響を及ぼしていると考えられた。すなわち、最も「Open 構造」となっている GroEL G192W は、 α -Synuclein と相互作用が最も生じたことによりアミロイド線維形成を最も効果的に抑制した。つまり、アピカルドメインが「Open 構造」をとり、溶媒中に露出していることが重要であることが強く示唆された。そこで、このことを立証するために、GroEL のアピカルドメインだけを単独に切り離した GroEL-AD によるアミロイド線維形成の抑制効果を調べることにした。その結果、 α -Synuclein、A β 1-42、GroES のアミロイド線維形成において GroEL-AD はその凝集と線維形成の抑制効果を示すことが判明した。従って、この GroEL-AD は、凝集や線維形成が生じるタンパク質の構造変化を測定したり、構造を修復する「ミニシャペロン」としても今後期待できると考えられる。

以上の結果より、GroEL の Hinge 部位の変異体が線維化するタンパク質の凝集を抑制することを初めて明らかにした。このことから、線維化が生じるタンパク質に対するシャペロニンの研究は今後さらに重要となり、ヒト由来の HSP60 タンパク質を用いることで生体内におけるアルツハイマー病やパーキンソン病等の原因タンパク質に対する現実的な疾患の新たな治療や予防に貢献できると期待される。