

ヒト分子シャペロン Hsp60 とそのアピカルドメインによる

$\alpha$ -synuclein 凝集・アミロイド線維形成抑制に関する研究

2020 年 7 月

山本 英絵



## 略号

6-OHDA	:	6-hydroxydopamine
AD	:	apical domain
ADP	:	adenosine diphosphate
ANS	:	8-anilino-1-naphthalenesulfonic acid
ATP	:	adenosine triphosphate
a.u. / AU	:	arbitrary unit
A $\beta$	:	amyloid beta
BH4	:	sapropterin dihydrochloride
BSA	:	bovine serum albumin
BiP	:	binding immunoglobulin protein
CCT	:	chaperonin containing T-complex polypeptide-1
CD	:	circular dichroism
$\Delta F$	:	the change in frequency
DNA	:	deoxyribonucleic acid
DTNB	:	5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)
DTT	:	dithiothreitol
Dithiobis (C <sub>2</sub> -NTA)	:	3,3'-dithiobis[N-(5-amino-5-carboxypentyl) propionamide-N',N'- diacetic acid] dihydrochloride
<i>E. coli</i>	:	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	:	ethylenediaminetetraacetic acid
EthD-1	:	ethidium homodimer – 1
FBS	:	fetal bovine serum
FCCS	:	fluorescence cross correlation spectroscopy
Gdn-HCl	:	guanidine hydrochloride
GFP	:	green fluorescent protein
GFP- $\alpha$ -synuclein	:	GFP-tagged human $\alpha$ -synuclein
GRP	:	glucose-regulated protein
HEPES	:	4-(2-hydroxyethyl) piperazine-1-(ethanesulfonic acid)
His-tag	:	polyhistidine-tag
Hsp	:	heat shock protein
IPTG	:	isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside
iPS cell	:	induced pluripotent stem cell
K <sub>d</sub>	:	the dissociation constant

$k_{\text{obs}}$	:	the apparent reaction rate
$k_{\text{off}}$	:	the dissociation rate
$k_{\text{on}}$	:	the association rate
LB	:	Luria-Bertani
MEM	:	minimum essential medium
MPTP	:	1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6- tetrahydropyridine
mRNA	:	messenger ribonucleic acid
N2a	:	mouse neuroblastoma Neuro2a cells
NAC	:	non-amyloid- $\beta$ component
NHS	:	N-hydroxysuccinimide
NTA	:	nitrilotriacetic acid
OD	:	optical density
PAGE	:	polyacrylamide gel electrophoresis
PAH	:	phenylalanine hydroxylase
PBS	:	phosphate buffered saline
PCR	:	polymerase chain reaction
PD	:	Parkinson's disease
PDB ID	:	protein data bank identification
PINK1	:	PTEN-induced putative kinase 1
PMSF	:	phenylmethylsulfonyl fluoride
QCM	:	quartz crystal microbalance
RFU	:	relative fluorescence units
rpm	:	revolutions per minute / rotations per minute
Rubisco	:	ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase
SDS	:	sodium dodecyl sulfate
-SH	:	sulfhydryl (thiol) group
shRNA	:	short hairpin ribonucleic acid
smFRET	:	single-molecule fluorescence resonance energy transfer
SOD1	:	superoxide dismutase type 1
TAT	:	trans-activator of transcription
TBS-T	:	tris buffered saline with Tween 20
TEM	:	transmission electron microscope
TH	:	tyrosine hydroxylase
TNB	:	5-mercapto-2-nitrobenzoic acid
TRiC	:	T-complex polypeptide-1 ring complex
TY	:	tryptone yeast extract

Tris	:	tris(hydroxymethyl)aminomethane
Triton X-100	:	4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl) phenyl-polyethylene glycol solution
Tween20	:	polyoxyethylene sorbitan monolaurate
UCSF	:	the university of California, San Francisco
V2R	:	vasopressin receptor 2
WSC	:	water soluble carbodiimide

# 目次

<b>第一章 序論</b> .....	- 1 -
1-1. はじめに .....	- 1 -
1-2. 分子シャペロン .....	- 2 -
1-3. Hsp60 グループ .....	- 5 -
1-4. 神経変性疾患関連タンパク質とアミロイド線維 .....	- 8 -
1-5. $\alpha$ -synuclein .....	- 10 -
1-6. PD 治療の現在とその課題 .....	- 12 -
1-7. PD 根本治療・予防法開発に向けた研究とその課題 .....	- 13 -
1-8. 神経変性疾患関連タンパク質と分子シャペロン .....	- 14 -
1-9. PD とヒト由来 Hsp60 .....	- 15 -
1-10. 本研究の目的 .....	- 17 -
<b>第二章 Hsp60 WT と Hp60 G190W 変異体の作製</b> .....	- 19 -
2-1. 緒言 .....	- 19 -
2-2. 材料と方法 .....	- 19 -
2-2-1. Hsp60 WT の培養・精製 .....	- 19 -

2-2-2. Hsp60 G190W(GW)の培養・精製 .....	- 23 -
2-2-3. ゲルろ過クロマトグラフィーによる Hsp60 GW の四次構造解析 .....	- 27 -
2-2-4. Hsp60 WT と Hsp60 GW の TEM 観察 .....	- 27 -
2-2-5. ANS 蛍光測定による Hsp60 GW の表面疎水性評価 .....	- 28 -
2-3. 結果 .....	- 29 -
2-3-1. ゲルろ過クロマトグラフィーによる Hsp60 の四次構造解析 .....	- 29 -
2-3-2. Hsp60 WT と Hsp60 GW の TEM 観察 .....	- 29 -
2-3-3. ANS 蛍光測定による Hsp60 の表面疎水性評価 .....	- 30 -
2-4. 考察 .....	- 32 -

### 第三章 Hsp60 GW 変異体による $\alpha$ -synuclein アミロイド線維化抑

制効果 .....	- 35 -
3-1. 緒言 .....	- 35 -
3-2. 材料と方法 .....	- 35 -
3-2-1. $\alpha$ -synuclein の培養・精製 .....	- 35 -
3-2-2. Thioflavin T による $\alpha$ -synuclein アミロイド線維化測定 .....	- 39 -
3-2-3. ゲルろ過クロマトグラフィーによる振盪前後の四次構造解析 .....	- 40 -
3-2-4. 透過型電子顕微鏡(TEM)観察 .....	- 40 -
3-2-5. CD スペクトル測定による $\alpha$ -synuclein の二次構造解析 .....	- 40 -
3-2-6. 免疫沈降法による $\alpha$ -synuclein と Hsp60 の結合解析 .....	- 41 -
3-2-7. QCM による $\alpha$ -synuclein と Hsp60 GW の相互作用解析 .....	- 44 -
3-2-8. $\alpha$ -synuclein アミロイド線維化過程における Hsp60 の遅延添加効果の検証 .....	- 46 -
3-3. 結果 .....	- 47 -
3-3-1. Thioflavin T による $\alpha$ -synuclein アミロイド線維化測定 .....	- 47 -

3-3-2. ゲルろ過クロマトグラフィーによる振盪前後の四次構造解析.....	- 47 -
3-3-3. 透過型電子顕微鏡(TEM)観察.....	- 48 -
3-3-4. CD スペクトル測定による $\alpha$ -synuclein の二次構造解析.....	- 49 -
3-3-5. 免疫沈降法による $\alpha$ -synuclein と Hsp60 の結合解析.....	- 50 -
3-3-6. QCM による $\alpha$ -synuclein と Hsp60 の相互作用解析.....	- 50 -
3-3-7. $\alpha$ -synuclein アミロイド線維化過程における Hsp60 の遅延添加効果の検証.....	- 51 -
3-4. 考察.....	- 53 -
<b>第四章 Hsp60 AD の単離と安定化.....</b>	<b>- 56 -</b>
4-1. 緒言.....	- 56 -
4-2. 材料と方法.....	- 57 -
4-2-1. Hsp60 AD の培養・精製.....	- 57 -
4-2-2. Hsp60 AD(Cys)の培養・精製.....	- 62 -
4-3. 結果.....	- 70 -
4-3-1. DTNB 試薬を用いた SH 基の比色定量.....	- 70 -
4-3-2. 温度変化における二次構造解析.....	- 70 -
4-4. 考察.....	- 71 -
<b>第五章 AD(Cys)による <math>\alpha</math>-synuclein アミロイド線維化抑制効果..</b>	<b>- 75 -</b>
5-1. 緒言.....	- 75 -
5-2. 材料と方法.....	- 75 -
5-2-1. Thioflavin T による $\alpha$ -synuclein アミロイド線維化測定.....	- 75 -
5-2-2. 透過型電子顕微鏡(TEM)観察.....	- 76 -



5-2-3. 免疫沈降法による $\alpha$ -synuclein と AD(Cys)の結合解析 .....	- 76 -
5-2-4. QCM による $\alpha$ -synuclein と AD(Cys)の相互作用解析 .....	- 77 -
5-2-5. $\alpha$ -synuclein アミロイド線維化過程における AD(Cys)遅延添加効果の検証.....	- 78 -
<b>5-3. 結果.....</b>	<b>- 79 -</b>
5-3-1. Thioflavin T による $\alpha$ -synuclein アミロイド線維化測定.....	- 79 -
5-3-2. 透過型電子顕微鏡(TEM)観察.....	- 79 -
5-3-3. 免疫沈降法による $\alpha$ -synuclein と AD(Cys)の結合解析 .....	- 80 -
5-3-4. QCM による $\alpha$ -synuclein と AD(Cys)の相互作用解析 .....	- 81 -
5-3-5. $\alpha$ -synuclein アミロイド線維化過程における AD(Cys)遅延添加効果の検証.....	- 81 -
<b>5-4. 考察.....</b>	<b>- 83 -</b>

## **第六章 細胞内での AD(Cys) による $\alpha$ -synuclein 凝集抑制効果 ... - 85 -**

6-1. 緒言.....	- 85 -
6-2. 材料と方法.....	- 85 -
6-2-1. GFP-SNCA プラスミド構築 .....	- 85 -
6-2-2. Neuro2a 細胞培養.....	- 87 -
6-2-3. GFP- $\alpha$ -synuclein 安定発現株樹立 .....	- 87 -
6-2-4. 6-OHDA による GFP- $\alpha$ -synuclein 凝集形成の観察 .....	- 88 -
6-2-5. AD(Cys)の細胞内導入.....	- 88 -
6-2-6. 細胞内での AD(Cys)による GFP- $\alpha$ -synuclein 凝集形成抑制効果の検証.....	- 88 -
6-2-7. AD(Cys)による細胞死抑制効果.....	- 89 -
<b>6-3. 結果.....</b>	<b>- 91 -</b>
6-3-1. 6-OHDA による GFP- $\alpha$ -synuclein 凝集形成の観察 .....	- 91 -
6-3-2. AD(Cys)の細胞内導入.....	- 91 -
6-3-3. 細胞内での AD(Cys)による GFP- $\alpha$ -synuclein 凝集形成抑制効果の検証.....	- 94 -

6-3-4. AD(Cys)による細胞死抑制効果.....	- 95 -
6-4. 考察.....	- 98 -
<b>第七章 総合考察.....</b>	<b>- 101 -</b>
謝辞.....	- 104 -
引用文献.....	- 105 -

# 第一章 序論

## 1-1. はじめに

生命の基本単位は細胞である。細胞の乾燥重量の多くを占めるタンパク質は、あらゆる細胞の機能、ひいては生命活動の実行役として働いている生体高分子である。従って、わたしたちの体内分子の機能解析や疾患の突破口を切り拓くためには、タンパク質の研究は不可欠である。

リボソームが mRNA の遺伝暗号を解読し、アミノ酸が連なったポリペプチド鎖(タンパク質)へと翻訳する。新生ポリペプチド鎖は折れたたまれ(フォールディング)、独特の立体構造が形成されることで、タンパク質としての機能を発揮するようになる(図 1-1)。タンパク質の構造は大きく分けて 4 つの階層に区別される。アミノ酸配列を一次構造、 $\alpha$  ヘリックスや  $\beta$  シートなどのポリペプチド鎖主鎖の周期的な規則構造を二次構造、アミノ酸側鎖間の相互作用を元に規定されるポリペプチド鎖全体の三次元立体構造を三次構造、そして、複数のポリペプチド鎖が非共有結合を介し集合して形成される構造を四次構造と呼ぶ。このポリペプチド鎖の立体構造形成は、リボソームによりポリペプチドが合成されている最中に開始され、アミノ酸側鎖の電荷や極性、構成原子のもつファン・デル・ワールス半径による制約を受けながら既定の立体構造へとフォールディングする。さらに、主鎖・側鎖の原子間における多数の非共有結合や、分子内・分子間のジスルフィド結合はタンパク質の立体構造の維持、すなわち安定性に寄与する。

数千～数万種のタンパク質が常時存在する細胞内環境では、約 2000 もの因子[1]がかかわる品質管理機構のもと、タンパク質の合成・フォールディング・分解が調整されており、細胞内環境が恒常的に維持されている。しかしながら、図 1-1 に示すように、熱や酸などの細胞内外のストレス環境下では、タンパク質分子内の構造安定性に寄与している結合

が開裂し、本来の立体構造が破壊されて、機能を失う（変性）ことがある。このようにして生じる変性タンパク質は、後述する分子シャペロンという特種なタンパク質の介在によって再度、元の構造（すなわち機能も）を回復するか、さもなければ分解され、細胞に有毒と考えられている凝集体形成への道を回避することになる。しかし、老化や繰り返しのストレスなどによってこの品質管理機構が破綻すると、細胞内の環境が維持されなくなり、その結果タンパク質は不安定化し、不溶性の凝集体が形成されるようになる。時間とともに蓄積されるタンパク質凝集体は様々な疾患の原因となることが知られている。

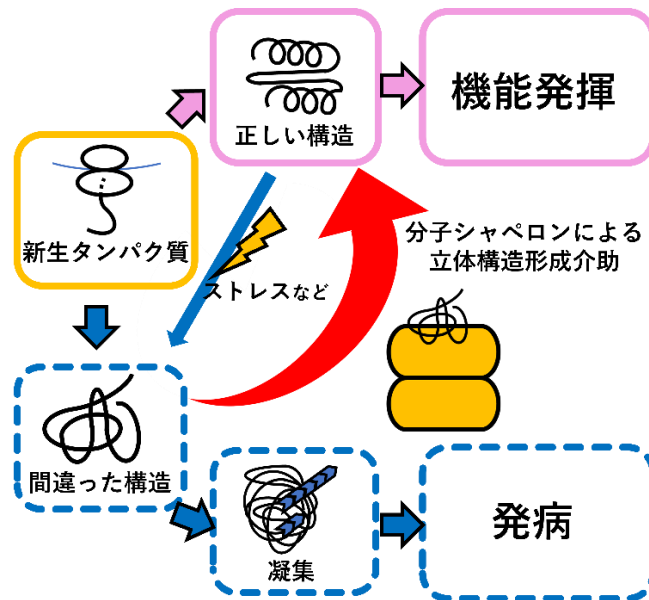


図 1-1. タンパク質の構造と分子シャペロン ([2]に基づく)

## 1-2. 分子シャペロン

1950 年代、Anfinsen らは RNA 分解酵素であるリボヌクレアーゼ A の立体構造に対する変性・再生実験を行なった。彼らは、活性をもったリボヌクレアーゼ A を高濃度の尿素と還元剤の中に入れ、完全に立体構造を失った変性状態にした後、この溶液から透析で尿素と還元

元剤を除去すると、リボヌクレアーゼAは再び元の立体構造を形成し、活性のあるリボヌクレアーゼAが再生することを見いだした。これにより、「タンパク質の天然の立体構造はアミノ酸配列により一意的に決定付けられる」という Anfinsen のドグマが確立された。この定説からは、タンパク質のフォールディングは他からのエネルギーや因子を必要としないと言い換えることができる。しかし、Anfinsen の実験は試験管内での現象を示したものであった。実際の細胞内は、タンパク質などの様々な分子が高濃度で存在する環境で、Anfinsen のドグマの実現は難しいと考えられており、多くの新生ポリペプチド（タンパク質）が分子シャペロンの介助を受けてフォールディングする。

分子シャペロンという言葉自体は、1978年に Laskey ら[3]によるヌクレオソーム形成の研究によって初めて用いられた用語であり、核質の酸性タンパク質（ヌクレオプラスミン）がヒストンに結合し、ヒストンの持つ正電荷の静電シールド（電荷の影響の抑制）に働いたことで、凝集を抑えたことを確認した実験結果に基づく。ヌクレオプラスミンは最終的なヌクレオソームの構成因子に含まれず、ヒストンとDNAの間違ったイオン間相互作用を防ぐことだけに働いた、という特徴を「分子シャペロン」と表現した。その後、Ellis[4]は、分子シャペロンという用語の定義をヌクレオプラスミンと同じような機能を持つタンパク質全般に一般化するよう提案した。つまり、相手タンパク質の最終構造の一部にもならず、その立体構造の指定もせずに、ポリペプチド鎖のフォールディングと正しいオリゴマー構造形成の介添えを行なうタンパク質全般を分子シャペロンと定義するよう提唱された。

この分子シャペロンの研究は、熱ショックによるショウジョウバエ唾液腺染色体のパフ（染色体の特定部位の膨張）出現を発見した Ritossa（1962年）に始まる[5]。染色体パフでは、ある特定のタンパク質群の mRNA が大量に作られ、そのタンパク質群が発現誘導されていることが見いだされた。これら転写亢進されていた一連のタンパク質は熱ショックタンパク質(Heat shock protein; Hsp)と総称され、その分子量に応じて Hsp60, Hsp70, Hsp90 などと命名された。Hsp の多くは分子シャペロンとして機能し、熱ストレスだけでな

く様々な物理的, 化学的, 生物学的環境ストレスでも発現誘導される。分子シャペロンの研究の進展に伴い, タンパク質の自発的フォールディングを説いた Anfinsen のドグマの恒常的な成立に疑問を投げかける報告が出され始めた。大腸菌のタンパク質である GroEL の遺伝子に変異があるとファージの形態形成がうまくいかないことが示された[6]。一方, 葉緑体では ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) が活性を持つのに必要な Rubisco 結合タンパク質は, Rubisco が高次構造形成するときだけ一時的に必要なことが示された[7,8]。1988年, GroEL と Rubisco 結合タンパク質のアミノ酸配列の相同性が高いことが報告され[9], 進化的に同一のタンパク質が熱ショックなどで構造を失ったタンパク質が構造を回復させるための介助をてがけていることが分かった。さらに同じ時期, McMullin ら[10]によって, GroEL がさまざまな種(織毛虫, 酵母, カエル, ヒト)の分子量 60,000 程度のタンパク質と抗原類似性を示すことが明らかにされた。このことから, これらのタンパク質は進化的に高度に保存された分子シャペロンであると考えられるようになり, 特別に「シャペロニン」という名前が提案された。

代表的な分子シャペロンを表 1-2 にまとめた。この中で, シャペロニン (Hsp60) システム (Hsp60, Hsp10) と Hsp70 システム (Hsp70, Hsp40, Nucleotide exchange factor) は進化的によく保存されており, 恒常的に高発現する重要な分子シャペロンである。また, 真核生物のミトコンドリアと原核細胞は, それらの分子シャペロンの構造や機能が近いことが知られている。

表 1-2. 主要な分子シャペロン ([11]と[12]に基づく)

	大腸菌	酵母			動物細胞		
		サイトゾル	小胞体	ミトコンドリア	サイトゾル	小胞体	ミトコンドリア
<b>Hsp60</b>	GroEL	TRiC/CCT		Hsp60	TRiC/CCT		Hsp60
<b>Hsp10</b>	GroES	Prefoldin?		Hsp10	Prefoldin?		Hsp10
<b>Hsp70</b>	DnaK	Ssa1-4 Ssb1-2	Kar2	Ssc1	Hsp72 Hsc73	BiP	Grp75
<b>Hsp40</b>	DnaJ	Ydj1	Sec63 Scj1	Mdj1-2	Hdj1	Mtj1	hTid1
<b>Nucleotide exchange factor</b>	GrpE	Sn11p		Mge1	Bag-1		mt-GrpE
<b>Hsp104</b>	ClpB	Hsp104		Hsp78			hHsp78
<b>Hsp90</b>	HtpG	Hsp82 Hsc82			Hsp90 $\alpha$	Grp94	Trap1
<b>small Hsp</b>	IbpA IbpB	Hsp26			Hsp27		

### 1-3. Hsp60 グループ

Hsp60 はよく研究された分子シャペロンの一つである。Hsp60 は、その構造によってグループ I 型とグループ II 型に分類される。グループ I 型 Hsp60 は真正細菌・ミトコンドリア・葉緑体などに存在し、コシャペロニン Hsp10 と協同してシャペロンとして働く。対照的にグループ II 型 Hsp60 は、古細菌や真核細胞の細胞質に存在し、コシャペロニン様の構造を自身に組み込んだユニークな構造をしている。

グループ I 型シャペロニンの代表例である大腸菌 GroEL は、構造や機能など詳細に分析され、分子シャペロンの研究を先導してきた。1989 年 Goloubinoff ら[13]は、変性した Rubisco が GroEL, GroES, ATP 存在下でフォールディングすることを初めて実証した。1990 年半ばには Xu らが GroEL-GroES 複合体の結晶構造解析を行なった[14]。この研究で、

GroEL は七量体のリング構造が2段に背中合わせで結合した14量体構造を形成し、さらにそこに七量体の GroES が結合して弾丸状の構造を完成させることが明らかにされた。GroEL のサブユニットは図 1-3 に示すように、アピカルドメイン (AD)、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と呼ばれる3個の明確に規定されたドメインから構成される。エクアトリアルドメインは ATP 結合部位を含んでおり、GroEL の機能を支える ATPase 活性はこのドメインが担う。AD にはポリペプチドや GroES との結合領域が存在し、変性タンパク質の認識と結合はこのドメインが主に担当する。GroES の結合にも関与する AD は、ATP の結合と加水分解に応じてダイナミックに構造を変化させることが実験的に示されている[15,16]。GroEL のエクアトリアルドメインに ATP が結合した後、AD が 90°ひねりながら上方に 60°立ち上がるが、2つのドメインを連結するインターメディアイトドメインとこのドメインの両端にある2箇所のヒンジ(蝶番)がこの複雑な動きを可能にしている。GroEL は、ポリペプチドを AD の疎水性表面に結合し、さらに ATP 依存的に GroES に結合することでポリペプチドを GroEL/GroES の内部空間に閉じ込める。ポリペプチドの個室となった GroEL/GroES 複合体の内部空間表面は親水性で、隔離された環境のポリペプチドは他の分子と相互作用することがないので、凝集せずにフォールディングすることができる。2009年 Machida ら [17]は AD を中心とした構造変化の要が、AD とインターメディアイトドメインの間のヒンジ (ヒンジ II) の 192 番目のアミノ酸残基グリシンであることを発見した。その後、2016年 Fukui ら[18]は、192 番目の位置に変異導入するアミノ酸残基のファン・デル・ワールス半径と GroEL 全体、特に AD の表面疎水性には相関関係があり、トリプトファンに変異させた GroEL G192W では GroEL/GroES 複合体形成時を模倣したオープン構造をとった AD 配向であることを見いだした。



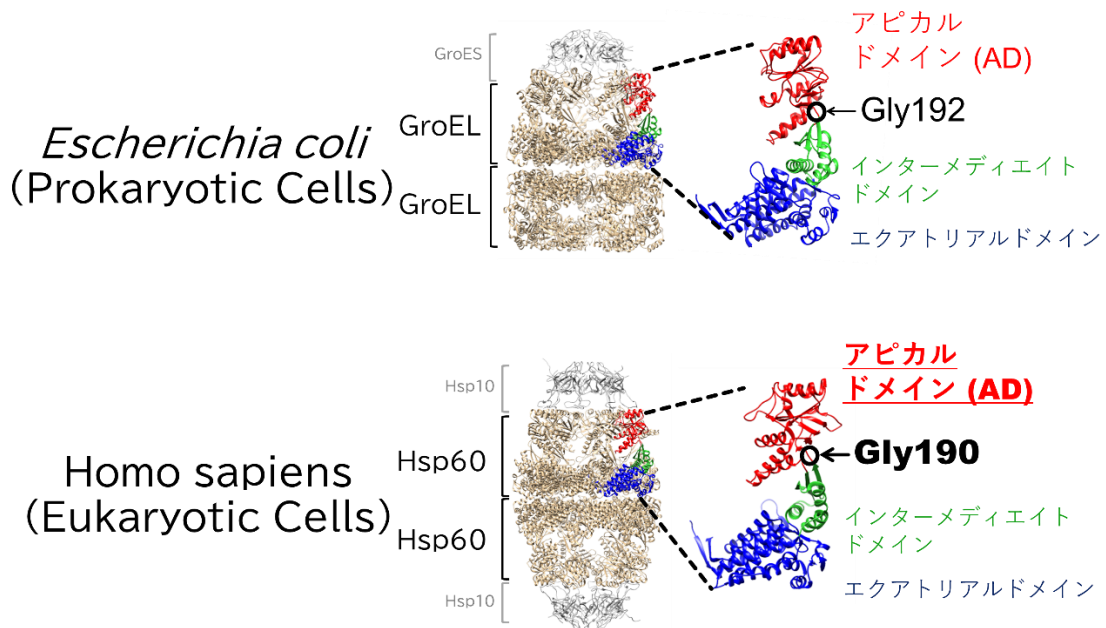


図 1-3. GroEL (上) と Hsp60 (下) の構造

ヒトミトコンドリア Hsp60 (以下、「Hsp60」と表記したものはミトコンドリア Hsp60 を示す) は真核細胞におけるグループ I 型シャペロニンの代表例で、GroEL と約 50% のアミノ酸配列相同性をもつ。図 1-3 に示すように七量体のリングが 2 段に背中合わせで重なった構造や ATP 依存的にコシャペロニン Hsp10 と協同して分子シャペロンとして働くなど、GroEL と構造も機能もよく一致する[19]。しかし、GroEL と Hsp60 には、その構造安定性やシャペロニンサイクルの差異も指摘されている。GroEL はヌクレオチド非存在下でも強固な 14 量体で存在するが、Hsp60 のオリゴマー形成は ATP に依存する。また、GroEL ではリング間に負の協同性があり、ポリペプチド・ATP・GroES が結合したリング (*cis*-リング) の ATP 加水分解が終わるまで、もう片方のリング (*trans*-リング) にはポリペプチド・ATP・GroES は結合できない。対照的に、Hsp60 ではリング間の負の協同性が見られない。また、GroEL の結晶構造は、1994 年 Braig ら[20]によって 2.8 Å の分解度で発表され、その三年後には GroEL-GroES 複合体の結晶構造が明らかになった[14]。リガンドの存在有無によ

る GroEL の劇的な構造変化を解析することができた。一方、Hsp60 は結晶化に難航したため、Hsp10 と安定な複合体を形成する Hsp60 E321K 変異体を用いて 2015 年に初めて報告された[19]。Hsp60 の構造解析はまだ始まったばかりと言える。

Hsp60 は全身に発現するが、特に副腎などの内分泌組織、肺、胃腸、腎臓、卵管で多く発現する[21,22]。細胞内ではリボソームで合成された後、ミトコンドリアに移行する。N 末端 26 残基は、疎水性アミノ酸残基が多く、ほぼ周期的に正電荷のアルギニンが配置されている。両親媒性  $\alpha$  ヘリックス構造を形成し、その螺旋の片側に正電荷のアルギニンが配置されると考えられている[23]。これらの特徴がミトコンドリア移行シグナルとして機能する。そこに Hsp70 が結合し、ミトコンドリアに移行後、シグナル配列と Hsp70 は除去され、ミトコンドリア内に移行した Hsp60 モノマー分子が会合し、多量体を形成する。Hsp60 は主にミトコンドリアに局在するが、一部は細胞質ゾル[24]、細胞表面[25]、細胞外[26,27]などにも存在する。

真核細胞にはグループ I 型の Hsp60 以外に、細胞質に局在するグループ II 型シャペロニンの TRiC/CCT[28]も注目に値する。GroEL や Hsp60 がホモオリゴマーであるのに対し、TRiC/CCT はヘテロオリゴマーであることが構造上の大きな違いである。また、GroEL や Hsp60 は疎水性相互作用を介して相手ポリペプチドと比較的広い特異性で結合するが、TRiC/CCT は基質認識特異性があり、部分的にフォールディングしたフォールディング中間体と結合するといわれている。さらに各サブユニットは異なる基質特異性を持つことなど、TRiC/CCT は非常に複雑な機構を備えた分子シャペロンである。

#### 1-4. 神経変性疾患関連タンパク質とアミロイド線維

細胞内の品質管理機構の破綻によって構造異常のタンパク質が蓄積すると、細胞に障害を与え神経変性疾患の発症に至る。神経変性疾患には、パーキンソン病(PD)やアルツハイマー

病, ハンチントン病を含むポリグルタミン病などがある[29]。

表 1-4. 代表的な神経変性疾患とその関連タンパク質

疾患名	関連タンパク質
パーキンソン病	$\alpha$ -synuclein
アルツハイマー病	A $\beta$ , Tau
ハンチントン病	Huntingtin
筋萎縮性側索硬化症	SOD-1
プリオン病	PrP <sup>sc</sup>

表 1-4 に示すように各疾患の原因とされているタンパク質は異なり, 例えば PD は  $\alpha$ -synuclein, アルツハイマー病はアミロイド  $\beta$ (A $\beta$ )や Tau, ハンチントン病は Huntingtin が細胞内外で凝集することで発病につながると考えられている。これらのタンパク質はアミノ酸配列や構造に相同性を持たないが, 変性すると不溶性の  $\beta$  シート構造に富む線維状の凝集体 (アミロイド線維) を形成するという共通点を持つ。アミロイド線維やアミロイド線維になるまでの中間体が細胞にダメージを与え, 疾患の原因になると考えられている[30]。

1854 年, 組織から取り出した凝集体がヨウ素デンプン反応を示したことから, Virchow[31]はその凝集体は多糖と推定し, アミロイドと命名した。その後, アミロイドの主要成分が微細な線維状のタンパク質であることが分かり, アミロイド線維と呼ばれるようになった[32]。クロス  $\beta$  シート構造が何本か束なってプロトフィラメントを形成し, さらにプロトフィラメントが会合し, 成熟アミロイド線維となる。蛍光色素 Thioflavin T は特異的にアミロイド線維に結合して蛍光を放つことから, 線維の検出色素として広く使用されている[33]。最終的なアミロイド線維の線維幅は 10 – 15 nm, 長さは数  $\mu$ m の枝分かれのない構

造である。アミロイド線維形成には、環境因子（疎水的相互作用・水素結合・温度・塩濃度・pH など）や生体内因子（脂質など）が複雑にかかわっており、その線維形成過程には一般的に、3つの段階が観察される[34]。段階1は、ラグフェーズとよばれ、モノマーが凝集し、後の線維の伸長を誘発する線維核を形成する。段階2は、伸長フェーズであり、線維核にモノマーが順に結合し、線維が素速く伸長する。段階3は、伸長飽和のフェーズである。線維伸長が飽和に達して止まり、線維が成熟する。段階2での線維の伸長方向については、双方向と一方向の報告があり、結論を得られていない。Blackley ら[35]や DePace ら[36]は A $\beta$  タンパク質や酵母プリオンタンパク質 Sup35 のアミロイド線維が双方向に伸長したと報告した。一方、Ban ら[37]や Inoue ら[38]は、透析アミロイドーシスの原因タンパク質  $\beta$ 2 ミクログロブリンや Sup35 のアミロイド線維が主に一方向に伸長したと報告した。Okumura ら[39]は、分子動力学シミュレーションで A $\beta$  タンパク質のアミロイド線維の両端に揺らぎの違いがあることを発見し、揺らぎの大きい先端側には新たな A $\beta$  ペプチドが結合しにくいいため、アミロイド線維は一方向にしか伸長しないと考察している。

## 1-5. $\alpha$ -synuclein

レビー小体と呼ばれる細胞内封入物は、PD 患者の中脳の黒質緻密部に見られ、主な構成物はアミロイド線維化した  $\alpha$ -synuclein であることが判明した[40]。レビー小体は、レビー小体型認知症患者の神経細胞からも検出され、認知症をおこす一因と考えられている。また、多系統萎縮症では  $\alpha$ -synuclein がグリア細胞質封入体としてオリゴデンドロサイトに蓄積することが報告され[41]、 $\alpha$ -synuclein の凝集・蓄積に関連する疾患を包括してシヌクレイノパチーと総称されている。 $\alpha$ -synuclein は 140 アミノ酸残基の天然変性タンパク質で、通常は決まった構造を持っていない。しかし、細胞膜のリン脂質のような負電荷の脂質に結合すると  $\alpha$ -synuclein の N 末端領域が  $\alpha$  ヘリックス構造を形成する[42]。生体内での  $\alpha$ -synuclein の四次

構造は単量体[43-45], または四量体[46-48]の複数の報告があり, 結論は得られていない。 $\alpha$ -synuclein は脳の脳皮質で主に発現し, 神経伝達物質の放出に関わると考えられている。細胞内では, 細胞質に最も存在し, 核[49]や細胞膜[50], ミトコンドリア[51,52]にも存在している。

$\alpha$ -synuclein は大きく分けて N 末端領域, NAC (non-amyloid- $\beta$  component) 領域, C 末端領域と呼ばれる 3 つの領域から構成され, 1 - 60 残基からなる N 末端領域は両親媒性で, KTKEGV の繰り返し配列の特徴を持つ。61 - 95 残基からなる NAC 領域はアミロイド線維形成の核になる疎水性の領域で, 96 - 140 残基からなる C 末端領域は酸性度が高く, 特定の構造を特にとらない[53]。何らかの理由で  $\alpha$ -synuclein が凝集すると, 規則的な構造のアミロイド線維が形成される。Fujiwara ら[54]は, レビー小体型認知症患者の脳から精製した不溶性  $\alpha$ -synuclein を切断後, 質量分析で解析し, 129 番目のセリン残基 (Ser) がリン酸化していることを示した。このことから, Ser129 のリン酸化はレビー小体の形成に密接な関係があると考えられている。また, アミロイド線維形成には C 末端の負電荷や 136 番目のチロシン残基も重要であると報告されている[55]。

2003 年に Braak ら[56]は, PD 患者の病理ステージとレビー小体の体内分布との関連を報告した。その後の研究で脳内の  $\alpha$ -synuclein の蓄積には, 鼻腔から嗅索を介して脳に至る経路と, 胃に分布する迷走神経を逆行して延髄に至る経路の二つの経路があると考えられている[57]。また 2008 年, 胎児の中脳細胞の移植を受けた PD 患者の剖検結果より, 移植した細胞にも  $\alpha$ -synuclein 陽性のレビー小体様封入体が検出された[58]。このことから,  $\alpha$ -synuclein がプリオン様に伝播し, 周囲へと病変を拡大させるという病態機序が提唱されている。

レビー小体内の  $\alpha$ -synuclein には Hsp27, Hsp60, Hsp70 など様々な分子シャペロンの共局在が報告されている[59]。Auluck ら[60]は, シャペロン活性の変化が PD の進行に関与している可能性があることを指摘した。レビー小体に分子シャペロンが隔離されるこ

とで、シャペロン活性が妨害され、細胞内は分子シャペロンの枯渇によって変性し、神経細胞の喪失につながっていると Auluck らは考察している。

## 1-6. PD 治療の現在とその課題

PD は、中脳の黒質ドーパミン神経細胞が減少することで発症する難病である。PD の歴史は古く、1817 年 Parkinson[61]が神経学的症候群として医学的に初めて紹介し、Shaking palsy (振戦麻痺) という病名を付けた。その後、Charcot らはこの疾患には振戦型以外に硬直・無動型があることを指摘し、Parkinson's disease (PD) と命名することを提唱した[62]。現在では、PD は高齢者で発症率が高く、60 歳以上ではおよそ 100 人に 1 人がかかることが明らかになっている。PD 発症には、患者が年齢を重ねた「加齢」、患者の仕事（農薬の使用など）・食生活・住環境などの「環境因子」、遺伝子変異による「遺伝的因子」という 3 つの要因が絡んでおり、発症原因の解明は難しいとされている。そのため、根治治療や病気の進行を食い止める薬剤開発が困難である。PD 患者には、ふるえやこわばりといった運動症状や、便秘やうつなどの非運動症状も現れることがある。組織学的な所見では、PD の黒質や青斑核に神経細胞の胞体内に円形で同心円状の芯を持つ封入体（レビー小体）が見られる。現在の治療の基本は薬物療法で、少なくなったドーパミンを補う。薬の効果が見られない患者や継続的な服用で薬効に変化が生じた場合などには手術療法として脳内に電極を入れて視床下核を刺激する方法が用いられる。しかし手術療法は、特殊な技術を要するため限られた病院でのみ実施される。さらに近年では、iPS 細胞 (induced pluripotent stem cell, 人工多能性幹細胞) を用いた治療が進められているが、iPS 細胞による再生医療は、治療効果とコストが未知数であるという課題を抱えている。また、薬物療法・手術療法・iPS 細胞による再生医療は、PD の原因を根本的に治す治療法ではなく、症状を緩和する対症療法である。いずれの治療法でも、脳内で減ったドーパミンを増やすことを目的としており、細胞内で  $\alpha$ -

synuclein のアミロイド線維が蓄積する原因を取り除いていない。そこで PD の根本治療や予防法の開発のため、レビー小体の出現、つまり  $\alpha$ -synuclein の蓄積・アミロイド線維化を抑える研究が求められている。

## 1-7. PD 根本治療・予防法開発に向けた研究とその課題

最近の研究では、核酸医薬を用いて  $\alpha$ -synuclein の mRNA を断片化し、タンパク質の合成を抑制することで  $\alpha$ -synuclein の蓄積を防ぐことが期待できると報告されている[63]。一方で、 $\alpha$ -synuclein のサイレンシングによって黒質ニューロン内に炎症反応が起き、細胞死につながったという報告があり[64]、慎重に検証を進める必要がある。さらに、核酸医薬品は一般に、核酸分子の生体内での不安定性やオフ・ターゲット効果、副作用の懸念、ドラッグデリバリーシステムの困難性などの課題が指摘されている。また、内因性ラット *SNCA* 転写産物を標的とする shRNA をアデノ随伴ウイルスベクターで送達して  $\alpha$ -synuclein の遺伝子をサイレンシングすると、ロテノンによって引き起こされる PD 運動症状の緩和が報告された[65]。しかし、遺伝子治療の課題は、安全性である。1999 年には、大量に投与されたアデノウイルスベクターに対する過剰な免疫反応によって治験患者が死亡した。さらに 2002 年には、レトロウイルスベクターを用いた治療法で遺伝子の挿入変異が起き、T 細胞白血病様症状の発症が確認された。現在はベクターの研究開発によって明らかな有害事象は報告されていないが、遺伝子治療はまだ研究の段階にあり、完成した治療方法ではない。栄養学の側面からの PD 予防の研究も進められている。PD 原因遺伝子の一つである *PLA2G6* に変異があると、リン脂質に変化が生じ、 $\alpha$ -synuclein の凝集を誘発する。Mori ら[66]は、変異型 *PLA2G6* のキイロショウジョウバエにリノール酸を含む餌を与えたところ、リン脂質の変化を抑え、 $\alpha$ -synuclein の凝集も抑制されることを報告した。しかし、キイロショウジョウバエとヒトでは、リン脂質の膜成分に違いがあるため、この研究結果がヒトに適用できるかは定かではな

い。また、カフェインやアルコール摂取、喫煙による PD リスク抑制効果についての報告がある[67]が、作用メカニズムは明らかになっていない。さらにこれらの嗜好品摂取は、病前性格との関わりも指摘されており、現在のところ PD 発症リスクとの関連は証明されていない。

## 1-8. 神経変性疾患関連タンパク質と分子シャペロン

分子シャペロンには、他のタンパク質の立体構造形成介助などの機能がある。そもそも、変性疾患の一次的要因は原因タンパク質の構造変化による凝集体形成である。そこで、分子シャペロンによる神経変性疾患関連タンパク質の凝集体形成制御について様々な検証がされている。

Kundel ら[68]は、蛍光ラベルを付けた Hsp70 と Tau を用いて一分子 FRET (single-molecule fluorescence resonance energy transfer, smFRET) 解析結果から、Hsp70 は Tau の線維核形成の抑制に働き、凝集プロセスの初期段階に存在するオリゴマーを安定化することを示した。Taguchi ら[69]は、脱凝集の働きをすることで知られる Hsp110 をマウスに遺伝子導入し、脳内で  $\alpha$ -synuclein の凝集抑制やアミロイド線維の伝播を抑制すること、さらに Hsp110 が広範なシャペロン機能を増強することを示した。また、Gorbatyuk ら[70]は GRP78/BiP が  $\alpha$ -synuclein と複合体を形成し、小胞体ストレス応答をリプログラミングすることで、神経保護的役割を果たすと報告した。Cox ら[71]は、低分子 Hsp が  $\alpha$ -synuclein のアミロイド線維に結合して伸長を防ぎ、線維表面の疎水性を低下させることでアミロイド線維の細胞毒性を抑制することを報告した。また、Ekimova ら[72]は毒性のない低分子化合物の発現誘導剤 U-133 での Hsp70 発現亢進による PD モデルラットの神経保護効果を示した。近年、遺伝子導入法に代わる技術として注目されているタンパク質導入法で分子シャペロンの PD 予防への研究も進められている。細胞膜透過ペプチドを融合させた Hsp70 タンパク質(TAT-Hsp70)



添加によって細胞やマウス体内の神経保護効果が見られた[73]。さらに TAT-Hsp70 の脳へのターゲティング研究も行われている[74]。

Hsp60 グループの分子シャペロンによる神経変性疾患関連タンパク質の凝集抑制効果についても報告されている。Sot ら[75]は TRiC/CCT が  $\alpha$ -synuclein の凝集抑制の効果を示した。TRiC/CCT のサブユニットの一部が Huntingtin の凝集抑制に効果を示したことで治療への応用が期待されている[76]。我々の研究室の先行研究で、グループ I 型の大腸菌 Hsp60 である GroEL の AD の配向が  $\alpha$ -synuclein のアミロイド線維化に強い影響を与えることを示した。GroEL のヒンジ II の 192 番目のグリシンをトリプトファンに変異させた GroELG192W 変異体は AD が上方に押し上げられたオープン構造を持ち、アミロイド線維化に対して強力な抑制効果を持つことが示された[18]。さらに、単離した GroELAD も  $\alpha$ -synuclein や A $\beta$ <sub>1-42</sub> のアミロイド線維化を抑制し、ミニシャペロンとして機能することを示した[77]。しかし、GroEL は大腸菌の分子シャペロンであり、ヒトなど哺乳類への適用には限界があり、現実的なヒトの病気の治療や予防という点ではまだ解決しなければならない問題が残っている。

## 1-9. PD とヒト由来 Hsp60

PD 発症には、 $\alpha$ -synuclein が重要なカギを握ると考えられるが、他にも PD 発症に関連する因子が存在する。DJ-1 遺伝子はがん遺伝子であると同時に家族性 PD 遺伝子としても同定されている。Jin ら[78]は PD モデル細胞をプロテオミクス解析し、 $\alpha$ -synuclein と DJ-1 の両方に関連する複合体内の相対存在量が電子伝達系阻害剤ロテノン処理後に有意に増加したタンパク質の一つとして Hsp60 を検出した。PINK1 と Parkin は常染色体劣性若年性 PD の原因遺伝子産物である。Rakovic ら[79]は PINK1 の基質を調査し、既知の結合パートナー (Hsp90, CDC37) に加え、Hsp60 を含む 12 のタンパク質を同定した。Davison ら[80]は、Parkin と相互作用するタンパク質の探索を二次元電気泳動法とタンデムアフィニティー精

製法で行ない、質量分析法で同定した。Hsp60 を含む 4 つのタンパク質が両方の方法で共通して検出された。また、Hsp60 はプロテアソーム阻害剤 MG132 に対して強い反応は見せず、Parkin と間接的に相互作用していることも示された。14-3-3 はレビー小体での検出が報告され[81]、Parkin ノックアウトマウスで発現が抑制されるタンパク質である[82]が、Hsp60 は 14-3-3 と特異的に結合する[83]。さらに、Monti ら[84]は、電子伝達系阻害剤 MPP+処理による神経のプロテオミクス研究のメタ分析と細胞のミトコンドリアプロテオーム解析で得られた結果を比較した。Hsp60 はタンパク質-タンパク質相互作用ネットワークのハブ(中枢)であることが示された。ミトコンドリアストレス応答において Hsp60 が極めて重要な役割を担っていることが分かった。また、神経毒 6-OHDA により損傷を受けた PD モデルラットにヒト臍帯間葉系幹細胞と、それ由来のドーパミン作動性ニューロンを移植すると、運動症状の改善と脳内の Hsp60 発現亢進が見られたことから、Hsp60 が行動回復のメカニズムに関与している可能性が示された[85]。以上のように多数の研究結果から、Hsp60 は PD 関連タンパク質に作用することが示され、疾患の予防や治療への有用性が予想される。

近年、アルツハイマー病関連タンパク質である  $A\beta_{1-40}$  の Hsp60 によるアミロイド線維化抑制効果が報告された[86]。しかしながら、Hsp60 による  $\alpha$ -synuclein の凝集やアミロイド線維化抑制効果についてはこれまで明らかにされていない。PD において Hsp60 は重要な分子シャペロンであるにもかかわらず、PD の根本治療・予防法開発への Hsp60 の適用についてはこれまで十分に研究されてこなかった。新しい着眼点である Hsp60 など幅広い角度からのアプローチが、急速に進む高齢化に伴う PD 患者増加抑制につながると考えられる。

## 1-10. 本研究の目的

ヒト由来 Hsp60 は PD において重要な因子であるにもかかわらず、 $\alpha$ -synuclein の凝集抑制効果は検証されてこなかった。そこで、本研究ではヒト Hsp60 による  $\alpha$ -synuclein の凝集・アミロイド線維化抑制効果について *in vitro* による研究と細胞を用いての研究を詳細に行なった。本学位論文は、七章で構成されている。

【第一章 序論】では、本研究の背景として、Hsp60 を中心とした分子シャペロンや PD 関連タンパク質である  $\alpha$ -synuclein、また本論文の目的および構成について述べた。

【第二章 Hsp60 WT と Hsp60 G190W 変異体の作製】では、Hsp60 の AD の配向変化による四次構造や表面疎水性への影響について調べた。

【第三章 Hsp60 GW 変異体による  $\alpha$ -synuclein アミロイド線維化抑制効果】では、Hsp60 WT や Hsp60 GW 変異体と  $\alpha$ -synuclein との相互作用解析やアミロイド線維形成抑制効果について分析した。

【第四章 Hsp60 AD の単離と安定化】では、Hsp60 の AD 単離とシステイン残基導入による構造安定化について述べた。

【第五章 AD(Cys) による  $\alpha$ -synuclein アミロイド線維化抑制効果】では、AD(Cys)と  $\alpha$ -synuclein との相互作用解析やアミロイド線維形成抑制効果について調べた。

【第六章 細胞内での AD(Cys) による  $\alpha$ -synuclein 凝集抑制効果】では、GFP- $\alpha$ -synuclein 安定発現株の樹立や酸化ストレス条件下での凝集形成観察、さらに AD(Cys)タンパク質の細胞

内導入とその効果について解析した。

【第七章 総合考察】では、Hsp60 GW 変異体と AD(Cys)による  $\alpha$ -synuclein の凝集・アミロイド線維形成抑制効果と今後の展望について述べた。

## 第二章 Hsp60 WT と Hp60 G190W 変異体の作製

### 2-1. 緒言

先行研究で Machida ら[17]は, GroEL の AD-インターメディアイトドメイン間のヒンジ II に存在するグリシン残基に着目した。小さなアミノ酸残基であるグリシンを嵩高いアミノ酸残基のトリプトファンに変異させた GroEL G192W(GW)変異体は, トリプトファンが AD を上方に配向したオープン構造であることが TEM 観察で確かめられた。さらに Fukui ら[18]は, GroELAD の配向変化に伴って, 表面疎水性が変化することを報告した。この結果を本研究では Hsp60 に応用することにした。GroEL G192 は, ヒト Hsp60 G190 に相当する[87] (図 1-3)。そこで第二章では, Hsp60 WT と Hsp60 G190W(GW)の作製と構造変化によって生じた表面疎水性変化について検証した。

### 2-2. 材料と方法

#### 2-2-1. Hsp60 WT の培養・精製

##### 2-2-1-1. pET23a(+)-hsp60WT プラスミド構築

ヒト hsp60 WT 遺伝子は PCR で下記プライマーを用いて増幅した。

hsp60 WT プライマー配列

5'- GTA CCC ATA TGG CCA AAG ATG TTA AAT TTG-3' (forward)

5'- TGG CCA TAT GGG TAC CGC GGA CAA GAC ACG-3' (reverse)

PCR 産物は, *Nde* I と *Sac* I (Takara Bio)で制限酵素処理し, pET23a(+) vector (Merck) とラ

イゲーション反応した。DNA シークエンス解析を行ない、配列確認を行なった。

#### 2-2-1-2. 形質転換

pET23a(+)-hsp60 WT プラスミドを大腸菌コンピテントセル *Escherichia coli* (*E. coli*) BLR(DE3)に加え形質転換し、50 µg/mL のアンピシリン入り LB 寒天培地で一晚 37°C で静置培養した。

#### 2-2-1-3. 大量培養

終濃度 50 µg/mL のアンピシリンを含んだ LB 液体培地 37°C で試験管培養し、バツフル付きフラスコでの本培養に移った。OD<sub>600</sub> が 0.6 に達したところで終濃度 1 mM の isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)を加えて、発現誘導した。一晚培養後、8000 rpm, 20 分, 4°C で集菌した。

#### 2-2-1-4. Hsp60 WT 精製

Hsp60 WT の精製は次の手順で行なった。

##### 1.菌体破碎

大量培養で得た菌体を 10 倍(w/v)量の[Hsp60WT 精製 buffer]に懸濁し、そこに 1/100 量のリゾチームと終濃度 1 mM の PMSF を添加した。そのまま室温で 1 時間、マグネティックスターラーで攪拌を続けた。その後、氷上で超音波破碎し、14,000 rpm, 4°C, 20 分遠心分離した。

##### 2.除核酸

遠心後上清を回収し、そこに終濃度 2.5%となるようにストレプトマイシン溶液を滴下した。滴下はおよそ 1 mL/min の流速で、マグネティックスターラーで攪拌しながら行なった。全量滴下後、そのまま室温で 1 時間攪拌を続けた。その後、14,000 rpm,

4°C, 20分遠心分離した。

### 3.硫酸アンモニウム分画

遠心後上清を回収し、そこに終濃度 55%飽和となるように硫酸アンモニウムを氷上で攪拌しながら少量ずつ添加した。氷上でそのまま 1 時間、マグネティックスターラーで攪拌を続け、14,000 rpm, 4°C, 30分遠心分離した。

### 4.ゲルろ過クロマトグラフィー

遠心後沈殿を回収し、少量の[Hsp60WT 精製 buffer]に溶解した。溶解しなかったものを除去するために遠心分離し、その上清をフィルターろ過した。[Hsp60WT 精製 buffer]で平衡化したゲルろ過クロマトグラフィーカラム (Superdex 200 Increase 10/300 GL Column, Cytiva) にアプライした。流速は 0.75 mL/min で行なった。ピークが出現した画分を SDS-PAGE で分析し、Hsp60WT が溶出した画分を回収した。

### 5.陰イオン交換クロマトグラフィー

[Hsp60WT 精製 buffer] で平衡化した陰イオン交換クロマトグラフィーカラム (Resource Q 6 mL Column, Cytiva) にアプライし、0 - 0.6 M NaCl のグラジエント (10 カラム体積) で溶出させた。流速は 2 mL/min で行なった。ピークが出現した画分を SDS-PAGE で分析し、Hsp60WT が溶出した画分を回収した。外液を[Hsp60WT 精製 buffer] として 4°Cで、マグネティックスターラーで攪拌し、外液を交換しながら透析した。遠心限外濾過で濃縮し、4°Cで保存した。

[Hsp60 WT 精製 buffer]

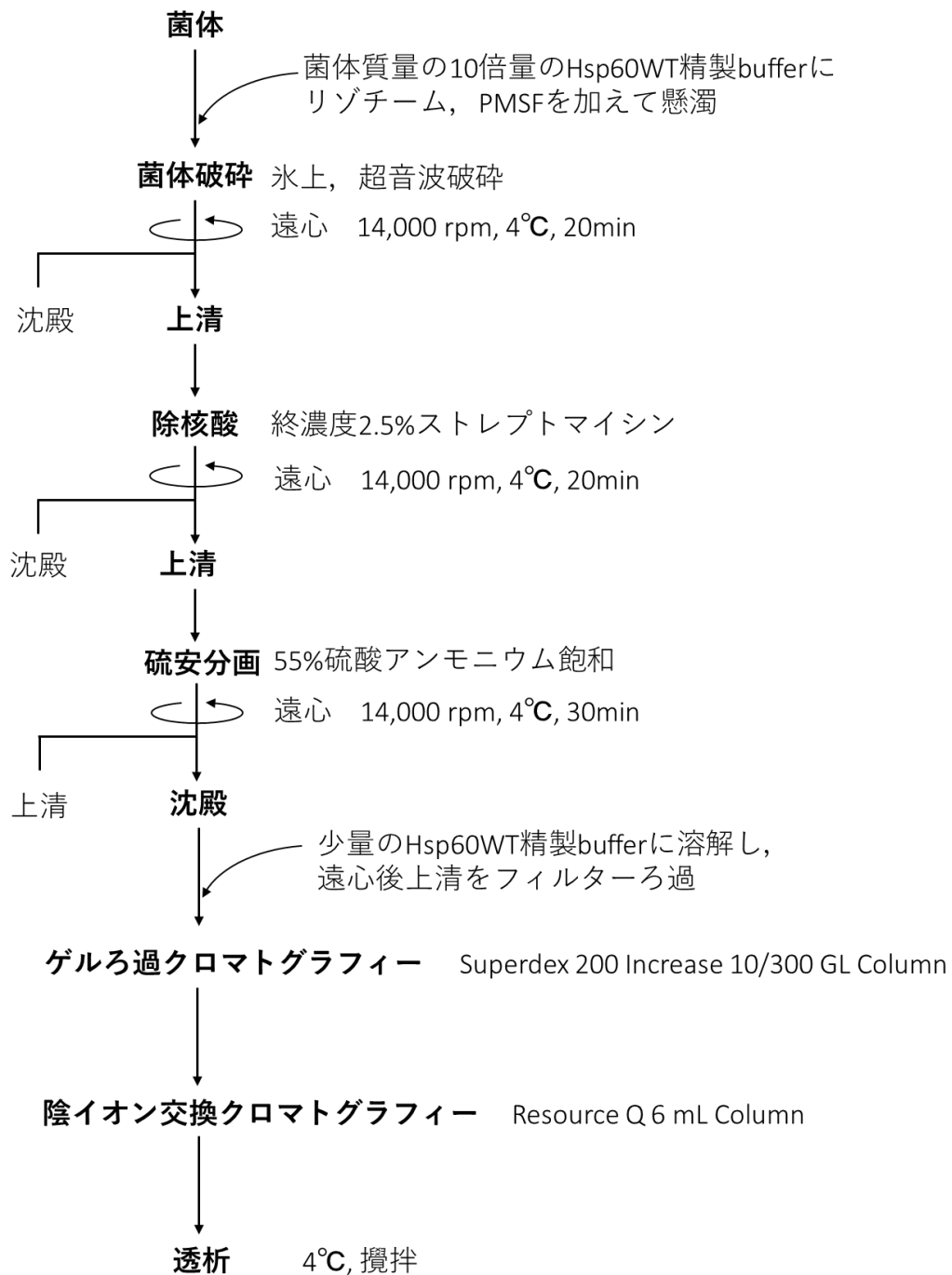
50 mM Tris-HCl (pH 7.8 at 25°C)

2 mM DTT

2 mM EDTA

精製後 Hsp60 WT は、N 末端 8 残基アミノ酸シーケンス解析で配列確認を行なった。

## Hsp60 WT 精製の流れ





### 2-2-1-5. タンパク質の定量

Hsp60 WT の定量は下記の手順で行なった。

1. バイオ・ラッドプロテインアッセイ濃縮色素試薬(Bio-Rad)を超純水で5倍希釈し、2 mL ずつ分注した
2. [定量検量線用 BSA]に記したように BSA と超純水を混合し、0–0.5mg/mL の BSA を準備した
3. 2.を 1.に加え、混合した
4. Hsp60 WT を検量線用試験管の色を参考にして 0.1–0.5mg/mL になるように希釈し、超純水を足して 40  $\mu$ L とした
5. 4.を 1.に加えた
6. 2.の 595 nm の吸光度を測定し、検量線を描いた
7. 4.の 595 nm の吸光度を測定し、Hsp60 WT の濃度を求めた

[定量検量線用 BSA]

濃度(mg/mL)	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
BSA( $\mu$ L)	0	8	16	24	32	40
超純水( $\mu$ L)	40	32	24	16	8	0

### 2-2-2. Hsp60 G190W(GW)の培養・精製

#### 2-2-2-1. pET24a(+)-hsp60GW プラスミド構築

hsp60G190W 点変異導入は pET23a(+)-hsp60 WT を鋳型として PCR 法で下記プライマーを用いて行なった。

hsp60GW プライマー

5'-ATC GAA TGG ATG AAA TTC GAT CGC GGT TA-3' (forward)

5'-TTT CAT CCA TTC GAT AAT TTC CAG TTC ATC-3' (reverse)

PCR産物を *Nde* I と *Sac* I (Takara Bio)で制限酵素処理し、pET24a(+) vector (Merck) にのせ換えを行なった。DNA シークエンス解析を行ない、配列確認を行なった。

#### 2-2-2-2. 形質転換

pET24a(+)-hsp60 GW プラスミドを大腸菌コンピテントセル *E. coli* JM109(DE3)に加え形質転換し、30 µg/mL のカナマイシン入り LB 寒天培地で一晩 37 °C で静置培養した。

#### 2-2-2-3. 大量培養

終濃度 30 µg/mL カナマイシンを含んだ 2xTY (もしくは LB) 培地で 25 °C で試験管培養後バツフル付きフラスコでの本培養に移り、一晩培養した。

#### 2-2-2-4. Hsp60 GW 精製

Hsp60 GW の精製は次の手順で行なった。

##### 1.菌体破碎

大量培養で得た菌体を 10 倍(w/v)量の[Hsp60 GW 精製 buffer]に懸濁し、そこに 1/100 量のリゾチームと終濃度 1 mM の PMSF を添加した。そのまま室温で 1 時間、マグネティックスターラーで攪拌を続けた。その後、氷上で超音波破碎し、14,000 rpm, 4°C, 20 分遠心分離した。

##### 2.除核酸

遠心後上清を回収し、そこに終濃度 2.5%となるようにストレプトマイシン溶液を滴下した。滴下はおおよそ 1 mL/min の流速で、マグネティックスターラーで攪拌しながら行なった。全量滴下後、そのまま室温で 1 時間攪拌を続けた。その後、14,000 rpm,

4°C, 20分遠心分離した。

### 3.硫酸アンモニウム分画

遠心後上清を回収し、そこに終濃度 55%飽和となるように硫酸アンモニウムを氷上で攪拌しながら少量ずつ添加した。氷上でそのまま 1 時間、マグネティックスターラーで攪拌を続け、14,000 rpm, 4°C, 30分遠心分離した。

### 4.ゲルろ過クロマトグラフィー

遠心後沈殿を回収し、少量の[Hsp60 GW 精製 buffer]に溶解した。溶解しなかったものを除去するために遠心分離し、その上清をフィルターろ過した。[Hsp60 GW 精製 buffer] で平衡化したゲルろ過クロマトグラフィーカラム (Superdex 200 Increase 10/300 GL Column, Cytiva) にアプライした。流速は 0.75 mL/min で行なった。ピークが出現した画分を SDS-PAGE で分析し、Hsp60 GW が溶出した画分を回収した。

### 5.陰イオン交換クロマトグラフィー

[Hsp60 GW 精製 buffer] で平衡化した陰イオン交換クロマトグラフィーカラム (Resource Q 6 mL Column, Cytiva) にアプライし、0 – 0.45 M NaCl のグラジエント (12 カラム体積) で溶出させた。流速は 2 mL/min で行なった。ピークが出現した画分を SDS-PAGE で分析し、Hsp60 GW が溶出した画分を回収した。外液を [Hsp60 GW 精製 buffer] として 4°C で、マグネティックスターラーで攪拌し、外液を交換しながら透析した。遠心限外濾過で濃縮し、4°C で保存した。

[Hsp60 GW 精製 buffer]

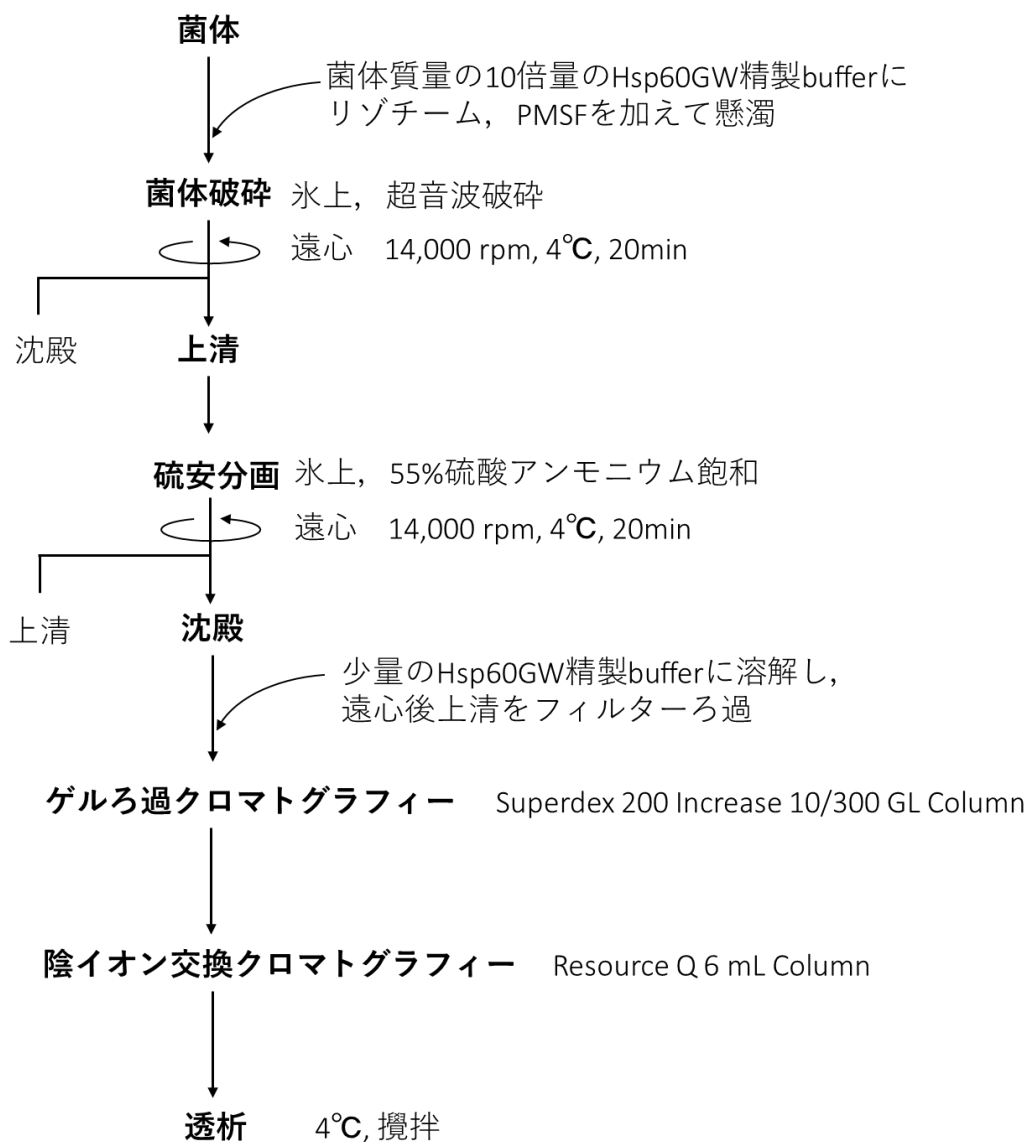
50 mM Tris-HCl (pH 7.8 at 25°C)

2 mM DTT

2 mM EDTA

精製後 Hsp60 GW は、N 末端 8 残基アミノ酸シーケンス解析で配列確認を行なった。

## Hsp60 GW 精製の流れ



### 2-2-2-5. タンパク質の定量

Hsp60 GW の定量は、「2-2-1-5. タンパク質の定量」に記した方法で行なった。

### 2-2-3. ゲルろ過クロマトグラフィーによる Hsp60 GW の四次構造解析

Hsp60 WT と G190W の点変異導入を行なった Hsp60 GW の四次構造に変化があるかどうかを調べるため、ゲルろ過クロマトグラフィーで解析を行なった。[ゲルろ過クロマトグラフィーbuffer]で Superdex 200 Increase 10/300 GL column (Cytiva)を平衡化し、0.5 mg の Hsp60 WT や Hsp60 GW をそれぞれアプライし、溶出されるピークの位置を調べた。分子量と溶出量の標準マーカーとして Gel Filtration Standard (Bio-Rad)を使用した。Gel Filtration Standard には、Thyroglobulin (bovine) 分子量 670,000,  $\gamma$ -globulin (bovine) 分子量 158,000, Ovalbumin (chicken)分子量 44,000, Myoglobin (horse) 分子量 17,000 が含まれる。

[ゲルろ過クロマトグラフィーbuffer]

50 mM Tris-HCl (pH 7.8 at 25°C)

2 mM DTT

2 mM EDTA

### 2-2-4. Hsp60 WT と Hsp60 GW の TEM 観察

TEM 観察試料の前処理は、下記手順で行なった。

1. イオンスパッタ装置(E1010, Hitachi)を用いて低真空でコロジオン膜貼付メッシュ(400メッシュ, 銅タイプ, Nisshin EM)表面に 10 秒間放電した。
2. Hsp60 WT と Hsp60GW を[Hsp60TEM 観察 buffer]でそれぞれ 0.3 – 0.4 mg/mL に調整し、2 分間、膜に静置した。
3. 終濃度 2%になるようにグルタルアルデヒドを添加し、さらに 2 分間静置した。
4. 2 回[Hsp60TEM 観察 buffer]で膜表面を洗い、2%酢酸ウラニル/50%エタノールで 20 秒間ネガティブ染色した。
5. 50%エタノールと[Hsp60TEM 観察 buffer]で膜表面を洗った。
6. デシケーターに一晩静置し、翌日観察した。
7. 観察は、JEM-1400plus (JEOL)を用いて 80 kV で行なった。

[Hsp60TEM 観察 buffer]

25 mM	Tris
150 mM	NaCl
20 mM	KCl
10 mM	Mg(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub>

2-2-5. ANS 蛍光測定による Hsp60 GW の表面疎水性評価

Hsp60 WT と Hsp60 GW の表面疎水性を比較するため、ANS 蛍光測定を行なった。ANS は疎水環境下で著しく蛍光強度が増大するため、疎水性プローブとして使用される蛍光色素である[88,89]。蛍光測定は、96 ウェルマイクロプレートに [ANS 蛍光測定 buffer]を入れ、[ANS 蛍光測定条件]で行なった。測定には Hsp60 WT と Hsp60 GW はそれぞれ 9.4 μg を使用した。Hsp60WT や Hsp60GW の入っていない[ANS 蛍光測定 buffer]の蛍光スペクトルも併せて測定し、バックグラウンドとして Hsp60WT や Hsp60GW の測定結果から差し引いた。

[ANS 蛍光測定 buffer]

50 mM	Tris-HCl (pH7.8 at 25°C)
10 mM	Mg(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub>
20 mM	KCl
2 mM	DTT
5 μM	ANS (励起波長 371 nm, 蛍光極大波長 482 nm, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation)

[ANS 蛍光測定条件]

測定機器	Infinite M200 マイクロプレートリーダー(TECAN)
測定容器	96 ウェルマイクロプレート (polystyrene plate, black with transparent bottom; Greiner Bio-One)
測定ステップ	5 nm
励起波長	371 nm
測定波長	400 nm – 600 nm

## 2-3. 結果

### 2-3-1. ゲルろ過クロマトグラフィーによる Hsp60 の四次構造解析

GW 変異導入による Hsp60 の四次構造への影響を確認するため、精製 Hsp60 変異体サンプルのゲルろ過クロマトグラフィーで解析を行なった (図 2-3-1)。評価には Gel Filtration Standard の各溶出ピークから算出された溶出量と分子量の検量線  $y = 7.9341 - 0.22968x$ ,  $R^2 = 0.9914$  を用いた。この検量線より各サンプルの分子量を溶出ピークから推定したところ、Hsp60 WT は 8.57 mL (相当分子量: 924,000) に溶出され、Hsp60 GW は 8.48 mL (相当分子量: 969,000) に溶出された。溶出ピークがほとんど同じであったことから、GW 変異導入は Hsp60 の四次構造に大きな影響を与えないことが示された。

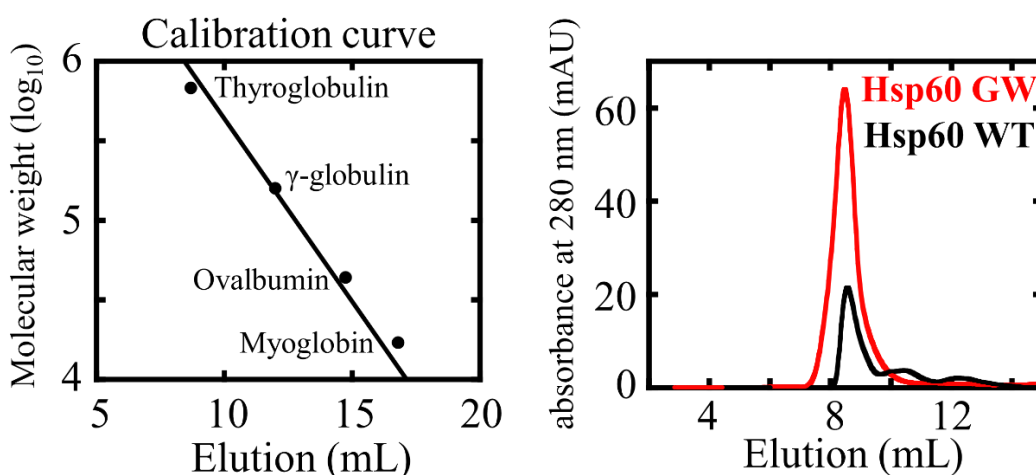


図 2-3-1. Hsp60 の四次構造解析  
(左図)溶出量と分子量の検量線  
(右図) Hsp60 WT (黒) と Hsp60 GW (赤) の溶出ピーク

### 2-3-2. Hsp60 WT と Hsp60 GW の TEM 観察

TEM 測定によると、図 2-3-2 に示すように、Hsp60 WT、Hsp60 GW とともに 14 量体を「上」から見た様子をとらえたと考えられるリング状の分子と、「横」から見た様子をとらえたと

考えられる分子が観察できた。Hsp60 WT と Hsp60 GW の「横」から見た様子を比較すると、Hsp60 WT は円柱形（長方形）に近い形をしているが、Hsp60 GW はフットボール形をしていた。Hsp60 GW は AD が上方向に上がったオープン構造をしていることが示された。

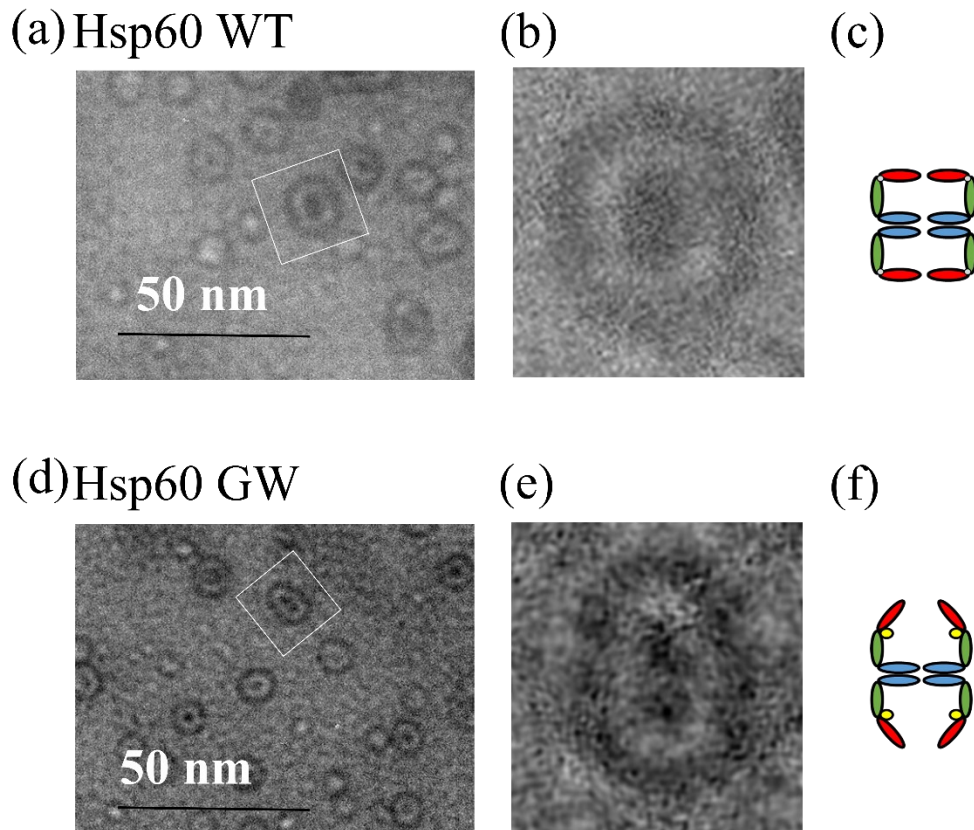


図 2-3-2. Hsp60 の TEM 観察画像

(a と d)の白四角で示した箇所を拡大し(b と e)に示した。

スケールバーは 50 nm。(c と f)Hsp60 を「横」から描いたイメージイラスト

### 2-3-3. ANS 蛍光測定による Hsp60 の表面疎水性評価

GW 変異導入が Hsp60 に与える表面疎水性への影響を調べるために ANS 蛍光測定を行なった。ANS は、371 nm の波長で励起されると最大波長 482 nm の蛍光を発する。図 2-2-3 のように、Hsp60 GW は Hsp60 WT よりも強い ANS 蛍光を示した。AD の配向変化を持たせた



Hsp60 GW は表面の疎水性が Hsp60 WT に比べ、高いことが示された。

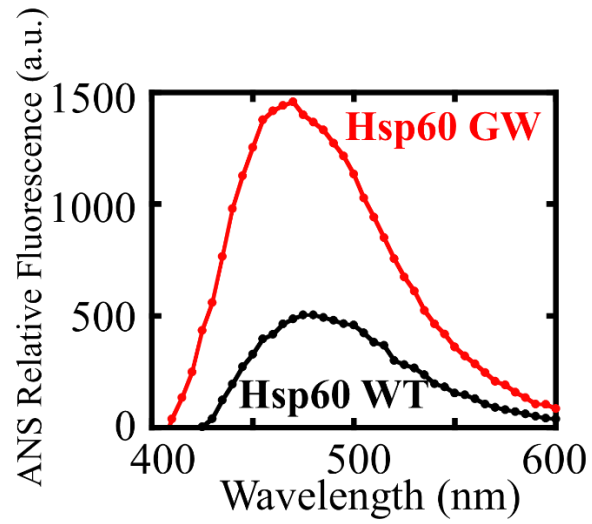


図 2-3-3. Hsp60 WT (黒) と Hsp60 GW (赤) の ANS 蛍光スペクトル

## 2-4. 考察

タンパク質内のあるアミノ酸残基を側鎖の大きさ（嵩）の異なるアミノ酸残基に変異させることで、構造変化によってタンパク質の機能が大きく変わることがある。Macion-Dazardら[90]は、受容体 V2R の 110 番目の小さなアミノ酸残基アラニンを高嵩アミノ酸残基トリプトファンに変異させると 6 つの拮抗薬すべての親和性が低下することを示した。対照的に、120 番目の大きなアミノ酸残基メチオニン小さなアミノ酸残基バリンに変異させると親和性が劇的に増加した。この結果から、受容体結合ポケットの形状が拮抗薬の特異性を決定する要因であることが示唆された。sapropterin dihydrochloride (BH4) は、phenylalanine hydroxylase (PAH) のシャペロンとして働き、PAH のフォールディングを促進し、最も活性化立体構造にする。Utzら[91]は、BH4 のシャペロン活性に重要なヒンジの中心にあるアルギニン残基が高嵩芳香族アミノ酸残基であるトリプトファンに置き換わった変異があると、sapropterin に対する応答性に強い影響をもたらすことを示した。

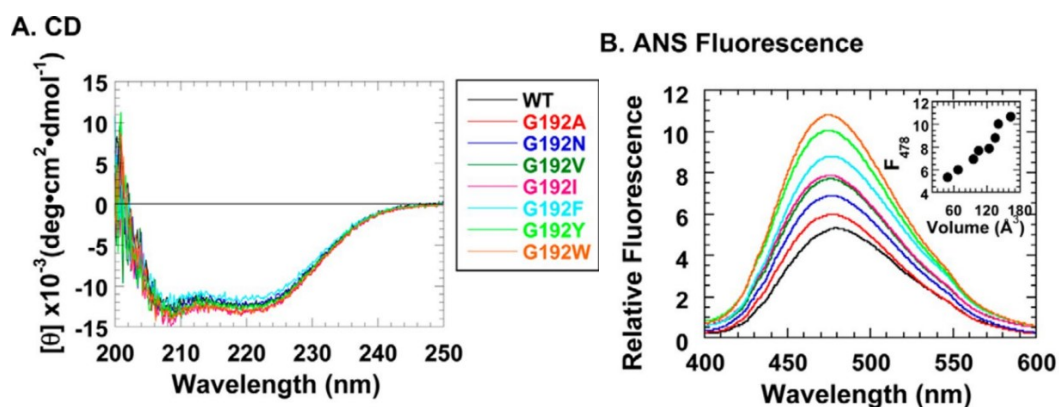


図 2-4-1. GroEL G192X 変異体の構造的特徴[18]

(A) 遠紫外 CD スペクトル

(B) ANS 蛍光スペクトル。挿入図は、192 番目の置換に用いたアミノ酸側鎖のファン・デル・ワールス体積と 478 nm の蛍光強度との相関図

Fukui らの報告[18]では, GroEL の 192 番目のグリシンを様々なアミノ酸残基に置換すると, 二次構造に変化はないが (図 2-4-1(A)), GroEL の表面疎水性に変化を及ぼしたことが示された (図 2-4-1(B))。置換したアミノ酸側鎖のファン・デル・ワールス体積と置換後の GroEL 表面疎水性(ANS 蛍光)に相関性があったことも併せて報告されている。このような背景を踏まえ, 第二章では, Hsp60 WT と 190 番目 (GroEL の 192 番目に相当) の小さなアミノ酸残基グリシンを嵩高いアミノ酸残基トリプトファンに変異させた Hsp60 GW の作製とこれらの構造・疎水性解析を行なった。図 2-3-2 に示すように, Hsp60 GW は AD が上方に押し上げられたオープン構造を持つことが分かった。ゲルろ過クロマトグラフィーによる四次構造解析の結果(図 2-3-1), Hsp60 WT と Hsp60 GW に大きな四次構造変化は見られなかった。変異導入によるリング同士の解離やモノマーへの解離はなかったことが示された。オープン構造への変化による表面疎水性評価を ANS 蛍光で調べた(図 2-3-3)。Hsp60 GW は Hsp60 WT に比べ, 表面疎水性が高いことが示された。なお, 置換した 190 番目のアミノ酸残基は, 立体構造(図 1-3)に示したように, リング内側の入り込んだ位置であることから, トリプトファン自身の持つ疎水性の影響ではなく, AD の配向変化によるものと考えられる。図 2-4-2 は, AD の配向の違いにおける表面疎水性の変化を UCSF Chimera で解析した結果である。Hsp60 の結晶構造はオープン構造のもの (PDB ID: 4PJ1) のみが既報であるため, クローズド構造の解析はできなかった。上 (AD 側) から見たリングの表面疎水性は, Kyte と Doolittle が報告した hydrophobicity scale[92]を用いて, 表面を色分けした。色は, 高疎水性を red, 高親水性を dodger blue, hydrophobicity scale が 0 を white に設定した。図 2-4-3 の(a)と(b)の表面疎水性領域を比較すると, AD が上方に持ち上がったオープン構造(a)の方がクローズド構造(b)よりも赤で示した表面疎水性領域が広い。GroEL は, AD が上方に配向変化する際, およそ 90 度ひねりながら 60 度持ち上がる事がわかっている[14]。ひねりながら上方に配向変化することで, クローズド構造の時には内部に埋没していた疎水性アミノ酸残基が表面に露出し, オープン構造の GroEL は表面疎水性が高くなる。GroEL の相同タンパク質であ

る Hsp60 でも同じような配向変化が起こっていると予測できる。このような AD の配向変化による表面露出疎水性領域の拡大が、Hsp60 WT と Hsp60 GW の表面疎水性の違いに影響を与えたと考えられる。

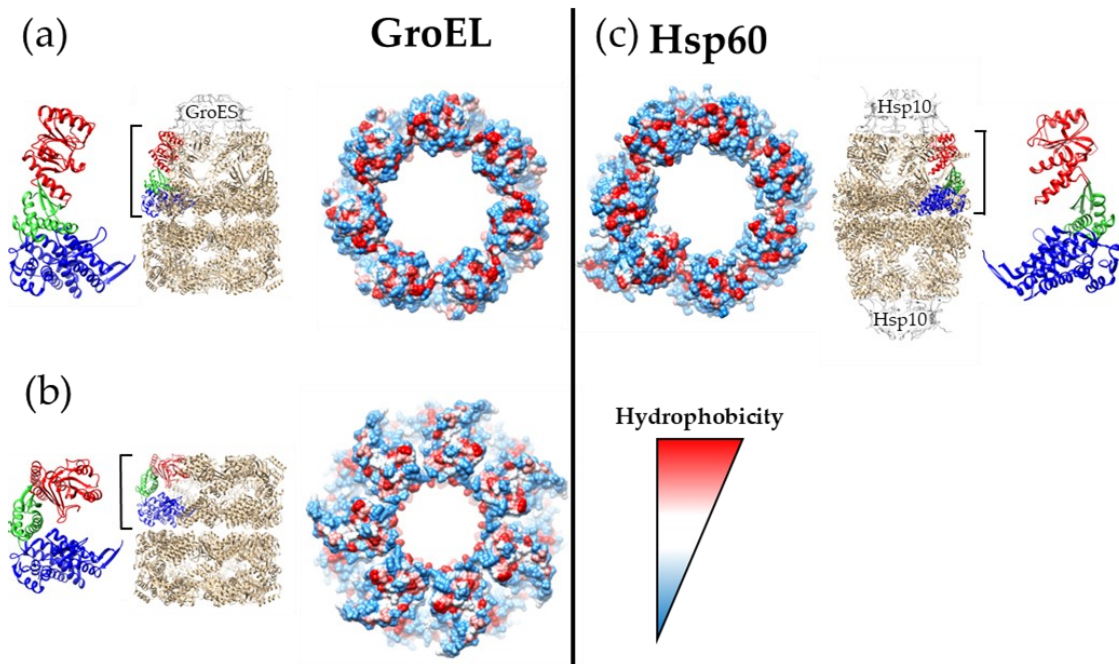


図 2-4-2. GroEL と Hsp60 の AD 配向変化と上(AD 側)から見たリングの表面疎水性

- (a) GroEL オープン構造 (PDB ID: 1AON)
- (b) GroEL クローズド構造 (PDB ID: 1XCK)
- (c) Hsp60 オープン構造 (PDB ID: 4PJ1)

## 第三章 Hsp60 GW 変異体による $\alpha$ -synuclein アミロイド線維化抑制効果

### 3-1. 緒言

GroEL GW 変異体が野生型と比べ、 $\alpha$ -synuclein との相互作用やアミロイド線維化抑制効果が強力であることが報告されている[18]。GroEL の相同タンパク質である Hsp60 においても同様の効果が期待できることから、異なる表面疎水性を持った Hsp60 WT と Hsp60 GW による  $\alpha$ -synuclein との相互作用・アミロイド線維化抑制効果を第二章で比較する。

### 3-2. 材料と方法

#### 3-2-1. $\alpha$ -synuclein の培養・精製

##### 3-2-1-1. 形質転換

pET23a(+)- $\alpha$ -synuclein プラスミドを大腸菌コンピテントセル *E. coli* BLR(DE3)に加え形質転換し、50  $\mu$ g/mL のアンピシリン入り LB 寒天培地で一晩 37 °C で静置培養した。

##### 3-2-1-2. 大量培養

終濃度 50  $\mu$ g/mL アンピシリンを含んだ LB 培地で 37°C で試験管培養後、OD<sub>600</sub> が 0.6 を越したところでバッフル付きフラスコでの本培養に移り、一晩培養した。

### 3-2-1-3. $\alpha$ -synuclein 精製

$\alpha$ -synuclein の精製は次の手順で行なった。

#### 1.菌体破碎

大量培養で得た菌体を 10 倍(w/v)量の[ $\alpha$ -synuclein 精製 buffer(1)]に懸濁し、そこに 1/100 量のリゾチームと終濃度 1 mM の PMSF を添加した。そのまま室温で 30 分間、マグネティックスターラーで攪拌を続けた。その後、氷上で超音波破碎し、14,000 rpm, 4°C, 20 分遠心分離した。

#### 2.除核酸

遠心後上清を回収し、そこに終濃度 2.5%となるようにストレプトマイシン溶液を滴下した。滴下はおよそ 1 mL/min の流速で、マグネティックスターラーで攪拌しながら行なった。全量滴下後、そのまま室温で 30 分間攪拌を続けた。その後、14,000 rpm, 4°C, 30 分遠心分離した。

#### 3.熱処理

遠心後上清を回収し、70 - 75°Cで 15 分間熱処理した。処理後は氷上に置いて 4°Cまで冷ました。その後、14,000 rpm, 4°C, 40 分遠心分離した。

#### 4.硫酸アンモニウム分画

遠心後上清を回収し、そこに終濃度 70%飽和となるように硫酸アンモニウムを氷上で攪拌しながら少量ずつ添加した。氷上でそのまま 1 時間、マグネティックスターラーで攪拌を続け、14,000 rpm, 4°C, 40 分遠心分離した。

#### 5.陰イオン交換クロマトグラフィー

遠心後沈殿を回収し、少量の[ $\alpha$ -synuclein 精製 buffer(2)]に溶解した。外液を[ $\alpha$ -synuclein 精製 buffer(2)]として 4°Cで、マグネティックスターラーで攪拌し、外液を交換しながら透析した。溶解しなかったものを除去するために遠心分離し、その上清をフィルターろ過した。[ $\alpha$ -synuclein 精製 buffer(2)]で平衡化した陰イオン交換クロマトグラフ

イーカラム (Resource Q 6 mL Column, Cytiva) にアプライし、0–0.4 M NaCl のグラジエント (10 カラム体積) で溶出させた。流速は 2 mL/min で行なった。ピークが出現した画分を SDS-PAGE で分析し、 $\alpha$ -synuclein が溶出した画分を回収した。

#### 6.凍結乾燥

透析外液を 5 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  として 4°C で 2 時間、マグネティックスターラーを用いて攪拌し、その後、外液を 1 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  に交換して一晩透析した。透析後、液体窒素で予備凍結した。その後、すみやかに凍結乾燥機にセットして真空状態で凍結乾燥した。凍結乾燥後は 4°C で保存した。

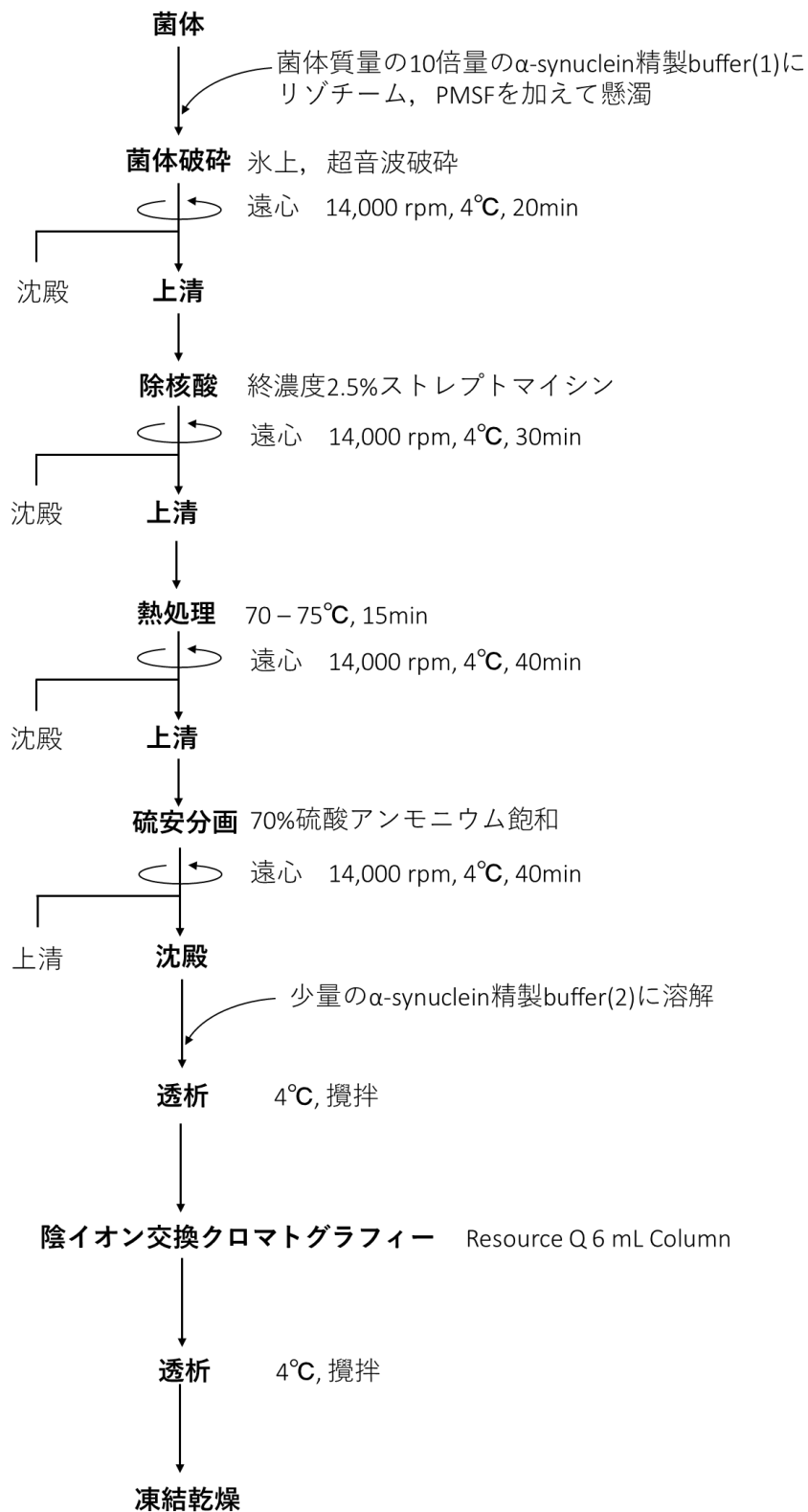
#### [ $\alpha$ -synuclein 精製 buffer(1)]

50 mM Tris-HCl (pH 7.5 at 4°C)  
0.1 mM DTT  
1 mM EDTA

#### [ $\alpha$ -synuclein 精製 buffer(2)]

50 mM Tris-HCl (pH 7.5 at 25°C)  
0.1 mM DTT

## α-synuclein 精製の流れ





#### 3-2-1-4. タンパク質の定量

$\alpha$ -synuclein の定量は、モル吸光係数を利用して紫外吸収法で行なった。 $\alpha$ -synuclein が 1 mg/mL の濃度で含まれている溶液を光路長 1 cm のセルで測定した時に得られる 280 nm の吸光度は 0.354 である[93]。未知濃度  $\alpha$ -synuclein 溶液の 280 nm の吸光度を測定し、 $\alpha$ -synuclein のモル吸光係数 0.354 から  $\alpha$ -synuclein の濃度を算出した。

#### 3-2-2. Thioflavin T による $\alpha$ -synuclein アミロイド線維化測定

Hsp60 WT や Hsp60 GW 存在下・非存在下での  $\alpha$ -synuclein アミロイド線維化を調べるため、Thioflavin T 蛍光強度測定をプレートリーダーで行なった。アミロイド線維を形成するタンパク質は、 $\beta$ シート構造を形成しており、Thioflavin T 等の蛍光色素が特異的に結合して蛍光を発する。 $\alpha$ -synuclein (1 mg/mL)をさまざまな濃度の Hsp60 WT や Hsp60 GW 存在下で振盪させた。96 ウェルプレートの各ウェルには polytetrafluoroethylene ビーズを入れ、[Thioflavin T 測定 buffer]で調整し測定した。

##### [Thioflavin T 測定 buffer]

25 mM	Tris-HCl (pH 7.4 at 37°C)
150 mM	NaCl
20 $\mu$ M	Thioflavin T

##### [Thioflavin T 測定条件]

測定機器	プレートリーダー (ARVO X4, PerkinElmer)
測定容器	96-well マイクロプレート (polystyrene plate, black with transparent bottom; Greiner Bio-One)
測定温度	37°C
振盪モード	orbital shaking
測定間隔	15 分
励起波長	450 nm
測定波長	486 nm

### 3-2-3. ゲルろ過クロマトグラフィーによる振盪前後の四次構造解析

プレートリーダーでの振盪によって Hsp60 WT や Hsp60 GW の四次構造が変化するかどうかを調べるため、ゲルろ過クロマトグラフィーで解析を行なった。[3-2-2. Thioflavin T による  $\alpha$ -synuclein アミロイド線維化測定]に記した条件で Hsp60 WT や Hsp60 GW をそれぞれ単独で振盪した。[ゲルろ過クロマトグラフィーbuffer]で Superdex 200 Increase 10/300 GL column (Cytiva)を平衡化し、0.5 mg の Hsp60 WT や Hsp60 GW をそれぞれアプライし、溶出されるピークの位置を調べた。分子量と溶出量の標準マーカーについては[2-2-3. ゲルろ過クロマトグラフィーによる Hsp60 GW の四次構造解析]に記した。

[ゲルろ過クロマトグラフィーbuffer]

50 mM Tris-HCl (pH 7.8 at 25°C)  
2 mM DTT  
2 mM EDTA

### 3-2-4. 透過型電子顕微鏡(TEM)観察

Hsp60 WT や Hsp60 GW 存在下・非存在下で振盪させた  $\alpha$ -synuclein サンプルは、下記の手順で前処理を行なった。コロジオン膜貼付メッシュ(400 メッシュ, 銅タイプ, Nisshin EM)表面にサンプルをのせ、1 分間、膜に静置した。超純水で膜表面を洗い、EM スтейナー(Nisshin EM)でネガティブ染色した。超純水で膜表面を洗い、デシケーターに一晩静置後、翌日観察した。TEM 観察は、JEM-1400plus (JEOL)を用いて 80 kV で行なった。

### 3-2-5. CD スペクトル測定による $\alpha$ -synuclein の二次構造解析

タンパク質の立体構造のうち、ポリペプチドの局所的な立体構造を二次構造と呼び、 $\alpha$ ヘリックス、 $\beta$ シート、ターン、不規則(ランダム)構造がある。あるタンパク質に多く含まれる二次構造の種類や、その割合は、分光学的に調べることができる。タンパク質の二次構造

は、紫外領域にそれぞれ固有の円偏光二色性(circular dichroism, CD)を持つため、タンパク質の CD スペクトルを測定することで、二次構造の種類を推察することができる。 $\alpha$ -synuclein のアミロイド線維は特徴的な  $\beta$  シート構造を持つことが知られている。そこで、さまざまな濃度の Hsp60 WT や Hsp60 GW 存在下・非存在下で振盪させた  $\alpha$ -synuclein の CD スペクトルを測定し、二次構造の変化を調べた。 $\alpha$ -synuclein は[ $\alpha$ -synuclein/Hsp60 CD スペクトル測定 buffer ]で 0.2 mg/mL になるように調整した。光路長 0.1 cm の合成石英セル(GL Sciences)にサンプルを入れ、円二色性分散計(J-820, JASCO)で測定した。測定結果から Hsp60 WT や Hsp60 GW のスペクトルを差し引いた。

[ $\alpha$ -synuclein/Hsp60 CD スペクトル測定 buffer ]

25 mM Tris-HCl (pH 7.7 at 25°C)

[CD スペクトル測定条件]

感度	Low (1000 mdeg)
開始波長	250 nm
終了波長	200 nm
データ取り込み間隔	0.1 nm
走査モード	continuous
走査速度	50 nm/min
レスポンス	0.25 sec
バンド幅	10 nm
積算回数	16 回
測定温度	25°C

### 3-2-6. 免疫沈降法による $\alpha$ -synuclein と Hsp60 の結合解析

$\alpha$ -synuclein と Hsp60 WT や Hsp60 GW が結合するかどうか調べるため、免疫沈降法とウェスタンブロット法を組み合わせることで下記手順で調べた。

1.  $\alpha$ -synuclein と Hsp60 WT や Hsp60 GW をモノマーモル比 1:1 で[免疫沈降用振盪条件]で一

時間振盪した。

2. SureBeads™ Protein A Magnetic Beads (Bio-Rad) 50  $\mu$ L を PBS-T (PBS + 0.1% Tween20) で 3 回洗浄
3. PBS-T 200  $\mu$ L と抗体 2  $\mu$ L をビーズに加えた
4. 10 分間 4°Cで回転
5. 磁気分離, ビーズ回収
6. 1.サンプルを 5.のビーズ+抗体に加えた
7. 4 時間, 4°Cで回転
8. 磁気分離, ビーズ回収
9. PBS-T で 10 分 x 3 回洗浄
10. 磁気分離, ビーズ回収
11. 2 x SDS ローディングバッファーをビーズに 10  $\mu$ L 添加
12. 3 分間煮沸
13. 15%ポリアクリルアミドゲルで泳動
14. 泳動後のゲルを[トランスファーバッファー]で 15 分振盪し平衡化
15. セミドライ式で PVDF 膜に転写 (15V 定電圧, 45 分間)
16. 膜を[TBS-T]で 5 分振盪
17. [ブロッキングバッファー] で 1 時間振盪
18. [TBS-T]で 5 分 x 3 回振盪
19. 4°C, 一晩, 一次抗体反応(anti-Hsp60 (1 : 5000) もしくは anti- $\alpha$ -synuclein (1 : 1000))
20. [TBS-T]で 5 分 x 3 回振盪
21. 室温, 1 時間, 二次抗体反応(anti-rabbit IgG もしくは anti-mouse IgG (1:10000))
22. [TBS-T]で 5 分 x 3 回振盪
23. 膜に Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagents (Cytiva)を添加し, インキュ

ベート

## 24. ImageQuant LAS 4000mini (Cytiva)で検出

### [免疫沈降用振盪条件]

振盪機器	プレートリーダー(ARVO X4, PerkinElmer)
温度	37°C
振盪モード	orbital shaking

### [トランスファーバッファー]

192 mM	グリシン
25 mM	Tris
0.1%	SDS
20%	メタノール

### [TBS-T]

20 mM	Tris
100 mM	NaCl
0.1%	Tween20
pH	8.0

### [ブロッキングバッファー]

5%	スキムミルク/TBS-T
----	--------------

### [抗体情報]

anti-Hsp60	Mab11-13 (1/5000 dilution), mouse, abcam
anti- $\alpha$ -synuclein	MJFR1 (1/1000 dilution), rabbit, abcam
anti-rabbit IgG	1/10000 dilution, Cytiva
anti-mouse IgG	1/10000 dilution, Cytiva

### 3-2-7. QCM による $\alpha$ -synuclein と Hsp60 GW の相互作用解析

$\alpha$ -synuclein と Hsp60 との相互作用を水晶振動子マイクロバランス法(Quartz Crystal Microbalance: QCM)で測定した。 $\alpha$ -synuclein は His タグの付いた His- $\alpha$ -synuclein を用い, Ni-NTA 法で基板に固定した。センサーセルは下記 [センサー基板の基本洗浄]の手順で洗浄してから使用した。測定は下記[His- $\alpha$ -synuclein/Hsp60 QCM 測定法]の手順で行なった。測定後, 次のサンプル測定をする場合は, 下記[His- $\alpha$ -synuclein/Hsp60 センサー洗浄法]の手順でセンサー洗浄を行なった。

#### [センサー基板の基本洗浄]

1. 1% SDS で洗浄
2. 超純水で洗浄
3. ピランハ溶液( $\text{H}_2\text{SO}_4 : \text{H}_2\text{O}_2 = 3 : 1$ )を基板表面に 5 分間静置
4. 超純水で洗浄
5. ピランハ溶液を基板表面に 5 分間静置
6. 超純水で洗浄

#### [His- $\alpha$ -synuclein/Hsp60 QCM 測定法]

1. 0.5 mM Dithiobis ( $\text{C}_2$ -NTA) 50  $\mu\text{L}$  添加し, 静置 10 分
2. 超純水で洗浄
3. [Ni buffer] 50  $\mu\text{L}$  添加し, 静置 10 分
4. 超純水で洗浄
5. [His- $\alpha$ -synuclein/Hsp60 測定 buffer]450 $\mu\text{L}$  添加し, センサーの安定を待った
6. 1  $\mu\text{M}$  His- $\alpha$ -synuclein 50  $\mu\text{L}$  添加し, 基板上に固定
7. センサー内を新しい[His- $\alpha$ -synuclein/Hsp60 測定 buffer]に入れ替え, センサーの安定を待

った

8. Hsp60 WT もしくは Hsp60 GW を添加し，測定

[His- $\alpha$ -synuclein/Hsp60 センサー洗浄法]

1. 測定後セルを超純水で洗浄
2. [imidazole buffer] 50  $\mu$ L 添加し，静置 30 分
3. 超純水で洗浄
4. [His- $\alpha$ -synuclein/Hsp60 QCM 測定法]の 3.からもう一度行ない，次のサンプルを測定した

[QCM 測定条件]

測定機器	Affnix QN $\mu$ (ULVAC)
測定温度	25°C
測定周波数・感度	27 MHz(基本波), 30 pg/Hz
測定方式	水晶発振方式

[Ni buffer]

10 mM	NiSO <sub>4</sub>
20 mM	HEPES
150 mM	NaCl
50 mM	EDTA
pH	7.5

[His- $\alpha$ -synuclein/Hsp60 測定 buffer]

25 mM	Tris
150 mM	NaCl
pH	7.7 at 25°C

[imidazole buffer]

0.4 M	imidazole
20 mM	HEPES
150 mM	NaCl
pH	7.5

### 3-2-8. $\alpha$ -synuclein アミロイド線維化過程における Hsp60 の遅延添加効果の検証

$\alpha$ -synuclein のアミロイド線維化過程のさまざまな段階で Hsp60 を添加し、その効果を調べるために遅延添加実験を行なった。 $\alpha$ -synuclein のアミロイド線維化過程 0 時間（初めから Hsp60 存在下）、2 時間、6 時間、24 時間時点で 0.1 モノマーモル比の Hsp60 WT もしくは Hsp60 GW を添加し、Thioflavin T 蛍光強度の変化を比較した。



### 3-3. 結果

#### 3-3-1. Thioflavin T による $\alpha$ -synuclein アミロイド線維化測定

図 3-3-1 に示すように、Thioflavin T 蛍光強度は、Hsp60 WT や Hsp60GW の濃度依存的に抑えられた。0.1 モノマーモル比 Hsp60 WT と Hsp60 GW の効果を比較すると、Hsp60 GW を  $\alpha$ -synuclein に共存させると、Thioflavin T 蛍光強度は強く抑えられた。対照的に、Hsp60 WT を  $\alpha$ -synuclein に共存させた場合は、Thioflavin T 蛍光強度の上昇を完全に抑えることはできなかった。

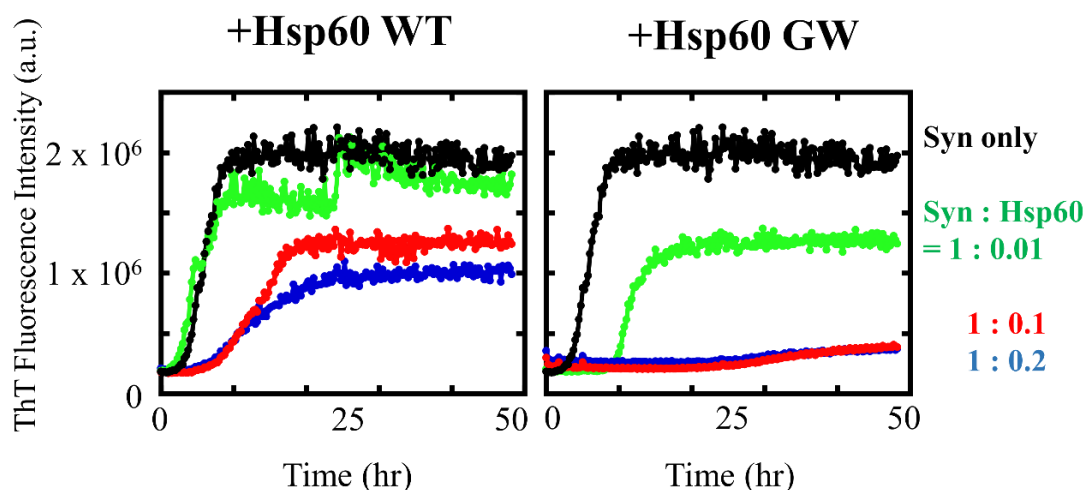


図 3-3-1. Hsp60 (WT は左図, GW は右図) 存在下・非存在下でアミロイド線維形成した  $\alpha$ -synuclein の Thioflavin T 蛍光強度の変化 (黒)  $\alpha$ -synuclein のみ,  $\alpha$ -synuclein : Hsp60 のモノマーモル比で (緑) 1 : 0.01, (赤) 1 : 0.1, (青) 1 : 0.2

#### 3-3-2. ゲルろ過クロマトグラフィーによる振盪前後の四次構造解析

プレートリーダーでの振盪を与える Hsp60 の四次構造への影響を調べるため、ゲルろ過クロマトグラフィーで四次構造解析を行なった (図 3-3-2)。振盪前の Hsp60 WT と Hsp60 GW の溶出量は「2-3-2. ゲルろ過クロマトグラフィーによる Hsp60 の四次構造解析」で示した通

り、ほとんど変化が見られず、振盪後の Hsp60 WT と Hsp60 GW の溶出量は、Hsp60 WT が 8.35 mL (相当分子量：1,038,000)、Hsp60 GW は 8.34 mL (相当分子量：1,044,000) であった。

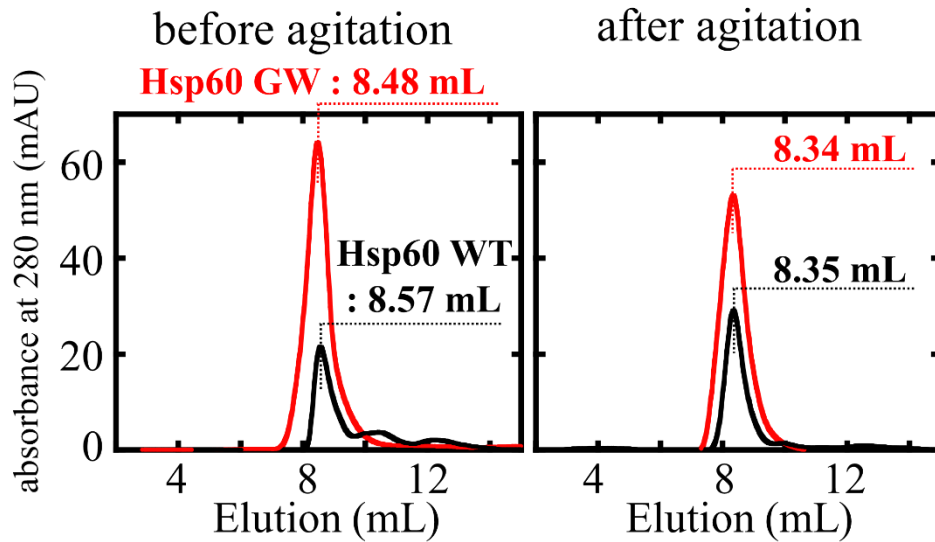


図 3-3-2. Hsp60 WT (黒) と Hsp60 GW (赤) の振盪前後のゲルろ過クロマトグラフィー解析

### 3-3-3. 透過型電子顕微鏡(TEM)観察

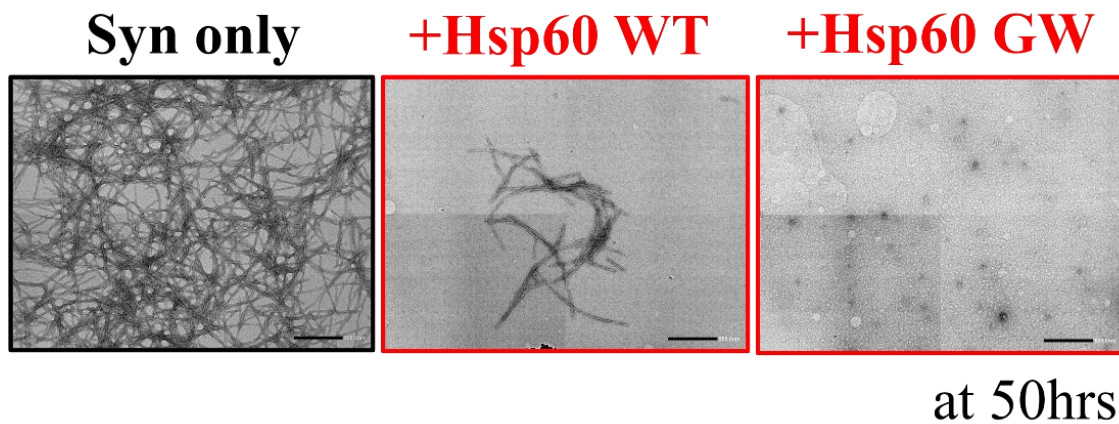


図 3-3-3. Hsp60(0.1 モノマーモル比)存在下・非存在下で 50 時間振盪した  $\alpha$ -synuclein の TEM 画像。スケールバーは 500 nm

Hsp60 が  $\alpha$ -synuclein のアミロイド線維形成に与える効果を調べるため、TEM 観察を行なった。0.1 モノマーモル比の Hsp60 存在下もしくは非存在下で  $\alpha$ -synuclein を 50 時間振盪した後、観察した (図 3-3-3)。 $\alpha$ -synuclein のみで振盪させたサンプルは、線維が多く形成されていた。Hsp60 WT 存在下で  $\alpha$ -synuclein を振盪させたサンプルは、部分的に線維が観察された。対照的に、Hsp60 GW 存在下で  $\alpha$ -synuclein を振盪させたサンプルでは、線維は観察されなかった。

### 3-3-4. CD スペクトル測定による $\alpha$ -synuclein の二次構造解析

Hsp60 が  $\alpha$ -synuclein の二次構造に与える影響を CD スペクトル測定で調べた。図 3-3-4 (左・中央) に示したように、黒のトレースで表した  $\alpha$ -synuclein のみの振盪条件では、216–218 nm 付近に負の極大を示し、典型的な  $\beta$  シートリッチな構造であることが示された。

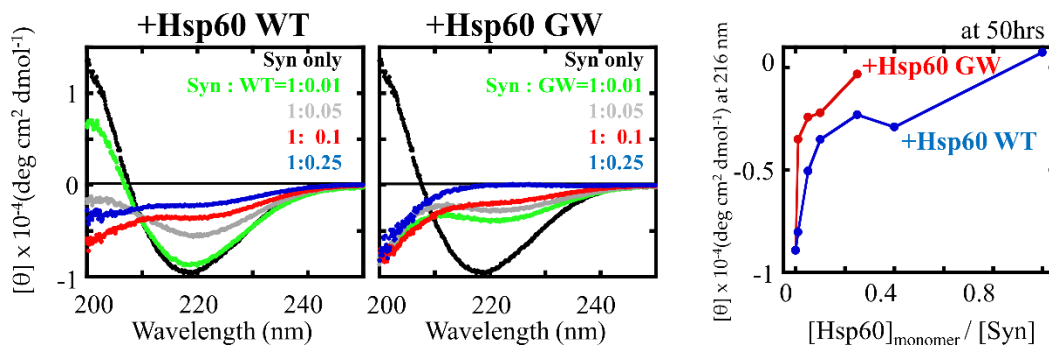


図 3-3-4. (左・中央) 様々な濃度の Hsp60 存在下で振盪した後の  $\alpha$ -synuclein の CD スペクトル。Hsp60 の CD スペクトルは差し引いた結果を示している。

(黒)  $\alpha$ -synuclein のみ,  $\alpha$ -synuclein : Hsp60 のモノマーモル比で (緑) 1 : 0.01, (灰色) 1 : 0.05, (赤) 1 : 0.1, (青) 1 : 0.2, (右) Hsp60 (青 : WT, 赤 : GW) 各濃度における  $\alpha$ -synuclein の 216 nm の CD スペクトル値変化

さまざまな濃度の Hsp60 を共存させると  $\alpha$ -synuclein の CD スペクトルは、Hsp60 の濃度依

存的に変化した。図 3-3-4 (右) では、各濃度の Hsp60 が与える  $\alpha$ -synuclein のアミロイド線維形成への効果を調べるため、216 nm の CD スペクトル値の変化を比較した。Hsp60 GW は低濃度で 216 nm の負の値、つまり  $\beta$  シート構造形成を抑えたことが示された。

### 3-3-5. 免疫沈降法による $\alpha$ -synuclein と Hsp60 の結合解析

Hsp60 と  $\alpha$ -synuclein が結合するかどうかを調べるため、免疫沈降法とウェスタンブロット法を組み合わせて解析を行なった。図 3-3-5 に示すように、免疫沈降法で Hsp60 抗体に反応させた後、ウェスタンブロット法で  $\alpha$ -synuclein 抗体を用いて検出した場合も、免疫沈降法で  $\alpha$ -synuclein 抗体に反応させた後、ウェスタンブロット法で Hsp60 抗体を用いて検出した場合もバンドが検出された。Hsp60 が  $\alpha$ -synuclein と結合することが示された。

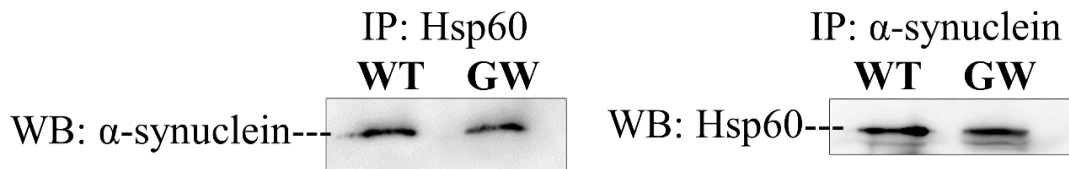


図 3-3-5. 免疫沈降法とウェスタンブロット法による結合解析

### 3-3-6. QCM による $\alpha$ -synuclein と Hsp60 の相互作用解析

Hsp60 と  $\alpha$ -synuclein の相互作用の強さを調べるために QCM 法で解析を行なった。図 3-3-6 (左と中央) は、基板に固定した  $\alpha$ -synuclein とさまざまな濃度の Hsp60 の相互作用のセンサーグラムを示す。加えた Hsp60 の濃度が高いほど  $\Delta F$  が大きくなった。同じ濃度の Hsp60 WT と Hsp60 GW を添加した時のセンサーグラムを比較すると、Hsp60 GW を添加したサンプルにおける  $\Delta F$  値がより大きい値となった。このことは、Hsp60 GW の方が Hsp60 WT よりも  $\alpha$ -synuclein との結合親和性が高いことを示唆する。見かけの速度定数と Hsp60 の濃度

は、線形相関を示した (図 3-3-6(右))。得られた  $k_{on}$ ,  $k_{off}$ ,  $K_d$  値は、表 3-3-6 にまとめた。

$\alpha$ -synuclein に対する  $K_d$  値は、Hsp60 WT は 4.29 nM, Hsp60 GW は 0.963 nM であった。Hsp60 GW が  $\alpha$ -synuclein に対する強い親和性を持つことが示された。

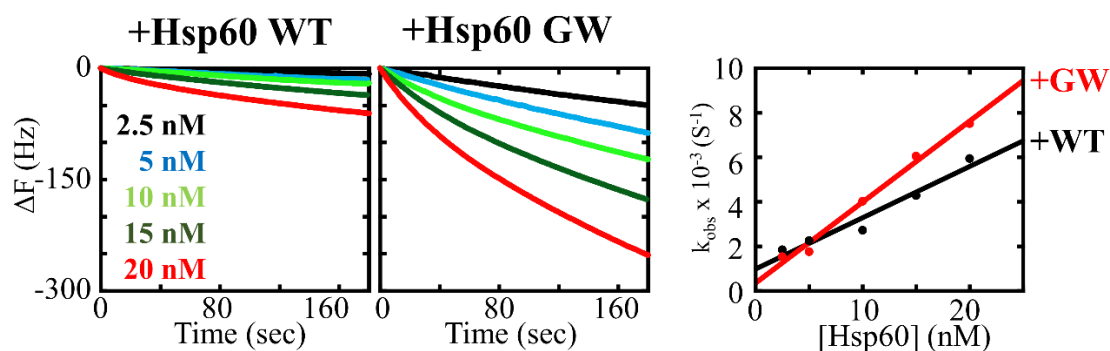


図 3-3-6. 基板に固定した  $\alpha$ -synuclein モノマーへの Hsp60 の相互作用解析 (左と中央) Hsp60 の濃度はそれぞれ 2.5 nM (黒), 5 nM (水色), 10 nM (黄緑), 15 nM (濃い緑), 20 nM (赤)。 (右)  $k_{obs}$  と各濃度の Hsp60 の相関図

表 3-3-6. 図 3-3-6 から求めた  $k_{on}$ ,  $k_{off}$ ,  $K_d$  値

Sample	$K_d$ (nM)	$k_{on}$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )	$k_{off}$ ( $s^{-1}$ )
Hsp60 WT	4.29	$2.30 \times 10^5$	$9.89 \times 10^{-4}$
Hsp60 GW	0.963	$3.64 \times 10^5$	$3.51 \times 10^{-4}$

### 3-3-7. $\alpha$ -synuclein アミロイド線維化過程における Hsp60 の遅延添加効果の検証

アミロイド線維形成抑制メカニズムを明らかにするため、 $\alpha$ -synuclein のアミロイド線維形成過程のさまざまな段階で Hsp60 を添加し、Thioflavin T 蛍光強度の変化を調べた (図 3-3-7)。

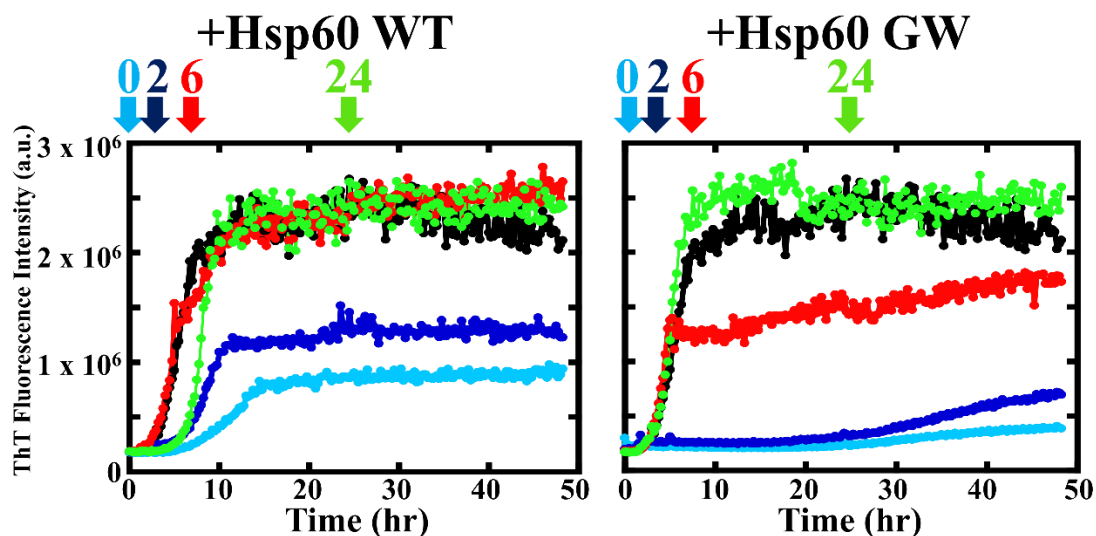


図 3-3-7.  $\alpha$ -synuclein アミロイド線維化過程における Hsp60 遅延添加効果

0.1 モノマーモル比の Hsp60 を  $\alpha$ -synuclein 振盪開始 0 時間(水色),

2 時間(濃い青), 6 時間(赤), 24 時間 (緑) に添加した。

黒は  $\alpha$ -synuclein のみで振盪させた条件を示す。

Hsp60 を  $\alpha$ -synuclein の振盪開始の早い段階、特に初めから共存させた場合 (0 時間) に強い抑制効果を示した。振盪開始から 2 時間 (Hsp60 GW の場合は 6 時間も) に Hsp60 を共存させると、Thioflavin T の蛍光強度の上昇を抑える効果が見られた。一方で、線維伸長 (Thioflavin T の蛍光強度の上昇) が飽和に達し、成熟したアミロイド線維が形成されたと考えられる時点 (振盪開始から 24 時間) に Hsp60 を添加しても、その後の Thioflavin T 蛍光強度に変化はもたらさなかった。

### 3-4. 考察

アミロイド線維は、 $\beta$ シートに富んだ二次構造、蛍光色素 Thioflavin T の結合、枝分かれのない細長い構造などいくつかの特徴がある。そこで本研究のアミロイド線維形成の検出には、CD スペクトル測定による二次構造解析、Thioflavin T 蛍光強度測定、透過型電子顕微鏡 (TEM) による形態観察を併せて用いた。

図 3-3-1 では、Thioflavin T 蛍光強度測定で Hsp60 WT と Hsp60 GW のアミロイド線維形成抑制効果を調べた。Xue ら[94]の報告のように、Thioflavin T 蛍光強度は、形成されたアミロイド線維の量との相関関係を持つことが考えられた。Hsp60 WT、Hsp60 GW ともに濃度依存的にアミロイド線維形成の抑制効果を示した。0.1 モノマーモル比 Hsp60 WT 存在下で Thioflavin T の蛍光強度は非存在下に比べおよそ半分に抑えた。一方、0.1 モノマーモル比 Hsp60 GW 存在下では、完全に Thioflavin T の蛍光強度の上昇を抑えた。図 3-3-3 に示したように、TEM 観察を行なうと、 $\alpha$ -synuclein のみで振盪した条件では、コロジオン膜一面に線維が観察されたが、0.1 モノマーモル比 Hsp60 WT 存在下では、膜の一部に線維が観察された。0.1 モノマーモル比 Hsp60 GW 存在下では、線維は観察されなかった。また、0.1 モノマーモル比の Hsp60 GW が Thioflavin T 蛍光強度上昇を完全に抑えたことから、理論的には Hsp60 GW1 分子 (14 量体) が 140 もの  $\alpha$ -synuclein モノマーに作用し、アミロイド線維化を抑制したと言える。さらに図 3-3-4 では、Hsp60 WT や Hsp60 GW が  $\alpha$ -synuclein の二次構造に与える影響を調べた。アミロイド線維の特徴の一つである  $\beta$  シートリッチな二次構造は、CD スペクトル測定すると、216 nm 付近の負の極大をもつスペクトルが現れる。 $\alpha$ -synuclein のみで振盪させた場合、スペクトルは 216 nm の負の極大を示し、典型的な  $\beta$  シートリッチ構造、つまりアミロイド線維形成が示された。共存させた Hsp60 WT や Hsp60 GW のスペクトルを差し引いた正味の  $\alpha$ -synuclein のスペクトルを比較すると、Hsp60 GW は低濃度でアミロイド線維形成を抑えたことが、216 nm の負の値の比較からも明らかになった。また、長時間の振盪などによる Hsp60 の 14 量体の解離は見られなかった(図 3-3-2)。

次に、Hsp60 WT や Hsp60 GW と  $\alpha$ -synuclein との結合を共免疫沈降・ウェスタンブロット法と QCM で調べた。ウェスタンブロットと組み合わせた共免疫沈降法は、抗体を使用することでタンパク質同士の結合を特異的に検出できる実験手法である。図 3-3-5 に示すように、Hsp60 WT や Hsp60 GW と  $\alpha$ -synuclein との結合が示された。そこで、それぞれの結合の強さを調べるため  $K_d$  値の測定を行なった。本研究で  $K_d$  値の測定に用いた QCM 法は、Fluorescence cross correlation spectroscopy (FCCS) や表面プラズモン共鳴に比べ、認知度が低い。そこで、QCM で測定した  $K_d$  値が、FCCS で測定した  $K_d$  値と一致するかどうかが調べたところ、図 3-4 に示すように、1 mM ATP 存在下の Hsp60 WT と Hsp10 の  $K_d$  値は  $8.3 \times 10^{-8}$  M という値を得た。この値は、Ishida ら[95]が FCCS で測定し、得た  $K_d$  値( $8.7 \times 10^{-8}$  M) とよく一致した。

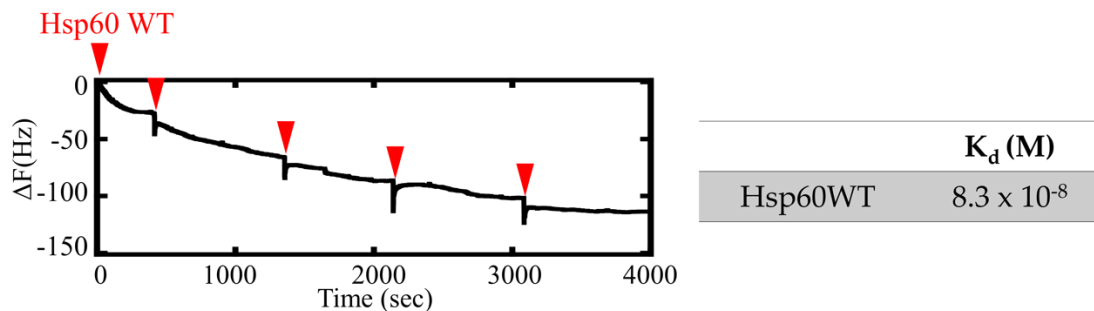


図 3-4. 1 mM ATP 存在下での Hsp60 WT と Hsp10 の  $K_d$  値測定  
赤矢じりは、Hsp60 WT を添加した時点を示す。

Hsp60 GW の  $K_d$  値(0.963 nM)は、Hsp60 WT(4.29 nM)と比べ値が小さく、Hsp60 GW と  $\alpha$ -synuclein モノマーとの強力な結合を示した (図 3-3-6, 表 3-3-6)。 $k_{on}$ ,  $k_{off}$  値も併せて比較すると、Hsp60 WT に比べ Hsp60 GW は  $\alpha$ -synuclein と結合しやすく解離しにくいことがわかった。Hsp60 GW と  $\alpha$ -synuclein との強い結合や強力なアミロイド線維化抑制効果は、第二章で述べたように疎水領域の広さによるものと考えられる。



分子シャペロンには、脱凝集やアミロイド線維を分解できるものがある[96]。図 3-3-1 や図 3-3-6 の結果から、Hsp60 WT や Hsp60 GW が  $\alpha$ -synuclein のモノマーと相互作用してその後のアミロイド線維化を抑制する事が示された。しかし、成熟したアミロイド線維やアミロイド線維を形成するまでの中間体を分解し、モノマーに戻すことができるのかどうかは不明のままであった。そこで次に、 $\alpha$ -synuclein アミロイド線維化過程のさまざまな段階で Hsp60 WT や Hsp60 GW を遅延添加し、その効果を調べることにした。アミロイド線維化過程に対する遅延添加実験は、Kannaian ら[97]や Gong ら[98]によっても行なわれ、Thioflavin T 蛍光強度を下げたことから、脱凝集効果を報告した手法である。しかしながら図 3-3-7 に示すように、Hsp60 WT や Hsp60 GW を成熟したアミロイド線維段階(振盪 24 時間時点)で添加しても、Thioflavin T 蛍光強度を下げることはなかった。このことから、Hsp60 WT や Hsp60 GW が成熟したアミロイド線維を分解し、モノマーに戻す能力はない事が示された。モノマー・中間体・アミロイド線維が混在すると考えられる振盪 6 時間時点で Hsp60 WT を共存させた場合、共存後も Thioflavin T 蛍光強度は上昇したため、アミロイド線維化の抑制効果はなかった。一方、振盪 6 時間時点で Hsp60 GW を共存させた場合、その後の Thioflavin T 蛍光強度はほとんど変わらず、一定に保たれた。このことは、Hsp60 GW が線維伸長や新たな線維形成を抑制したことがうかがえる。

## 第四章 Hsp60 AD の単離と安定化

### 4-1. 緒言

Hsp60 ファミリーの AD は、ほかのタンパク質との相互作用に重要であることが知られている[99-101]。特に、研究が進む GroEL は、相互作用の詳細について明らかになりつつある。AD のヘリックス H とヘリックス I の疎水性残基が相手タンパク質（ポリペプチド）の疎水性領域と疎水性相互作用で結合することが報告されている。

1996 年、Zahn らは GroEL の基質結合ドメインである AD を切り出した断片が、ほかのタンパク質の構造形成の介助をすることを見だし、GroEL AD を「ミニシャペロン」と名付けた[102]。GroEL のセントラルキャビティーはシャペロンとしての働きに必要不可欠ではないことを示した。その翌年、Altamirano らは、GroEL AD をカラムに固定化したりフォールディングクロマトグラフィーを報告した[103]。変性したタンパク質をカラムにアプライすると、タンパク質はカラムを通過しながらリフォールディングするという革新的な手法であった。現在では、目的タンパク質が大腸菌内で封入体を形成した場合の精製法に活用されている[104]。GroELAD は、フュージョンシステムによる不溶性タンパク質の可溶化効果も報告されている[105,106]。さらに、Hsp60 グループの単離した AD がミニシャペロンとして働くという報告も複数ある[76,103,107]。Tam ら[107]は、CCT1 の AD が polyQ の凝集を抑制したことを示した。Ojha ら[77]は、GroELAD が  $\alpha$ -synuclein や A $\beta$ <sub>42</sub> のアミロイド線維化を抑制する事を報告した。第三章までの結果では、14 量体 Hsp60 の AD の配向変化によって  $\alpha$ -synuclein との相互作用やアミロイド線維化抑制効果に大きな差が生まれることを示した。そこで、Hsp60 の AD も他の Hsp60 グループの AD と同じように、AD 単独でシャペロン機能を持つかどうか検証することにした。第四章では、Hsp60 の AD を単離し、その安定化を行なった。

## 4-2. 材料と方法

### 4-2-1. Hsp60 AD の培養・精製

#### 4-2-1-1. pET28a(+)-hsp60AD プラスミド構築

ヒト hsp60 AD 遺伝子は human hsp60 を鋳型として PCR で下記プライマーを用いて増幅した。

hsp60 AD プライマー配列

5'-ACC ATG GGC ATG AAA TTC GAT CGC GGT TAT A-3' (forward)

5'-GTG GTG ATC ACT CAG TTT TGC CAG ACG TTC A-3' (reverse)

pET28a(+)ベクターは PCR で下記プライマーを用いて増幅した。

pET28a(+)ベクタープライマー配列

5' - CTG AGT GAT CAC CAC CAC CAC CAC CAC TGA GAT C - 3' (forward)

5' - TTT CAT GCC CAT GGT ATA TCT CCT TCT TAA AGT T - 3' (reverse)

hsp60AD 遺伝子は In-Fusion HD Cloning Kit (Takara Bio)を用いて pET28a(+)ベクターに挿入した。pET28a(+)-hsp60AD プラスミドの配列は DNA シークエンス解析で確認した。

#### 4-2-1-2. 形質転換

pET28a(+)-hsp60 AD プラスミドを大腸菌コンピテントセル *E. coli* BLR(DE3)に加え形質転換し、30 µg/mL のカナマイシン入り LB 寒天培地で一晚 37 °C で静置培養した。

#### 4-2-1-3. 大量培養

終濃度 30 µg/mL のカナマイシンを含んだ LB 液体培地 37 °C で試験管培養し、バツフル付

きフラスコでの本培養に移った。OD<sub>600</sub>が0.6に達したところで終濃度1 mMのIPTGを加えて、発現誘導した。IPTG添加後は培養温度を28°Cに下げ、8時間培養後、8000 rpm、25分、4°Cで集菌した。

#### 4-2-1-4. 精製

Hsp60 ADの精製は下記手順で行なった。

##### 1.菌体破碎

大量培養で得た菌体を10倍(w/v)量の[Hsp60 AD 精製 buffer(1)]に懸濁し、氷上でマグネティックスターラーを用いて攪拌した。そこにリゾチームを添加した。そのまま15分ほど攪拌を続けた。その後、氷上で超音波破碎し、14,000 rpm、4°C、30分遠心分離した。

##### 2.除核酸

遠心後上清を回収し、そこに終濃度2.5%となるようにストレプトマイシン溶液を滴下した。滴下はおよそ1 mL/minの流速で、マグネティックスターラーで攪拌しながら氷上で行なった。全量滴下後、終濃度0.1 mMのPMSFを添加し、そのまま氷上で30分攪拌を続けた。その後、14,000 rpm、4°C、25分遠心分離した。

##### **【溶液保存の場合】**

##### 3.硫酸アンモニウム分画

遠心後上清を回収し、そこに終濃度65%飽和となるように硫酸アンモニウムを氷上で攪拌しながら少量ずつ添加した。氷上でそのまま30分間、マグネティックスターラーで攪拌を続け、10,000 rpm、4°C、25分遠心分離した。

##### 4.陰イオン交換クロマトグラフィー

遠心後沈殿を回収し、少量の[Hsp60 AD 精製 buffer(2)]に溶解した。外液を[Hsp60 AD

精製 buffer(2)]として 4°Cで 2 時間透析後、外液を新たな[Hsp60 AD 精製 buffer(2)]として 2 時間透析を続けた。さらに外液を新たな[Hsp60 AD 精製 buffer(2)]として一晩透析をした。透析後サンプルを 14,000 rpm, 4°C, 20 分遠心分離し、その上清をフィルターろ過した。[Hsp60 AD 精製 buffer(3)] で平衡化した陰イオン交換クロマトグラフィーカラム (Resource Q 6 mL Column, Cytiva) にアプライし、0 - 0.5 M NaCl のグラジエントで溶出させた。流速は 2 mL/min で行なった。ピークが出現した画分を SDS-PAGE で分析し、Hsp60 AD が溶出した画分を回収した。

#### 5.アフィニティークロマトグラフィー

[Hsp60 AD 精製 buffer(4)] で平衡化したアフィニティークロマトグラフィーカラム (His Trap HP Column 5 mL Column, Cytiva) にアプライし、0 - 0.5 M Imidazole のグラジエントで溶出させた。流速は 2 mL/min で行なった。ピークが出現した画分を SDS-PAGE で分析し、Hsp60 AD が溶出した画分を回収した。20%グリセロールで-80°C保存し、使用前に [Hsp60 AD 精製 buffer(3)]で透析した。

#### 【凍結保存の場合】

#### 3.アフィニティークロマトグラフィー

遠心後上清を回収し、少量の[Hsp60 AD 精製 buffer(2)]に溶解した。外液を[Hsp60 AD 精製 buffer(2)]として透析後、[Hsp60 AD 精製 buffer(5)] で平衡化したアフィニティークロマトグラフィーカラム (His Trap HP Column 5 mL Column, Cytiva) にアプライし、0 - 0.5 M Imidazole のグラジエントで溶出させた。流速は 2 mL/min で行なった。ピークが出現した画分を SDS-PAGE で分析し、Hsp60 AD が溶出した画分を回収した。

#### 4.凍結乾燥

外液を 5 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> として 4°Cで 2 時間透析後、外液を 3 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> として 2

時間透析を続けた。さらに外液を 1 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> として一晩透析をした。10,000 rpm, 4°C, 20 分で遠心分離を行ない、上清を液体窒素で予備凍結した。その後、すみやかに凍結乾燥機にセットして真空状態で凍結乾燥した。凍結乾燥後は 4°C で保存した。

[Hsp60 AD 精製 buffer(1)]

50 mM Tris-HCl (pH 7.4 at 25°C)  
2 mM DTT  
2 mM EDTA  
100 mM NaCl

[Hsp60 AD 精製 buffer(2)]

50 mM Tris-HCl (pH 7.4 at 4°C)  
2 mM DTT  
0.1 mM PMSF

[Hsp60 AD 精製 buffer(3)]

50 mM Tris-HCl (pH 7.4 at 4°C)

[Hsp60 AD 精製 buffer(4)]

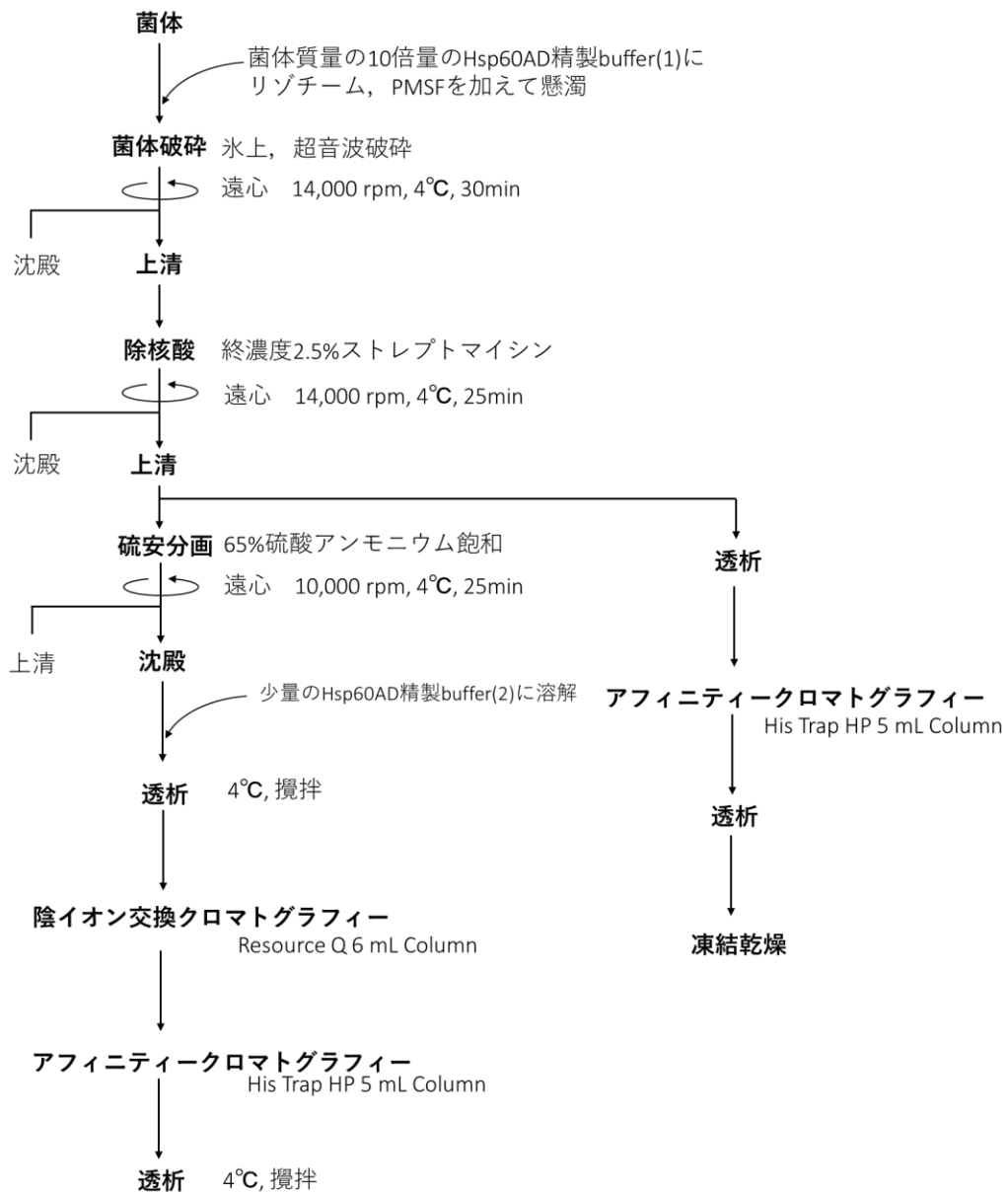
50 mM Tris-HCl (pH 7.4 at 4°C)  
2 mM DTT  
150 mM NaCl

[Hsp60 AD 精製 buffer(5)]

50 mM Tris-HCl (pH 7.4 at 25°C)  
150 mM NaCl

精製後 Hsp60 AD は、質量分析で理論値とほぼ同値であることを確認した。

## Hsp60 AD 精製の流れ



### 4-2-1-5. タンパク質の定量

Hsp60 AD の定量は、「2-2-1-5. タンパク質の定量」に記した方法で行なった。

#### 4-2-2. Hsp60 AD(Cys)の培養・精製

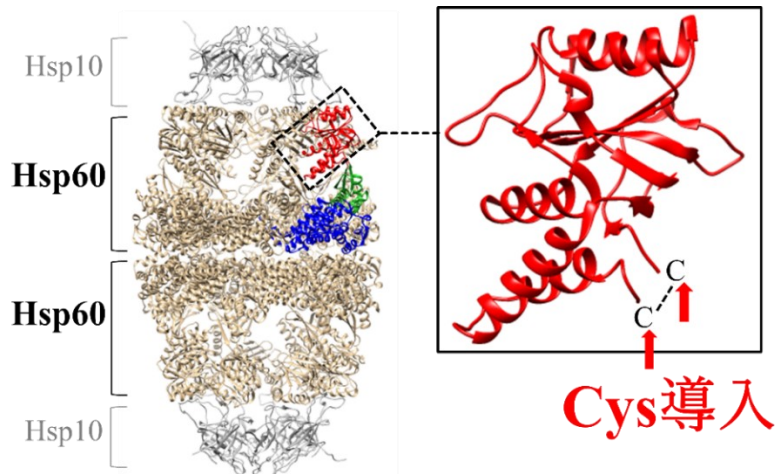


図 4-2-2. (左) Hsp60/Hsp10 複合体 (PDB ID: 4PJ1),  
(右) AD, 赤矢印はシステイン残基導入箇所を指す

##### 4-2-2-1. pET28a(+)-hsp60AD(Cys)プラスミド構築

PCR で下記プライマーを用いて hsp60AD 遺伝子の N 末端と C 末端の点変異遺伝子クローニングを行ない、システイン残基を導入した。

N 末端システイン残基導入プライマー配列

5'-ACC ATG TGC GGC ATG AAA TTC GAT CGC GGT T-3' (forward)

5'-CAT GCC GCA CAT GGT ATA TCT CCT TCT TAA AGT T-3' (reverse)

C 末端システイン残基導入プライマー配列

5'- AGT GAT TGC CAC CAC CAC CAC CAC TGA-3' (forward)

5'- GTG GTG GCA ATC ACT CAG TTT TGC CAG ACG-3' (reverse)

pET28a(+)-hsp60AD(Cys)プラスミドの配列は DNA シークエンス解析で確認した。



#### 4-2-2-2. 形質転換

pET28a(+)-hsp60 AD(Cys) プラスミドを大腸菌コンピテントセル *E. coli* BLR(DE3)に加え形質転換し、30 µg/mL のカナマイシン入り LB 寒天培地で一晩 37 °C で静置培養した。

#### 4-2-2-3. 大量培養

終濃度 30 µg/mL のカナマイシンを含んだ LB 液体培地 37 °C で試験管培養し、バツフル付きフラスコでの本培養に移った。OD<sub>600</sub> が 0.6 に達したところで終濃度 1 mM の IPTG を加えて、発現誘導した。一晩培養後、8000 rpm、20 分、4°C で集菌した。

#### 4-2-2-4. 精製

Hsp60 AD(Cys)の精製は下記手順で行なった。

##### 1.菌体破碎

大量培養で得た菌体を 10 倍(w/v)量の[Hsp60 AD(Cys)精製 buffer(1)]に懸濁し、氷上でマグネティックスターラーを用いて攪拌した。そこに 1/100 量のリゾチームと終濃度 1 mM の PMSF を添加し、氷上で 1 時間攪拌を続けた。その後、氷上で超音波破碎し、14,000 rpm、4°C、30 分遠心分離した。

##### 2.除核酸

遠心後上清を回収し、そこに終濃度 2.5%となるようにストレプトマイシン溶液を滴下した。滴下はおよそ 1 mL/min の流速で、マグネティックスターラーで攪拌しながら氷上で行なった。全量滴下後、そのまま氷上で 30 分攪拌を続けた。その後、14,000 rpm、4°C、30 分遠心分離した。

##### 3.アフィニティークロマトグラフィー

遠心後上清を回収した。外液を[Hsp60 AD(Cys)精製 buffer(2)]として 4°C で 2 時間透析後、外液を新たな[Hsp60 AD(Cys)精製 buffer(2)]として 2 時間透析を続けた。さらに外

液を新たな[Hsp60 AD(Cys)精製 buffer(2)]として一晩透析をした。[Hsp60 AD(Cys)精製 buffer(2)] で平衡化したアフィニティークロマトグラフィーカラム (His Trap HP Column 5 mL Column, Cytiva) にアプライし、0 - 0.6 M Imidazole のグラジエントで溶出させた。流速は 2 mL/min で行なった。ピークが出現した画分を SDS-PAGE で分析し、Hsp60 AD(Cys)が溶出した画分を回収した。

#### 4.陰イオン交換クロマトグラフィー

回収サンプルを限外濾過濃縮し、外液を[Hsp60 AD(Cys)精製 buffer(3)]として 4°Cで 1 時間透析後、外液を新たな[Hsp60 AD(Cys)精製 buffer(3)]として 1 時間透析を続けた。さらに外液を新たな[Hsp60 AD(Cys)精製 buffer(3)]として一晩透析をした。透析後サンプルを 14,000 rpm, 4°C, 30 分遠心分離し、その上清をフィルターろ過した。[Hsp60 AD(Cys)精製 buffer(3)] で平衡化した陰イオン交換クロマトグラフィーカラム (Resource Q 6 mL Column, Cytiva) にアプライし、0 - 0.3 M NaCl のグラジエントで溶出させた。流速は 2 mL/min で行なった。ピークが出現した画分を SDS-PAGE で分析し、Hsp60 AD(Cys)が溶出した画分を回収した。

#### 5.凍結乾燥

外液を 5 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> として 4°Cで 2 時間透析後、外液を 3 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> として 2 時間透析を続けた。さらに外液を 1 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> として一晩透析をした。10,000 rpm, 4°C, 25 分で遠心分離を行ない、上清を液体窒素で予備凍結した。その後、すみやかに凍結乾燥機にセットして真空状態で凍結乾燥した。凍結乾燥後は 4°Cで保存した。

#### [Hsp60 AD(Cys)精製 buffer(1)]

50 mM Tris-HCl (pH 7.8 at 25°C)  
2 mM EDTA  
100 mM NaCl

[Hsp60 AD(Cys)精製 buffer(2)]

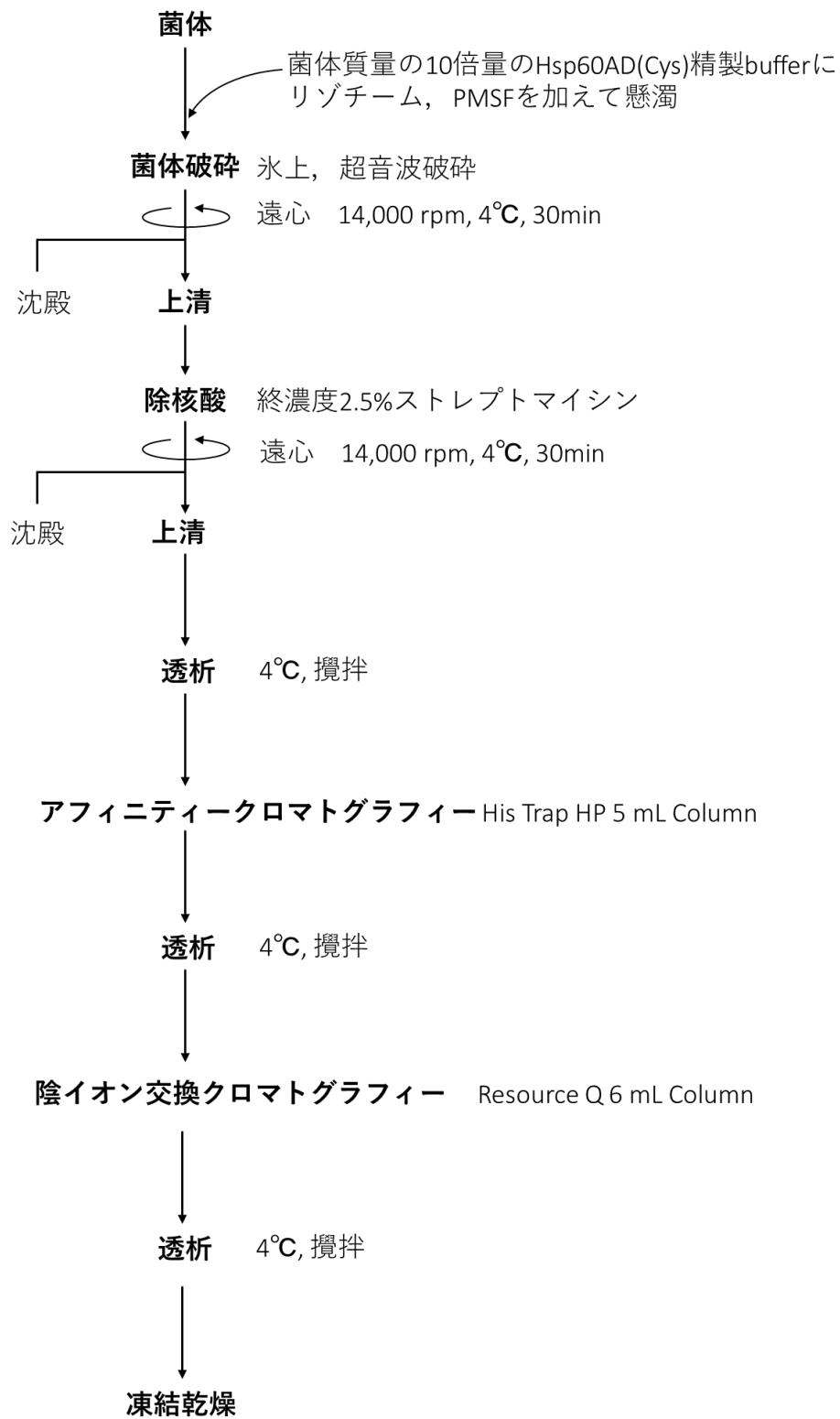
50 mM Tris-HCl (pH 7.4 at 4°C)

150 mM NaCl

[Hsp60 AD(Cys)精製 buffer(3)]

50 mM Tris-HCl (pH 7.4 at 4°C)

## Hsp60 AD(Cys)の精製の流れ



#### 4-2-2-5. タンパク質の定量

Hsp60 AD(Cys)の定量は、「2-2-1-5. タンパク質の定量」に記した方法で行なった。

#### 4-2-2-6. DTNB 試薬を用いた SH 基の比色定量

Hsp60 AD(Cys)が分子内ジスルフィド結合を形成しているかどうか調べるため、還元剤存在下・非存在下で 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB)を用いてチオール基(SH 基)の定量を行なった。Ellman's Reagent の DTNB は、SH 基を比色定量に使用されている。DTNB は SH 基と反応し、ジスルフィド結合が切れて安定な 5-Mercapto-2-nitrobenzoic acid (TNB)を生成する。TNB の最大吸収波長 412 nm の吸光度を測定することで、サンプル中の SH 基を定量できる[108]。測定は、 $2.60 \times 10^{-5}$  (M)の濃度で行なった。下記の式 4-2-2-6 からサンプルの SH 基の数を算出した。

$$A_{412} = \epsilon_{412} * l * c \quad (\text{式 4-2-2-6.})$$

$A_{412}$ : 412 nm 吸光度,  $\epsilon_{412}$ : TNB のモル吸光係数= $14150 \text{ [M}^{-1} \text{ cm}^{-1}]$ ,

$l$ : 光路長 [cm],  $c$ : モル濃度 [M]

[還元剤非存在下サンプル]

1. Hsp60 AD(Cys)を[SH 基定量バッファ(3)]で溶解
2. タンパク質定量
3. [SH 基定量組成]で 412 nm 吸光度測定

[還元剤存在下サンプル]

1. Hsp60 AD(Cys)を[SH 基定量バッファ(4)]で溶解
2. 一晚 25°C 静置

3. PD-10 カラムを用いた脱塩
4. タンパク質定量
5. [SH 基定量組成]で 412 nm 吸光度測定

[SH 基定量組成]

SH 基定量バッファー(1)	1 mL
SH 基定量バッファー(2)	250 $\mu$ L
サンプル	250 $\mu$ L

[SH 基定量バッファー(1)]

0.2 M	Tris-HCl (pH8.5 at 25°C)
1 mM	EDTA
6 M	Gdn-HCl

[SH 基定量バッファー(2)]

10 mM	Tris-HCl (pH7.0 at 25°C)
1 mM	EDTA
4 M	Gdn-HCl
0.4 mM	DTNB

[SH 基定量バッファー(3)]

10 mM	Tris-HCl (pH7.0 at 25°C)
1 mM	EDTA
4 M	Gdn-HCl

[SH 基定量バッファー(4)]

10 mM	Tris-HCl (pH7.0 at 25°C)
1 mM	EDTA
4 M	Gdn-HCl
10 mM	DTT

#### 4-2-2-7. 温度変化における二次構造解析

Hsp60 AD と Hsp60 AD(Cys)の温度変化による二次構造への影響を調べるため、下記手順でさまざまな温度でインキュベート後、CD スペクトル測定を行なった。

1. [AD/AD(Cys)温度変化測定バッファー]に Hsp60 AD が 1 mg/mL(または Hsp60 AD(Cys) が 0.5 mg/mL)の濃度になるように調整
2. 各温度で一晩静置
3. 25 mM Tris-HCl (pH 7.4 at 37°C)で 10 倍希釈
4. 光路長 0.1 cm の合成石英セル(GL Sciences)にサンプルを投入し、円二色性分散計(J-820, JASCO)を用いて測定

[AD/AD(Cys)温度変化測定バッファー]

25 mM Tris-HCl (pH7.4 at 37°C)  
150 mM NaCl

[CD スペクトル測定条件]

感度 Low (1000 mdeg)  
開始波長 250 nm  
終了波長 200 nm  
データ取り込み間隔 0.1 nm  
走査モード continuous  
走査速度 50 nm/min  
レスポンス 0.25 sec  
バンド幅 10 nm  
積算回数 10 回 or 16 回  
測定温度 25°C

### 4-3. 結果

#### 4-3-1. DTNB 試薬を用いた SH 基の比色定量

DTNB で Hsp60 AD(Cys)の分子内ジスルフィド結合形成を調べた。還元剤存在下・非存在下での Hsp60 AD(Cys)の SH 基定量結果を表 4-3-1 に示す。

表 4-3-1. Hsp60 AD(Cys)の還元処理有無による SH 基定量

	Abs 412 nm	SH 基数/分子
非還元条件	0.14	0.39
還元条件	0.49	1.33

#### 4-3-2. 温度変化における二次構造解析

温度変化における AD と AD(Cys)の二次構造への影響を CD スペクトル測定で調べた。図 4-3-2 に示したように、Hsp60 AD の CD スペクトル結果では、4°C、15°Cにおいては 205–210 nm の強い負のピークと 220–225 nm の弱い負のピークが観察された。対照的に、25°C、37°C と温度を上げると 205–210 nm のピークが消えた。一方で、Hsp60 AD(Cys)を温度変化させてもほとんど CD スペクトルに変化はなかった。

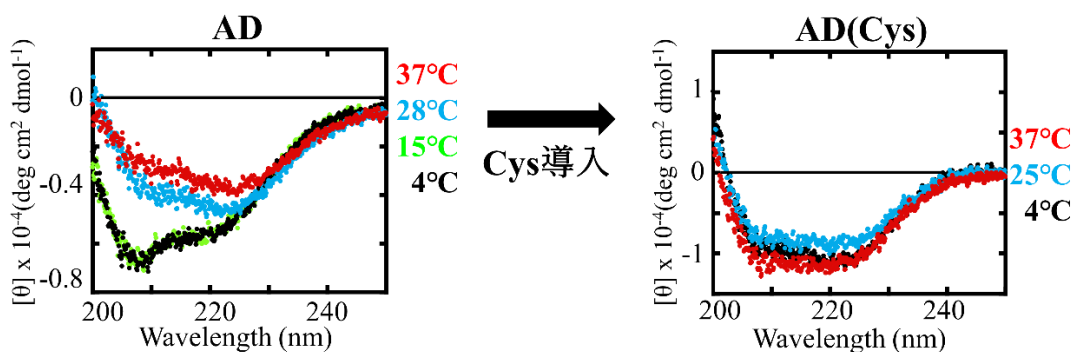


図 4-3-2. 温度変化における AD と AD(Cys)の CD スペクトル



#### 4-4. 考察

第四章では、Hsp60 AD の単離を行なった。単離 Hsp60 AD は、図 4-3-2 で示したように、4°Cや 15°Cのスペクトルの 210 nm 付近の負の極大は、温度が上がるにつれ消えた。このことから温度依存的に二次構造が変化する不安定な構造であることが分かった。また、凍結乾燥させた単離 Hsp60 AD は難溶解性であった。そこで、Hsp60 AD の N 末端と C 末端にシステイン残基を導入し、ジスルフィド結合による Hsp60 AD タンパク質の安定化をはかった。DTNB は、SH 基と反応し TNB を生成する。TNB の 412 nm の吸光度を測定することで、SH 基の濃度を求めることができる。そこで Hsp60 AD(Cys)の分子内ジスルフィド結合の形成を調べるため、還元条件・非還元条件で SH 基の定量を DTNB で行なった (表 4-3-1)。Hsp60 AD(Cys)には 3 つの SH 基があり、理論的には非還元条件では SH 基 1、還元条件では SH 基 3 という結果になるはずである。実験結果は、非還元条件では SH 基 0.39、還元条件では SH 基 1.33 であったが、非還元条件の値を基準に考えると、還元条件は 3.41 倍の値であり、およそ 3 倍の SH 基が還元条件で遊離していることが示された。このことから、N 末端と C 末端にシステイン残基を導入したことによる分子内ジスルフィド結合がかかったと考えた。

凍結乾燥の Hsp60AD は難溶解性であったが、凍結乾燥の Hsp60 AD(Cys)は、buffer にすみやかに溶解した。次に、図 4-3-2 で示したように、様々な温度における Hsp60 AD(Cys)の二次構造変化を調べた。Hsp60 AD と比較すると Hsp60 AD(Cys)は温度変化があっても二次構造がほとんど変化しない事が示された。分子内ジスルフィド結合の形成によって熱安定性を持ったと考えられた。ここで、低温である 4°Cの Hsp60 AD と Hsp60 AD(Cys)の CD スペクトルを比較すると、両者は異なったスペクトルを描いていることに着目した (図 4-3-2, 図 4-4-1(c)左・中央)。そこで、どちらが本来の Hsp60 AD の構造、つまり 14 量体構造の Hsp60 の中の AD に近いのか解析することにした。図 4-4-1(a) は、4°Cの Hsp60 AD と Hsp60 AD(Cys)の二次構造含量を CD スペクトルデータから BeStSel で解析した結果である。

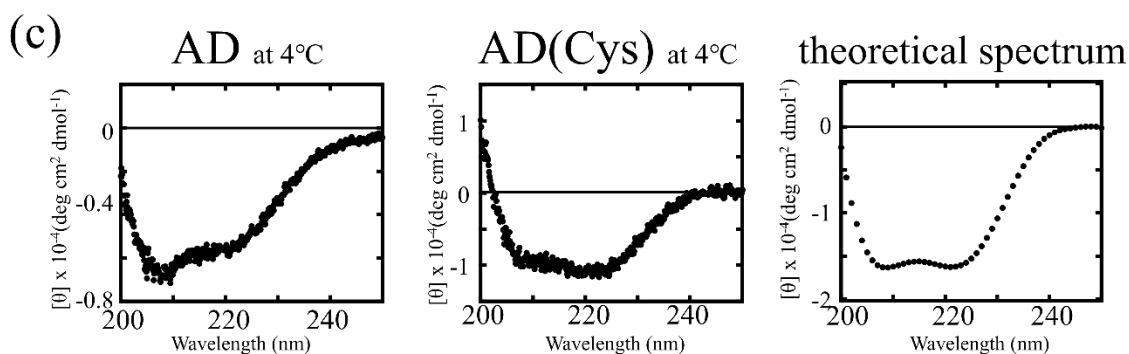
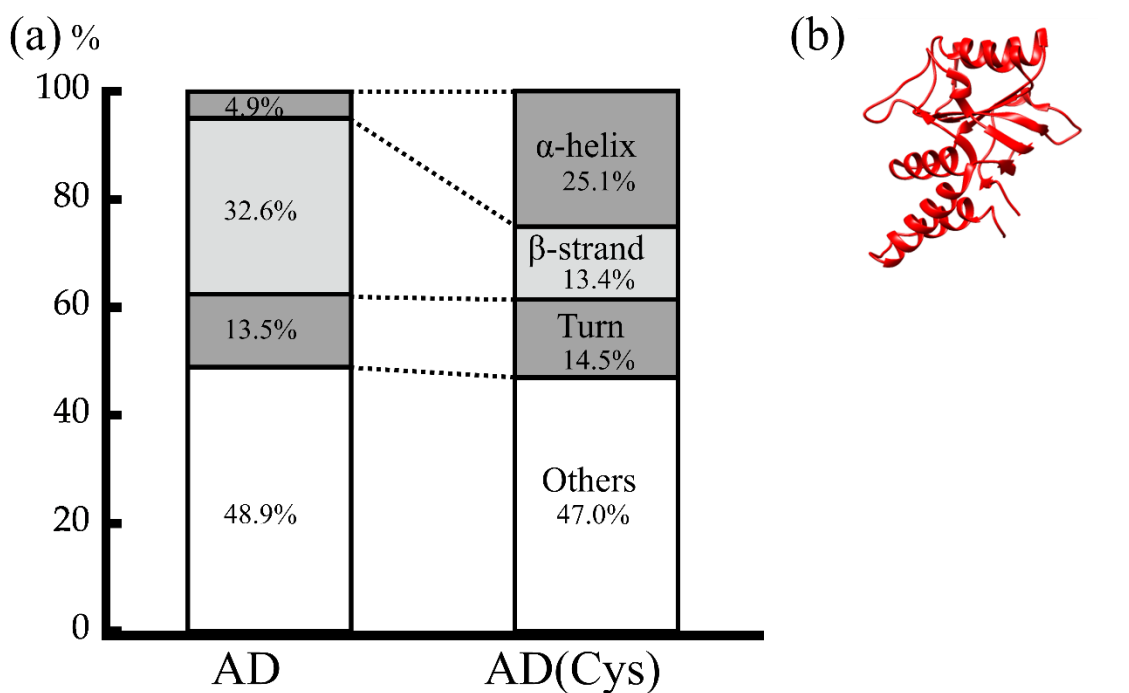


図 4-4-1. AD と AD(Cys)の二次構造解析

(a) BeStSel によって予測した CD スペクトルの二次構造含量データ (b) 結晶構造から得た Hsp60 AD の立体構造イメージ (PDB ID: 4PJ1, resolution: 3.15Å)

(c) 左と中央: 4°Cにおける AD と AD(Cys)の CD スペクトル。

右: CD スペクトルシミュレーションプログラム[109]を用いて描いた Hsp60 AD 結晶構造の理論 CD スペクトル

Hsp60 AD は  $\beta$  ストランドの含有割合が大きいですが、Hsp60 AD(Cys)は  $\alpha$  ヘリックスの含有割合が大きかった。結晶構造(PDB ID: 4PJ1)の Hsp60 AD (図 4-4-1(b)) を見ると、 $\alpha$  ヘリックスに富んだ構造であることがわかる。さらに、結晶構造(PDB ID: 4PJ1)で得た Hsp60 AD の

二次構造データをもとに、理論スペクトルをシミュレーションプログラムで描いた（図 4-4-1(c)右）。理論スペクトルと Hsp60 AD, Hsp60 AD(Cys)のスペクトルを比較すると、Hsp60 AD(Cys)が理論スペクトルに近いスペクトルであることがわかる。以上のことから、Hsp60 AD(Cys)は、14 量体構造の Hsp60 の中の AD に近い構造であることが示された。スペクトルの若干の違いは、システイン導入によるものと考えられる。Hsp60 AD については、結晶構造とかけ離れた構造を持ち、4°Cという低温でさえ、変性し本来の構造を保っていない可能性が高い。

さらに、Hsp60 AD(Cys)が単量体として存在しているのか、複数集合して多量体を形成しているのかをゲルろ過クロマトグラフィーと SDS-PAGE で解析した（図 4-4-2）。

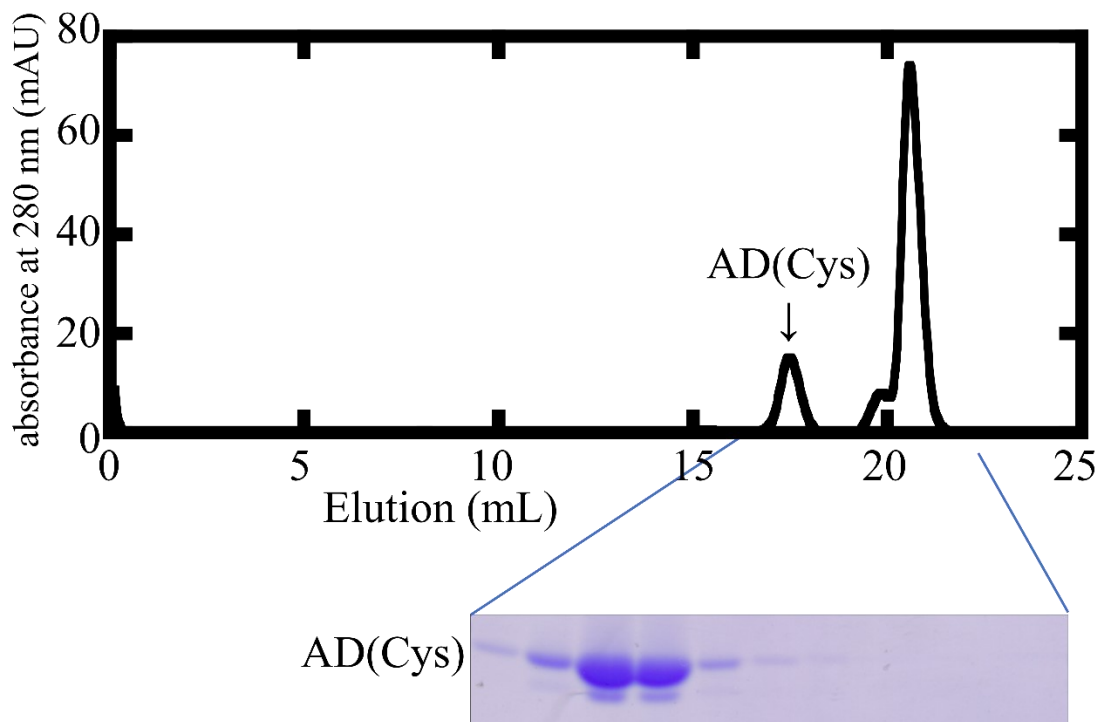


図 4-4-2. AD(Cys)のゲルろ過クロマトグラフィーとピークが出現したフラクションの SDS-PAGE

280 nm の吸収スペクトルは、17.0 - 18.0 mL (相当分子量: 11,000 - 6,300) と 20.0 - 21.0 mL (相当分子量: 2,200 - 1,300) に現れた。17 mL より高分子側にはピークは現れなかった。ピークの出現したフラクションを SDS-PAGE で解析すると、17 mL ほどで Hsp60 AD(Cys) が溶出されたことを示した。20 mL のピークは、バッファー由来の成分と考えられる。Hsp60 AD(Cys) の分子量は約 20,000 であり、17 mL 溶出の相当分子量とはわずかな差がある。これは、解析に使用したカラム (Superdex 200 Increase 10/300 GL, 分離分子量: 10,000 - 600,000) の分離限界に近いいため、差が生じたと考えられる。以上より、Hsp60 AD(Cys) は単量体として存在することが示された。

## 第五章 AD(Cys) による $\alpha$ -synuclein アミロイド線維化抑制効果

### 5-1. 緒言

多くのタンパク質は、固有の機能を持つドメインが組み立てられて立体構造を形成している。分子シャペロンのドメインを単離や除去し、その機能を検証する研究が進められている。Hsp110 の各ドメインを除去し解析した結果、シャペロン機能には中央の配列が欠かせない事が明らかになった[110]。アミロイド線維形成タンパク質への分子シャペロン単離ドメインのアミロイド線維化抑制効果についても、検証されている。全長 Hsp90 はインスリンの凝集を強力に抑制するが、N末端ドメインやC末端ドメインを単離したポリペプチドも、凝集抑制に働くことが示されている[111]。Noi らは *Thermoplasma acidophilum* 由来のグループ II 型シャペロニンの凝集抑制に対する効果を検証し、単離 AD がアミロイド線維化抑制効果を持つことを示した[101]。グループ I 型シャペロニンでは、GroEL の単離 AD が rhodanese のリフォールディング[102]や zebrafish dihydrofolate reductase の凝集抑制[112]、さらに  $\alpha$ -synuclein などのアミロイド線維化抑制[77]が示され、単離 GroELAD がミニシャペロンとして働くことが報告された。そこで第五章では、Hsp60 AD(Cys)の  $\alpha$ -synuclein アミロイド線維化抑制効果について検証した。

### 5-2. 材料と方法

#### 5-2-1. Thioflavin T による $\alpha$ -synuclein アミロイド線維化測定

Hsp60 AD(Cys)存在下・非存在下での  $\alpha$ -synuclein アミロイド線維化を調べるため、Thioflavin T 蛍光強度測定をプレートリーダーで行なった。 $\alpha$ -synuclein (0.5 mg/mL)はさまざまな濃度の

Hsp60 AD(Cys) 存在下で振盪させた。96 ウェルプレートの各ウェルには polytetrafluoroethylene ビーズを入れ, [Thioflavin T 測定 buffer]で調整し測定した。

[Thioflavin T 測定 buffer]

25 mM	Tris-HCl (pH 7.4 at 37°C)
150 mM	NaCl
20 μM	Thioflavin T

[Thioflavin T 測定条件]

測定機器	プレートリーダー (ARVO X4, PerkinElmer)
測定容器	96-well マイクロプレート (polystyrene plate, black with transparent bottom; Greiner Bio-One)
測定温度	37°C
振盪モード	orbital shaking
測定間隔	15 分
励起波長	450 nm
測定波長	486 nm

#### 5-2-2. 透過型電子顕微鏡(TEM)観察

Hsp60 AD(Cys)存在下・非存在下で振盪させた  $\alpha$ -synuclein サンプルは, 下記の手順で前処理を行なった。コロジオン膜貼付メッシュ(400 メッシュ, 銅タイプ, Nisshin EM)表面にサンプルをのせ, 90 秒間, 膜に静置した。超純水で膜表面を洗い, EM スтейナー(Nisshin EM)でネガティブ染色した。超純水で膜表面を洗い, デシケーターに一晩静置後, 観察した。TEM 観察は, JEM-1400plus (JEOL)を用いて 80 kV で行なった。

#### 5-2-3. 免疫沈降法による $\alpha$ -synuclein と AD(Cys)の結合解析

$\alpha$ -synuclein と Hsp60 AD(Cys)が結合するかどうか調べるため, 免疫沈降法とウェスタンブロット法を組み合わせて調べた。「3-2-6. 免疫沈降法による  $\alpha$ -synuclein と Hsp60 の結合解析」に記した方法で行なった。検出は, 下記の抗体を用いた。

[抗体情報]

anti-6xHis Tag	HIS.H8 (1/1000 dilution),	mouse,	Thermo Fisher Scientific
anti- $\alpha$ -synuclein	MJFR1(1/1000 dilution),	rabbit,	abcam
anti-rabbit IgG	1/10000 dilution,	Cytiva	
anti-mouse IgG	1/10000 dilution,	Cytiva	

5-2-4. QCM による  $\alpha$ -synuclein と AD(Cys)の相互作用解析

$\alpha$ -synuclein と AD(Cys)との相互作用を QCM で測定した。 $\alpha$ -synuclein はアミンカップリング法で基板に固定した。センサーセルは「3-2-7. QCM による  $\alpha$ -synuclein と Hsp60 GW の相互作用解析」に記した [センサー基板の基本洗浄]の手順で洗浄してから使用した。測定は下記[ $\alpha$ -synuclein/AD(Cys) QCM 測定法]の手順で行なった。測定後、次のサンプル測定をする場合は、下記[ $\alpha$ -synuclein/AD(Cys) センサー洗浄法]の手順でセンサー洗浄を行なった。

[ $\alpha$ -synuclein/AD(Cys) QCM 測定法]

1. carboxylic acid-SAM formation reagent 50  $\mu$ L 添加し、静置 1 時間
2. 超純水で洗浄
3. NHS 溶液 25  $\mu$ L と WSC 溶液 25  $\mu$ L の混合液を添加し、静置 15 分
4. 超純水で洗浄
5. 0.1 mg/mL  $\alpha$ -synuclein 50  $\mu$ L 添加し、静置 1 時間
6. 超純水で洗浄
7. Ethanolamine 溶液 100  $\mu$ L 添加し、静置 30 分間以上
8. クエン酸 buffer(pH4.0)をセンサーに入れ、センサーの安定を待った
9. AD(Cys)を添加し、測定

Ethanolamine 溶液とクエン酸 buffer(pH4.0)は AFFINIX 専用固定化キット(ULVAC)に含まれるものを使用した。

[ $\alpha$ -synuclein/AD(Cys) センサー洗浄法]

1. 測定後セルを超純水で洗浄
2. 3M Gdn-HCl 10  $\mu$ L 添加し, 静置 5 分
3. 超純水で洗浄
4. [ $\alpha$ -synuclein/AD(Cys) QCM 測定法]の 8.からもう一度行ない, 次のサンプルを測定した

5-2-5.  $\alpha$ -synuclein アミロイド線維化過程における AD(Cys)遅延添加効果の検証

$\alpha$ -synuclein のアミロイド線維化過程のさまざまな段階で AD(Cys)を添加し, その効果を調べるために遅延添加実験を行なった。 $\alpha$ -synuclein のアミロイド線維化過程 0 時間 (初めから AD(Cys)存在下), 2 時間, 6 時間, 24 時間時点で 3 モル比の AD(Cys)を添加し, Thioflavin T 蛍光強度の変化を比較した。



### 5-3. 結果

#### 5-3-1. Thioflavin T による $\alpha$ -synuclein アミロイド線維化測定

図 5-3-1 に示すように、Thioflavin T 蛍光強度は、AD(Cys)の濃度依存的に抑えられた。2 モル比や 3 モル比の AD(Cys)存在下では  $\alpha$ -synuclein の Thioflavin T 蛍光強度は、強く抑えられた。

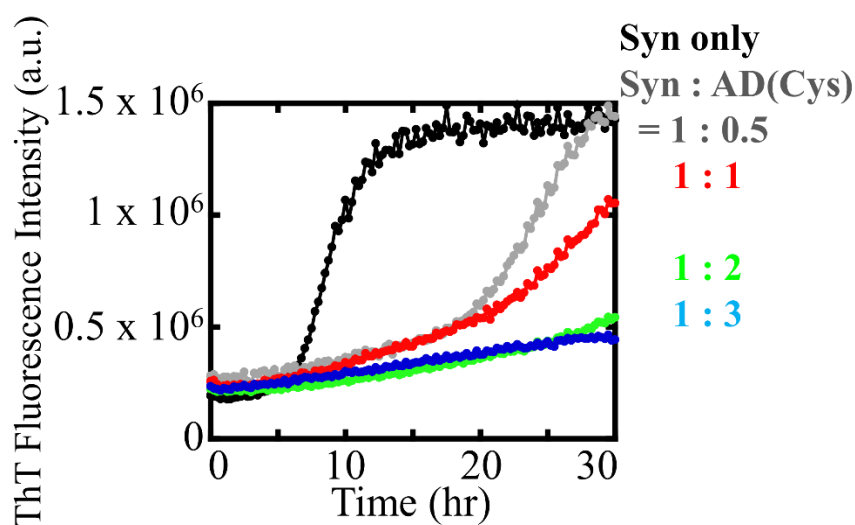


図 5-3-1. AD(Cys)存在下・非存在下で  
アミロイド線維形成した  $\alpha$ -synuclein の Thioflavin T 蛍光強度の変化  
(黒)  $\alpha$ -synuclein のみ、 $\alpha$ -synuclein : AD(Cys)のモル比で  
(灰色) 1 : 0.5, (赤) 1 : 1, (緑) 1 : 2, (青) 1 : 3

#### 5-3-2. 透過型電子顕微鏡(TEM)観察

AD(Cys)が  $\alpha$ -synuclein のアミロイド線維形成に与える効果を調べるため、TEM 観察を行なった。AD(Cys)存在下もしくは非存在下で  $\alpha$ -synuclein を 30 時間振盪した後、観察した (図 5-3-2)。 $\alpha$ -synuclein のみで振盪させたサンプルは、線維が多く形成されていた。1 モル比の AD(Cys)存在下では線維が部分的に観察され、3 モル比 AD(Cys)存在下では線維は観察され

なかった。

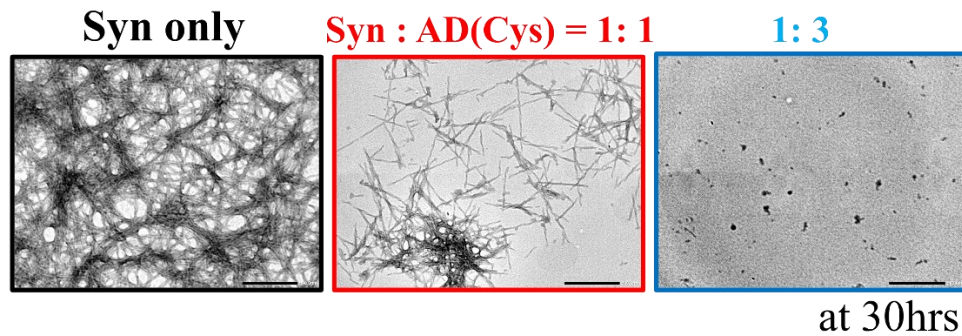


図 5-3-2. AD(Cys)存在下・非存在下で 30 時間振盪した  $\alpha$ -synuclein の TEM 画像  
 $\alpha$ -synuclein のみ (黒), AD(Cys)存在下 (1 モル比 : 赤, 3 モル比 : 青)  
スケールバーは 500 nm。

### 5-3-3. 免疫沈降法による $\alpha$ -synuclein と AD(Cys)の結合解析

AD(Cys)と  $\alpha$ -synuclein が結合するかどうかを調べるため、免疫沈降法とウェスタンブロット法を組み合わせる解析を行なった。図 5-3-3 に示したように、免疫沈降法で His タグ抗体 (AD(Cys)の検出) に反応させた後、ウェスタンブロット法で  $\alpha$ -synuclein 抗体を用いて検出した場合も、免疫沈降法で  $\alpha$ -synuclein 抗体に反応させた後、ウェスタンブロット法で His タグ抗体 (AD(Cys)) を用いて検出した場合もバンドが検出されたため、AD(Cys)が  $\alpha$ -synuclein と結合することが示された。

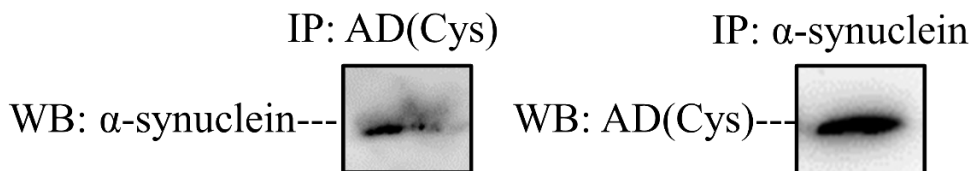


図 5-3-3. 免疫沈降法とウェスタンブロット法による結合解析

#### 5-3-4. QCM による $\alpha$ -synuclein と AD(Cys)の相互作用解析

AD(Cys)と  $\alpha$ -synuclein の相互作用を定量するために QCM 法で解析を行なった。図 5-3-4 は基板に固定した  $\alpha$ -synuclein とさまざまな濃度の AD(Cys)の相互作用のセンサーグラムを示す。加えた AD(Cys)の濃度が高いほど  $\Delta F$  が大きくなった。得られた  $k_{on}$ ,  $k_{off}$ ,  $K_d$  値は、表 5-3-4 にまとめた。 $\alpha$ -synuclein に対する AD(Cys)の  $K_d$  値は、5.04 nM であった。

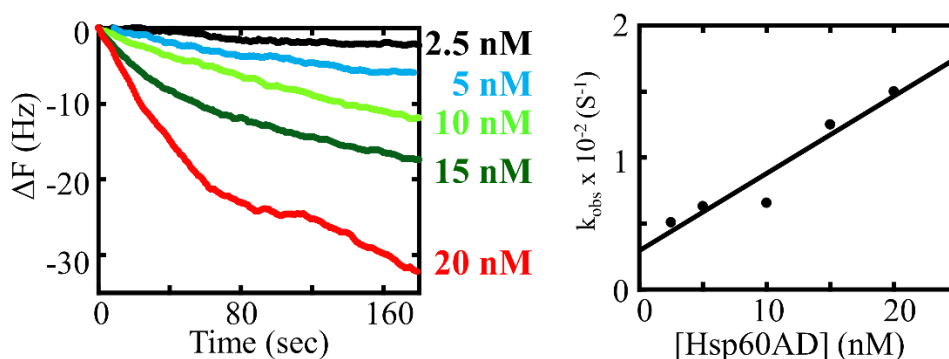


図 5-3-4. 基板に固定した  $\alpha$ -synuclein モノマーへの AD(Cys)の相互作用解析 (左) AD(Cys)の濃度はそれぞれ 2.5 nM (黒), 5 nM (水色), 10 nM (黄緑), 15 nM (濃い緑), 20 nM (赤)。(右)  $k_{obs}$  と各濃度の AD(Cys)の相関図

表 5-3-4. 図 5-3-4 から得た  $\alpha$ -synuclein と AD(Cys)の  $K_d$ ,  $k_{on}$ ,  $k_{off}$  値

Sample	$K_d$ (nM)	$k_{on}$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )	$k_{off}$ ( $s^{-1}$ )
Hsp60 AD(Cys)	5.04	$5.85 \times 10^5$	$2.95 \times 10^{-3}$

#### 5-3-5. $\alpha$ -synuclein アミロイド線維化過程における AD(Cys)遅延添加効果の検証

$\alpha$ -synuclein のアミロイド線維化過程の早期段階である 0 時間 (初めから AD(Cys)存在下) や 2 時間で AD(Cys)を共存させると, Thioflavin T 蛍光強度はほとんど上昇せず, アミロイド線維形成を強く抑制したことが示された (図 5-3-5)。一方で, 線維伸長 (Thioflavin T の蛍光強度の上昇) が飽和に達し, 成熟したアミロイド線維が形成されたと考えられる時点 (振盪開始から 24 時間) で AD(Cys)を共存させても, Thioflavin T 蛍光強度を下げる効果は示さな

かった。

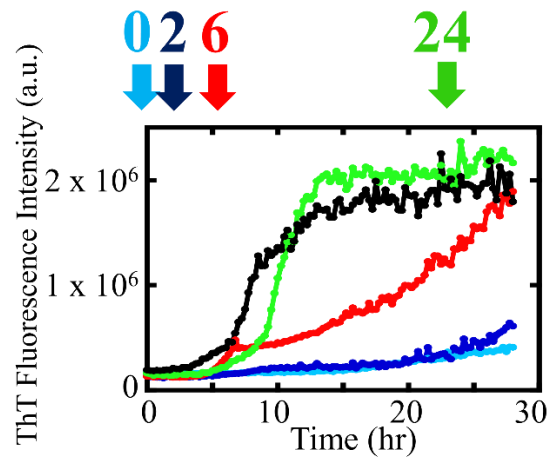


図 5-3-5.  $\alpha$ -synuclein アミロイド線維化過程における AD(Cys)遅延添加効果  
3 モル比の AD(Cys)を  $\alpha$ -synuclein 振盪開始 0 時間(水色),  
2 時間(濃い青), 6 時間(赤), 24 時間 (緑) に添加した。  
黒は  $\alpha$ -synuclein のみで振盪させた条件を示す。

## 5-4. 考察

眼のレンズ機能を担う水晶体には  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ -クリスタリンが多く存在し, このうち  $\alpha$ -クリスタリンは,  $\beta$ -クリスタリンや  $\gamma$ -クリスタリンの会合・凝集を防ぐシャペロン機能を持つ。Sharma ら [113] は,  $\alpha$ -クリスタリンのサブユニット由来のペプチドもシャペロンのように機能することを示した。そのほか, 4-1.や 5-1.緒言で述べたように, シャペロンの一部を単離し, そのシャペロン効果を報告した研究は数多くあるが, Hsp60 AD についての報告は本研究が初めてである。

第五章では, AD(Cys)がミニシャペロンとして機能し,  $\alpha$ -synuclein アミロイド線維化を抑制するかどうかを検証した。2 等量や 3 等量の AD(Cys)を共存させると Thioflavin T 蛍光強度の上昇を抑えた。図 5-3-2 の TEM の結果からも 1 等量 AD(Cys)存在下では線維形成を完全には抑えられていないが, 3 等量存在下では線維形成を抑えたことが示された。14 量体構造 Hsp60 GW による  $\alpha$ -synuclein のアミロイド線維化抑制効果(図 3-3-1)では, 0.1 モノマーモル比 Hsp60 GW が Thioflavin T 蛍光強度の上昇を抑え, アミロイド線維化を抑制した。この結果は, 14 量体構造 Hsp60 GW に比べると, AD(Cys)はアミロイド線維化抑制に 20 倍以上の量が必要ということを示している。

図 5-3-3 の結果は AD(Cys)と  $\alpha$ -synuclein モノマーが結合することを示した。その結合の強さを調べるため,  $K_d$ ,  $k_{on}$ ,  $k_{off}$  値を測定した (図 5-3-4)。Hsp60 WT と Hsp60 GW の結果 (表 3-3-6) と AD(Cys)の結果 (表 5-3-4) を比較すると, AD(Cys)は  $K_d$ ,  $k_{on}$ ,  $k_{off}$  値すべての値が 14 量体 Hsp60 より大きい。特に, AD(Cys)の  $k_{off}$  値は 14 量体 Hsp60 より一桁大きい値を示した。AD(Cys)は 14 量体 Hsp60 より  $\alpha$ -synuclein と速く結合するが, とても速く解離するため, 結果的に解離しやすいことが分かった。14 量体構造より AD 単独の  $\alpha$ -synuclein に対する  $k_{off}$  値や  $K_d$  値が大幅に大きくなる傾向は, GroEL でも見られた(表 5-4)。このことから, Hsp60 は 14 量体構造のようにリングを形成することが,  $\alpha$ -synuclein モノマーを離さず捉え続けることに重要であると考えられる。

表 5-4. GroEL と  $\alpha$ -synuclein の  $K_d$ ,  $k_{on}$ ,  $k_{off}$  値測定結果 ([18,77]に基づく)

Sample	$K_d$ (nM)	$k_{on}$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )	$k_{off}$ ( $s^{-1}$ )
GroEL WT	30.6	$2.6 \times 10^4$	$7.98 \times 10^{-4}$
GroEL GW	8.4	$19.6 \times 10^4$	$16.4 \times 10^{-4}$
GroEL AD	$K_d: (1.23 \pm 0.31) \times 10^3$	$k_{on}^{slow}: 9.2 \times 10^2$	$k_{off}^{slow}: 1.7 \times 10^{-2}$
	$K_d^{slow}: 1.8 \times 10^4$		
	$K_d^{fast}: 21 \times 10^4$		

AD(Cys)の遅延添加実験 (図 5-3-5) では,  $\alpha$ -synuclein がモノマーの時点の 0 時間や 2 時間で共存させると, その後の  $\alpha$ -synuclein アミロイド線維形成を強く抑制することが示された。

AD(Cys)は 14 量体 Hsp60 に比べ, 大きさが小さいという特徴がある。そこで, AD(Cys)を細胞に導入し, 細胞内で  $\alpha$ -synuclein 凝集に対する効果を第六章で検証することにした。

## 第六章 細胞内での AD(Cys) による $\alpha$ -synuclein 凝集抑制効果

### 6-1. 緒言

通常、分子シャペロンは、細胞内で発現したものがその機能を発揮する。しかしそれだけでなく、細胞外から細胞内に人為的に分子シャペロンを導入した場合も機能し、酸化ストレスやタンパク質の凝集から細胞を守ることが報告されている。細胞膜透過性ペプチドを融合した  $\alpha$ -クリスタリン由来のミニシャペロンが酸化ストレスによる細胞死を抑制した[114]。Subrizi ら[115] は、培地に添加した Hsp70 は細胞に取り込まれ、後期エンドソームやリソソームに局在し、細胞が受ける酸化ストレスを減少させたことを示した。細胞質 Hsp60(CCT) は、単離 AD を細胞培地に添加すると細胞内に取り込まれ、変異型 Huntingtin の凝集や毒性を抑える効果が報告されている[76]。そこで第六章では、単離 Hsp60 AD(Cys)の細胞内  $\alpha$ -synuclein 凝集・細胞障害性の抑制効果を検証することにした。

### 6-2. 材料と方法

#### 6-2-1. GFP-SNCA プラスミド構築

pCAG-GFP プラスミドは Connie Cepko 氏から得た (Addgene, plasmid #11150; <http://n2t.net/addgene:11150> (accessed on 18 Dec 2019); RRID:Addgene\_11150Addgene)。  
neomycin/kanamycin 耐性遺伝子を含む IRES2-AcGFP1-Nuc プラスミドは Takara Bio 社から購入した。pCAG-GFP 遺伝子と IRES2-AcGFP1-Nuc 遺伝子は PCR で下記プライマーを用いて増幅した。

pCAG-GFP プライマー配列

5'- CAT GCA TGT CGA CAT TGA TTA TTG ACT AGT TA -3' (forward)

5'- GCC TCA GAG TGA GCG CAA CGC AAT TAA TGT -3' (reverse)

IRES2-AcGFP1-Nuc プライマー配列

5'- CGC TCA CTC TGA GGC GGA AAG AAC CAG CTG TG -3' (forward)

5'- ATG TCG ACA TGC ATG GCG GTA ATA CGG TTA TCC A -3' (reverse)

PCR 産物は、In-Fusion 法で融合し、pCAG-GFP-Neo プラスミドを作製した。次に、overlap extension PCR 法で Rabbit Globin poly A と SV40 promoter の間に *Xho* I 制限酵素サイトを挿入した。使用したプライマーは下記に記した。

pCAG-GFP-Neo, *Xho* I 制限酵素サイト挿入プライマー配列

5'- CAA CAC TCG AGC CGG AAG CAT AAA GTG T -3' (forward)

5'- CCG GCT CGA GTG TTG TGT GGA ATT GTG A -3' (reverse)

さらに pCAG-GFP-Neo 遺伝子は下記プライマーを用いて増幅した。

pCAG-GFP-Neo プライマー配列

5'- AGC GGC CGC ACT CCT CAG GTG CAG -3' (forward)

5'- CTT GTA CAG CTC GTC CAT GCC GAG AGT -3' (reverse)

SNCA( $\alpha$ -synuclein)遺伝子は下記プライマーを用いて増幅した。鋳型プラスミドは pET23a-SNCA を用いた。



SNCA( $\alpha$ -synuclein) プライマー配列

5' – GAC GAG CTG TAC AAG ATG GAT GTA TTC ATG AAA GGA CTT TC – 3' (forward)

5' – AGG AGT GCG GCC GCT TTA GGC TTC AGG TTC GTA GTC TTG A – 3' (reverse)

$\alpha$ -synuclein 遺伝子 PCR 産物は、PCR で増幅した pCAG-GFP-Neo ベクターに In-Fusion 法で挿入した。

#### 6-2-2. Neuro2a 細胞培養

マウス神経芽細胞腫 Neuro 2a 細胞(N2a 細胞)は Public Health England から購入し、10%ウシ胎児血清(fetal bovine serum : FBS, Biological Industries), MEM 非必須アミノ酸溶液(FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation), 100  $\mu$ M ピルビン酸ナトリウム (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation), 100 U/mL ペニシリンストレプトマイシン (Thermo Fisher Scientific) を含んだ Minimum Essential 培地(MEM, Thermo Fisher Scientific)で培養した。細胞は湿度を保った 5% CO<sub>2</sub>, 37°Cの条件下で培養した。

#### 6-2-3. GFP- $\alpha$ -synuclein 安定発現株樹立

pCAG-GFP- $\alpha$ -synuclein-Neo プラスミドは、*Xho* I 制限酵素で処理して一本鎖にし、エレクトロポレーション法(NEPA21 Super Electroporator, Nepa Gene)で N2a 細胞に導入した。導入から 3 日後、10% FBS + MEM 培地から 500  $\mu$ g/mL G418 (Geneticin) を含んだ培地に培地交換した。培養後、蛍光顕微鏡(ZEISS Axiovert 200)で強い GFP 蛍光を発する 48 コロニーを選び、48 ウェルプレートに 1 コロニーを 1 ウェルずつ入れて 10% FBS + MEM 培地でさらに培養した。細胞がプレートに接着したことを確認後、10% FBS + MEM +500  $\mu$ g/mL G418 培地に交換し、80%コンフルエントまで培養した。蛍光顕微鏡で強い GFP 蛍光を発する 18 ウェルを選び、6 ウェルプレート 3 枚に 1 ウェルずつ入れて 10% FBS + MEM 培地でさらに培

養した。2日後、10% FBS + MEM + 500 µg/mL G418 培地に交換し、80%コンフルエントまで培養した。18 ウェルから蛍光顕微鏡で強い GFP 蛍光を発する 1 ウェルを選び、フラスコに継代し、80%コンフルエントまで培養した。この後、継代を続けた細胞を GFP- $\alpha$ -synuclein 安定発現 N2a 細胞として使用した。Tali image cytometer (Thermo Fisher Scientific)を用いて 99%の細胞が GFP 蛍光を発していることを確認した。

#### 6-2-4. 6-OHDA による GFP- $\alpha$ -synuclein 凝集形成の観察

6-hydroxydopamine(6-OHDA)は、ドーパミン作動性ニューロンを変性させる神経毒であり、パーキンソン病の研究で広く用いられている[116,117]。GFP- $\alpha$ -synuclein 安定発現 N2a 細胞に終濃度 10 µM の 6-OHDA を添加し、37°Cで 24 時間インキュベートした。なお、6-OHDA は 20 mM L-アスコルビン酸/PBS で溶解後、フィルター滅菌して使用した。

#### 6-2-5. AD(Cys)の細胞内導入

GFP- $\alpha$ -synuclein 安定発現 N2a 細胞を 6 ウェルプレートで 80%コンフルエントまで培養した。30 µg の Hsp60 AD(Cys)タンパク質を 3.0 µg の“Prote-in” Transfection Reagent (Hygieia Bioscience)と混合し 1 時間静置して複合体形成させた。混合物 (Hsp60 AD(Cys)と細胞膜透過ペプチドの複合体) を細胞に添加し、3 時間 37°Cでインキュベートした。

#### 6-2-6. 細胞内での AD(Cys)による GFP- $\alpha$ -synuclein 凝集形成抑制効果の検証

下記の手順で細胞の免疫染色反応を行なった。

1. GFP- $\alpha$ -synuclein 安定発現 N2a 細胞を Hoechst 33342 (Dojindo Laboratories)を 0.5 µL/ウェル 添加し 30 分間 37°Cでインキュベートし核染色
2. PBS で 2 回洗浄
3. 4%パラホルムアルデヒドを 1 mL/ウェル入れて 30 分間室温で静置

4. PBS で 2 回洗浄
5. 0.2% Triton X-100/PBS を 1 mL/ウェル入れて 10 分間室温で静置し，透過処理
6. PBS で 3 回洗浄
7. 1% BSA/PBS を入れて 1 時間室温で静置し，ブロッキング
8. 4°C，オーバーナイトで静置し，一次抗体反応
9. PBS で 3 回洗浄
10. 室温，1 時間静置し，二次抗体反応
11. PBS で 3 回洗浄
12. SlowFade Diamond Antifade Mountant (Thermo Fisher Scientific)を使用して封入し，一晩以上静置
13. 共焦点レーザー走査型顕微鏡(FLUOVIEW FV10i, Olympus)で観察

[一次抗体情報]

anti-6xHis Tag HIS.H8 (1/1000 dilution), mouse, Thermo Fisher Scientific

[二次抗体情報]

anti-mouse IgG Alexa Fluor 647(1/1000 dilution), abcam

#### 6-2-7. AD(Cys)による細胞死抑制効果

細胞死測定は，Ethidium Homodimer 1 (EthD-1)で染色し，Tali™ Image-Based Cytometer (Thermo Fisher Scientific)を用いて行なった。実験は，3つの異なったロットの GFP- $\alpha$ -synuclein 安定発現 N2a 細胞を用いて 1 回ずつ合計 3 回行なった。細胞を 400 nM EthD-1 (LIVE/DEAD™ Viability/Cytotoxicity Kit for mammalian cells, Thermo Fisher Scientific)で 30 分間遮光して染色し，細胞浮遊液 25  $\mu$ L を Tali™ Cellular Analysis スライド (Thermo Fisher Scientific)に注入して測定した。測定条件の sensitivity は 6，circularity は 8 で行なった。AD(Cys)も 6-OHDA

も添加していない細胞を「生細胞コントロール」とした。生細胞コントロールにおける EthD-1 の蛍光ピークから閾値を設定した。70%エタノールに 30 分間曝露した細胞を「死細胞コントロール」とした。

## 6-3. 結果

### 6-3-1. 6-OHDA による GFP- $\alpha$ -synuclein 凝集形成の観察

GFP- $\alpha$ -synuclein 安定発現細胞の細胞質に見られる斑点状の GFP 蛍光は GFP- $\alpha$ -synuclein の凝集物である。そこで、GFP- $\alpha$ -synuclein 安定発現細胞に酸化ストレスとして 6-OHDA を添加し、24 時間後の GFP- $\alpha$ -synuclein 凝集形成を共焦点レーザー走査型顕微鏡で観察した。図 6-3-1 に示すように、6-OHDA を添加していないコントロールの条件に比べ、6-OHDA を添加した細胞では、GFP- $\alpha$ -synuclein の凝集形成が多く見られた。次に、あらかじめ AD(Cys)を導入した細胞に 6-OHDA による酸化ストレスをかけた場合の GFP- $\alpha$ -synuclein 凝集形成を AD(Cys)非導入細胞と比較しながら観察することにした。

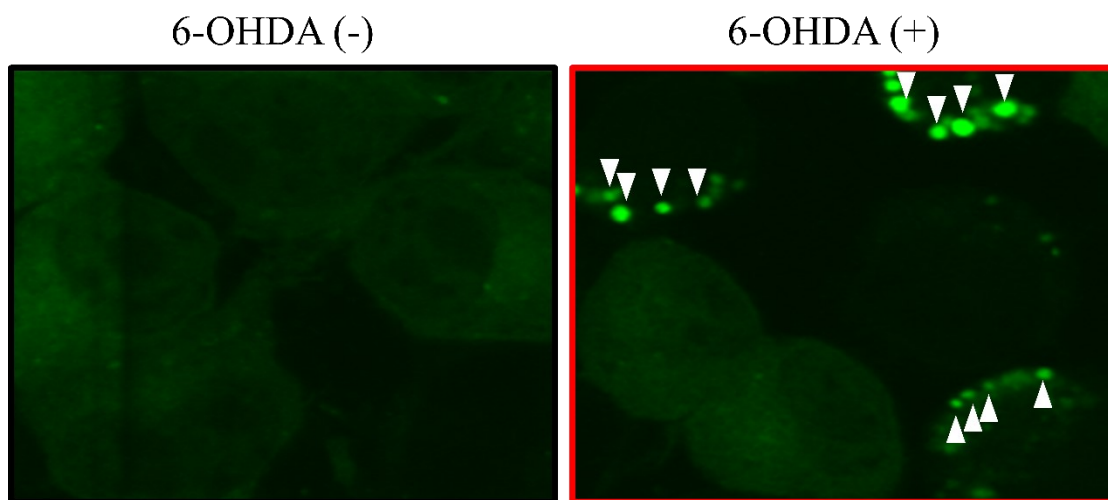
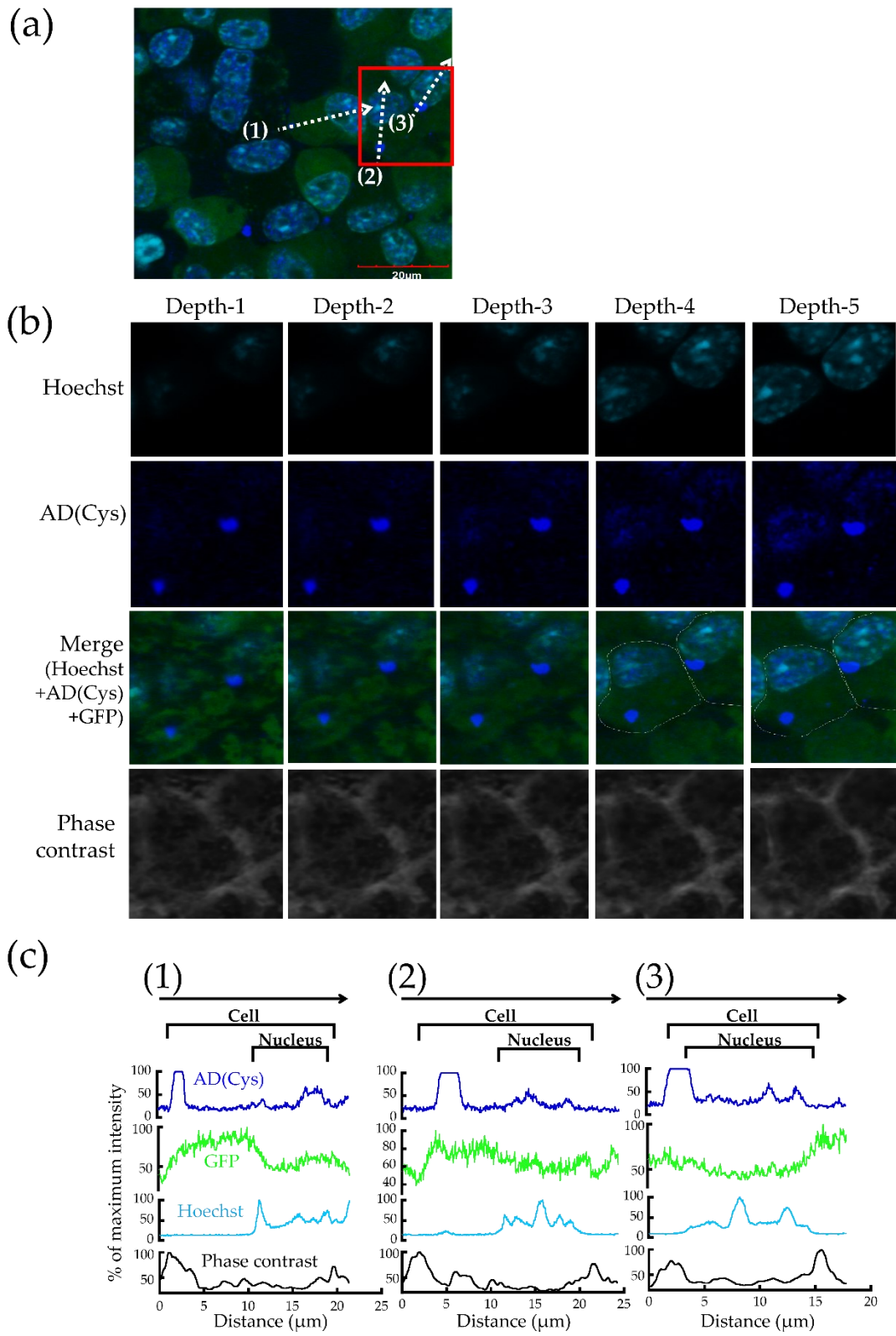


図 6-3-1. 6-OHDA による GFP- $\alpha$ -synuclein 凝集形成  
(左)コントロール, (右) 10  $\mu$ M 6-OHDA 曝露 24 時間後  
白矢じりは, 観察された凝集を指す。

### 6-3-2. AD(Cys)の細胞内導入

AD(Cys)の細胞内導入は共焦点レーザー顕微鏡で撮影した Z スタック画像 (図 6-3-2(b)) と

シグナル強度(図 6-3-2(c))で解析した。図 6-3-2(a)は、図 6-3-3(a)の AD(Cys)導入後 6-OHDA 添加した条件の AD(Cys), GFP, Hoechst の重ね合わせ画像に相当する。AD(Cys)の導入後、10  $\mu$ M 6-OHDA を添加し、24 時間インキュベートした細胞を Z スタック撮影した。図 6-3-2(a)は、Z スタック撮影した 5 枚の画像のうちの 1 枚である。Z スタック撮影とは、焦点面(z)を少しずつずらしながら連続的に同じ場所(x-y)を撮影する撮影方法である。Z スタック撮影から得た複数の画像から、細胞内部からのシグナルと細胞表面からのシグナルを比較することができる。図 6-3-2(a)の赤い四角で示した箇所を拡大し、Hoechst, AD(Cys), Merge(Hoechst + AD(Cys) + GFP), Phase contrast それぞれの Z スタック画像(Depth-1 から Depth-5)を図 6-3-2(b)に示した。まず初めに、Hoechst の Z スタック画像から細胞内部を撮影した焦点面を探ることにした。Hoechst の Depth-1 と Depth-5 を比較すると、Depth-5 の方が鮮明に核を撮影している。このことから、Depth-5 が核の高さ(厚み)の中心付近の焦点面であり、細胞の内部の焦点面とも言い換えることができる。次に、AD(Cys)の Depth-1 と Depth-5 比較すると、Depth-5 つまり細胞内部の方が AD(Cys)のシグナルが強く鮮明である。さらに Merge の Depth-4 や Depth-5 の画像から二つの強く大きな塊のシグナルが細胞質から発せられていることが示された。次に、シグナル強度を比較して、シグナル源の局在を調べることにした。図 6-3-2(c)は、図 6-3-2(a)内に白矢印で示した方向に沿ったラインの AD(Cys), GFP, Hoechst, phase contrast のシグナル強度を示した。まず、phase contrast のシグナル強度の変化と画像から細胞の範囲を決定した。次に Hoechst のシグナル強度の変化と画像から細胞核の範囲を決定した。また、GFP- $\alpha$ -synuclein は細胞質に局在することから細胞質の範囲を確認することもできる。ここで、AD(Cys)のシグナルを見ると、(1), (2), (3)の AD(Cys)の大きな塊のシグナルは 3 つとも細胞質の GFP- $\alpha$ -synuclein と共局在していることを示した。以上の事から、図 6-3-2(b), 図 6-3-2(c)によって AD(Cys)の細胞内導入を確認した。



6-3-2. AD(Cys)の細胞内導入解析

### 6-3-3. 細胞内での AD(Cys)による GFP- $\alpha$ -synuclein 凝集形成抑制効果の検証

細胞に導入した AD(Cys)が細胞内  $\alpha$ -synuclein の凝集抑制に影響を与えるかどうかを調べるために共焦点レーザー顕微鏡で観察を行なった(図 6-3-3)。AD(Cys)を導入した細胞と導入していない細胞にそれぞれ 10  $\mu$ M 6-OHDA を添加し、24 時間後に固定し、GFP- $\alpha$ -synuclein の凝集形成を観察した。AD(Cys)非導入細胞では、多くの細胞で GFP- $\alpha$ -synuclein が凝集形成した。一方で、AD(Cys)導入細胞では、少数の細胞で GFP- $\alpha$ -synuclein の凝集形成が観察された。実験は 3 回繰り返し行ない、各条件 200 以上の細胞を観察した。凝集形成した細胞の割合、つまり凝集率を計算すると、AD(Cys)非導入細胞は 6-OHDA による酸化ストレスを受け 18%であった。一方、AD(Cys)導入細胞では細胞内  $\alpha$ -synuclein の凝集率が有意に低く、7%であった。AD(Cys)がミニシャペロンとして GFP- $\alpha$ -synuclein に作用して凝集抑制に働いた可能性が示された。



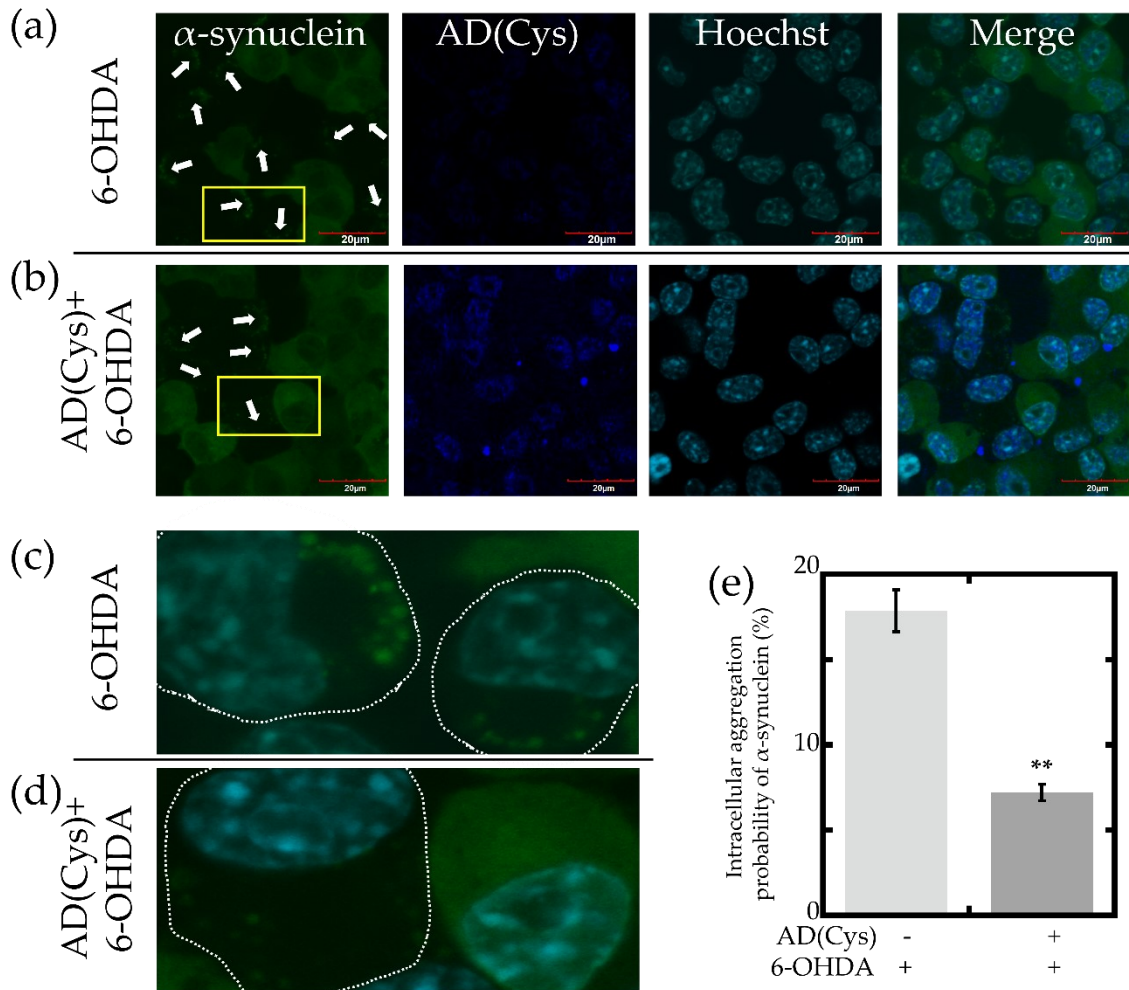


図 6-3-3. AD(Cys)による細胞内 GFP- $\alpha$ -synuclein 凝集抑制効果

(a,b) 10  $\mu$ M 6-OHDA による酸化ストレス条件下の GFP-Syn 細胞。AD(Cys)の免疫蛍光染色と Hoechst 染色を行なった。黄四角箇所の拡大画像は (c) と (d) にそれぞれ示す。白矢印は GFP-Syn の凝集形成箇所を示す。スケールバーは 20  $\mu$ m。

(c,d) (a,b) の黄四角箇所における GFP-Syn と Hoechst の重ね合わせ画像。

白点線は凝集が観察された細胞を示す。

(e) 凝集形成した GFP-Syn 細胞の割合 (凝集率)。

エラーバーは標準誤差を示す。Welch's *t*-test, \*\* $p < 0.01$

#### 6-3-4. AD(Cys)による細胞死抑制効果

AD(Cys)非導入細胞と AD(Cys)導入細胞にさまざまな濃度の 6-OHDA で酸化ストレスをかけ、細

胞死率の違いを比較した。細胞を EthD-1 で染色して Tali™ Image-Based Cytometer で測定した。

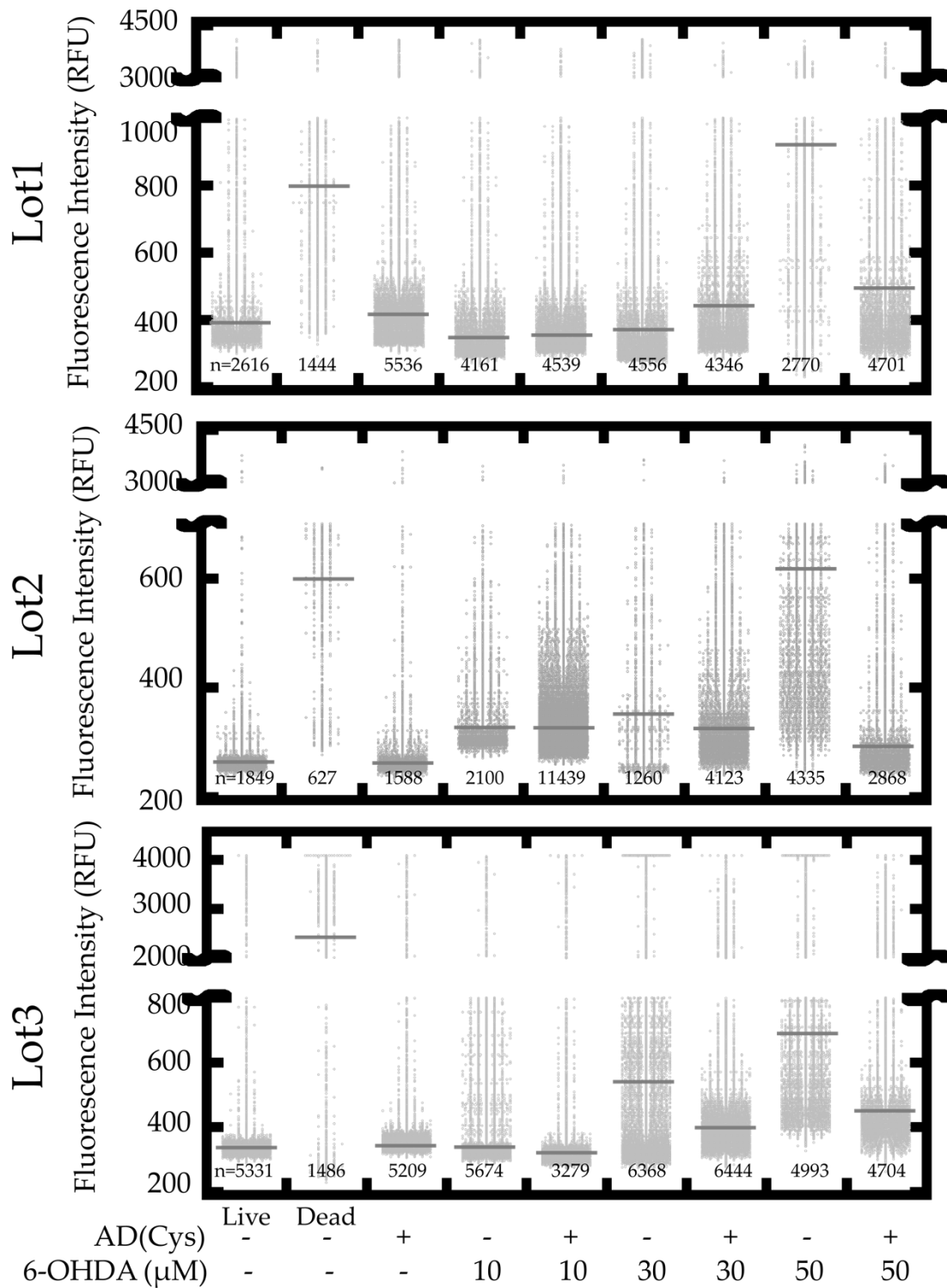


図 6-3-4-1. AD(Cys)による細胞死抑制効果

ロットの異なる細胞を用いて3回実験を行なった。

nは各条件で測定した細胞数。ドットプロットに重ねた線は中央値。

図 6-3-4-1 は、ひとつひとつの細胞の EthD-1 の蛍光シグナルをドットプロットで示した結果である。n は各条件で測定した細胞数を示す。中央値はドットプロットに重ねた線で示した。「生細胞(Live)コントロール」は AD(Cys)も 6-OHDA も添加しなかった細胞を示す。「死細胞(Dead)コントロール」は 70%エタノールに 30 分間曝露した細胞を示す。生細胞コントロールと死細胞コントロールを比較すると、死細胞コントロールは多くの細胞が高い EthD-1 蛍光シグナルを発したことがわかる。また、10  $\mu$ M, 30  $\mu$ M, 50  $\mu$ M の 6-OHDA で酸化ストレスをかけた条件下の細胞では、AD(Cys)非導入細胞で 50  $\mu$ M の 6-OHDA 添加によって多くの細胞が高い EthD-1 蛍光シグナルを発するが、対照的に AD(Cys)導入細胞では EthD-1 蛍光シグナルの上昇が抑えられている。そこで各条件の細胞死率の比較した (図 6-3-4-2)。

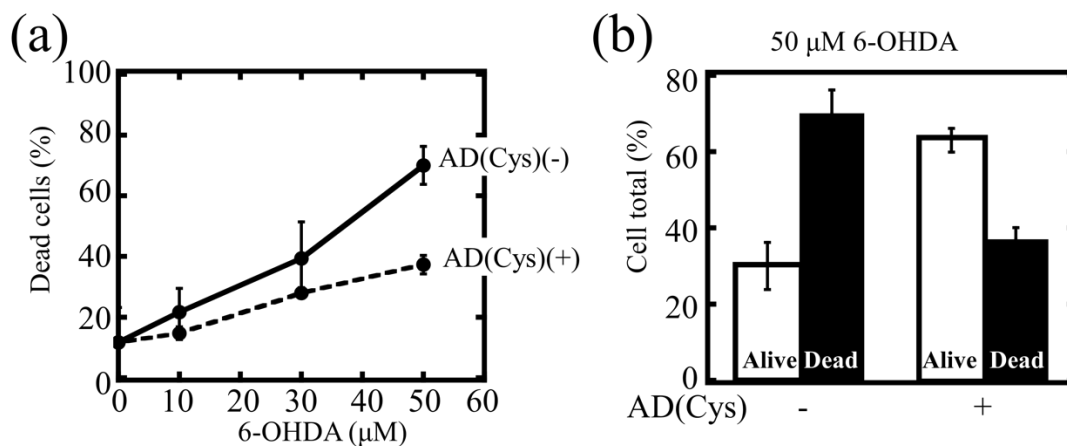


図 6-3-4-2. AD(Cys)による細胞死抑制効果

- (a) 各濃度の 6-OHDA による酸化ストレス条件下の死細胞 (EthD-1 陽性細胞) の割合。  
 (b) 50  $\mu$ M 6-OHDA による酸化ストレス条件下の生細胞と死細胞の割合。

図 6-3-4-2 (a) は 10  $\mu$ M, 30  $\mu$ M, 50  $\mu$ M の 6-OHDA を添加し、24 時間後の細胞死率を示している。異なった 3 つのロットの細胞の測定結果の平均値を示した。6-OHDA の濃度が高くなるほど細胞死率は高くなったが、AD(Cys)導入細胞では AD(Cys)非導入細胞に比べて大

幅に細胞死率を抑えた。特に 50  $\mu$ M の 6-OHDA 添加時 (図 6-3-4-1 (b)) には, AD(Cys)非導入細胞と AD(Cys)導入細胞の生存率と細胞死率の割合が逆転したことが示された。AD(Cys)導入有無によって細胞の生存率に大きな差が生まれたことが示された。

## 6-4. 考察

第六章では細胞内に AD(Cys)をタンパク質導入し,  $\alpha$ -synuclein の凝集・細胞障害性に対する抑制効果について検証した。Hsp による  $\alpha$ -synuclein の凝集・毒性抑制効果の試験を遺伝子導入法で行なった研究もある[118,119]。一方, 本研究で用いた細胞内タンパク質導入法は, 転写・翻訳の過程で生じるサイレンシングや細胞ゲノムへのランダムな挿入変異, 翻訳後修飾などの障害を回避するという利点があり, 注目されている技術である。

図 6-3-1 では, GFP- $\alpha$ -synuclein 安定発現株に酸化ストレス 6-OHDA を加え, GFP- $\alpha$ -synuclein が凝集形成する様子を観察した。6-OHDA を添加していないコントロール (図 6-3-1(左)) では, 多くの細胞が細胞質全体で均一に GFP 蛍光を放ち, GFP- $\alpha$ -synuclein が細胞質で発現していることを確認した。6-OHDA を添加すると (図 6-3-1 (右)), 細胞質で GFP 蛍光が点状に集まっている細胞が多く見られたため, これは GFP との融合タンパク質として発現している  $\alpha$ -synuclein の凝集反応を反映しているものと考えた。 $\alpha$ -synuclein の凝集は, アミロイド線維形成につながる重要な形態変化である。図 6-3-2 では, AD(Cys)の細胞内導入を共焦点レーザー顕微鏡で二通りの解析を行ない, AD(Cys)の大きな塊二つが細胞質に入っていることを示した。AD(Cys)の一部が細胞質内で大きな塊として観察された理由は, 液-液相分離による液体状の会合体 (液滴) の可能性を考えている。また, 図 6-3-2 の AD(Cys)に着目すると, 導入した AD(Cys)は細胞質だけでなく, 核にも局在している。この理由について細胞内局在予測アルゴリズム[120]を用いて調査した。その結果, 細胞質に局在する可能性 (27%) に次いで, 核局在の可能性 (25%) が示された。AD(Cys)のアミノ酸配列が核へ

の局在に寄与したことが示唆された。Velazquez ら[121] は熱ショック処理により Hsp70 が細胞質から核に移行し、環境のストレスから細胞を防護していると報告した。Tapia ら[122] は Hsp90 が細胞の栄養飢餓状態に応答して核に蓄積することを示した。一方で、図 6-3-3 で示すように、AD(Cys)は細胞質の  $\alpha$ -synuclein の凝集抑制に働いた。細胞質でミニシャペロンとして働きつつ、核に入った AD(Cys)も核で何らかの役割を果たす可能性がある。

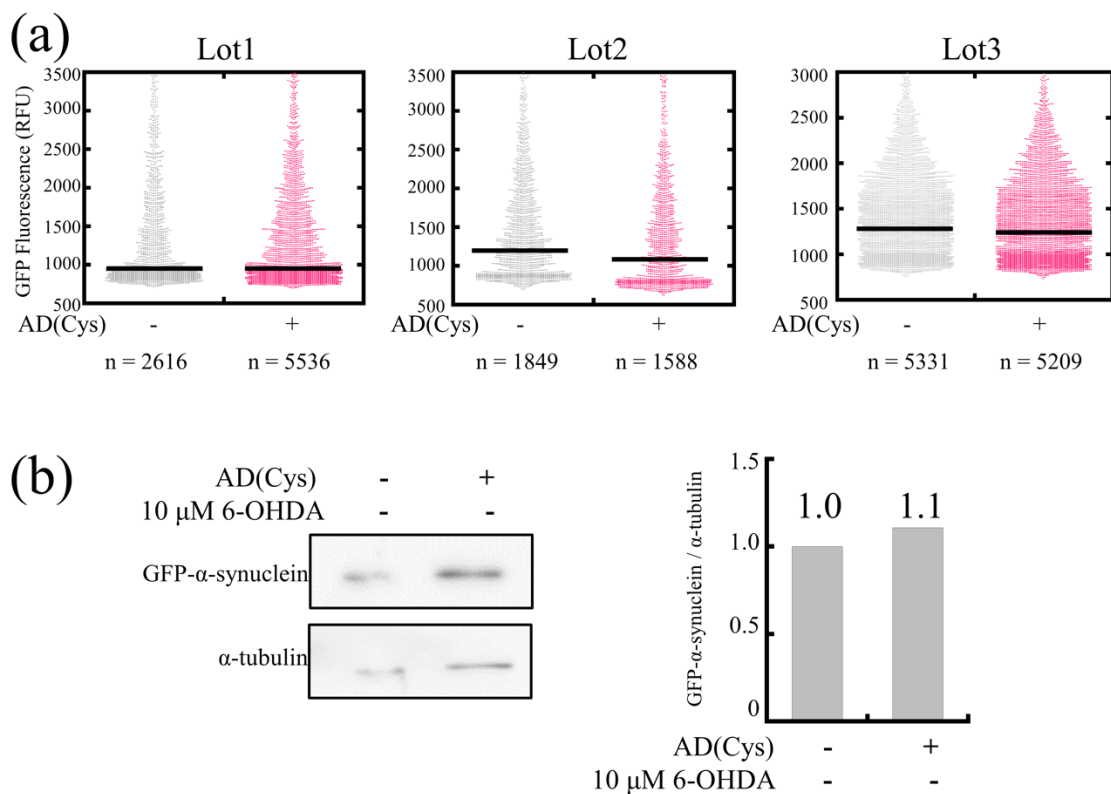


図 6-4. AD(Cys)導入有無による GFP 蛍光強度と GFP- $\alpha$ -synuclein 発現の比較  
 (a) 異なる 3 つのロットの細胞を用いた GFP 蛍光強度比較。n は測定した細胞数を示す。  
 ドットプロットに重ねた線は中央値を示す。  
 (b) 左：ウェスタンブロット法による GFP- $\alpha$ -synuclein 発現比較。  
 右：GFP- $\alpha$ -synuclein /  $\alpha$ -tubulin の相対グラフ

ここで、AD(Cys)導入が GFP- $\alpha$ -synuclein の発現に影響を与えないことが Tali™

Image-Based Cytometer による各細胞の蛍光強度測定とウェスタンブロット法によって示された (図 6-4)。図 6-4(a)は異なる3つのロットの細胞を用いた GFP 蛍光強度比較をドットプロットで示した。ドットプロットに重ねた線は中央値を示す。この結果から、AD(Cys)導入有無による GFP- $\alpha$ -synuclein の蛍光強度は変化が見られないことが示された。さらに細胞内タンパク質を抽出したウェスタンブロット法の結果 (図 6-4(b)) も AD(Cys)導入は GFP- $\alpha$ -synuclein の発現に影響を与えないことが示された。さらに図 6-3-4-1 と図 6-3-4-2 では、AD(Cys)による細胞死抑制効果を EthD-1 染色で調べた。AD(Cys)導入によって酸化ストレス条件下の細胞の生存率が改善した。図 6-3-3 の結果と併せると、細胞死につながる  $\alpha$ -synuclein の凝集形成を AD(Cys)が抑えたことが示された。

PD 関連タンパク質である DJ-1 は、 $\alpha$ -synuclein の凝集を抑制するが、 $\alpha$ -synuclein の凝集体に共局在しないことから、 $\alpha$ -synuclein の凝集形成の早期の段階に作用することが示唆されている[123]。Xu ら[124]は、DJ-1 がシャペロン介在性オートファジーパスウェイを介して  $\alpha$ -synuclein の凝集を抑制していることを示した。第五章の結果から AD(Cys)は  $\alpha$ -synuclein の凝集形成の早期の段階から共存させた場合に抑制効果を示したが、AD(Cys)がどのようなメカニズムで細胞内  $\alpha$ -synuclein の凝集抑制に働いているのかは今後の研究を期待したい。

## 第七章 総合考察

PD 発症の原因タンパク質である  $\alpha$ -synuclein の凝集・アミロイド線維化抑制効果については、これまで Hsp70[72-74]などの分子シャペロンでの報告があるが、Hsp60 については十分に議論されてこなかった。

本研究で初めてヒト Hsp60GW 変異体による  $\alpha$ -synuclein アミロイド線維化抑制効果を明確に示した。第二章、第三章では、Hsp60 GW の物性評価と  $\alpha$ -synuclein アミロイド線維化抑制効果について検証した。分子シャペロン Hsp60 グループの AD は、疎水性相互作用で相手タンパク質と結合することが知られている。AD は ATP の存在などによって変化する「開閉式」で、「閉じた」構造から AD の配向が変わり「開いた」構造になることで、表面に露出する疎水性領域が広がり、相手タンパク質を捉える力が増強する。大腸菌 Hsp60 である GroEL を用いた先行研究の成果を踏まえ、本研究ではヒト Hsp60 の AD 配向をタンパク質工学的手法で変化させた。AD を上方に押し上げ「開いた」構造にした Hsp60 GW は、Hsp60 WT に比べ表面疎水性が高いため (図 2-3-3)、 $\alpha$ -synuclein のアミロイド線維化を強力に抑制したと考えられる。Hsp60 GW は、 $\alpha$ -synuclein モノマーとの結合が Hsp60 WT に比べ強力であることが解離定数測定で示され、低濃度でアミロイド線維化抑制効果を持つことが明らかとなった。相手タンパク質をとらえ、その凝集・アミロイド線維化を抑える重要な役割を AD が担うことが示された。しかし、本研究では細胞への応用を視野に入れており、Hsp60 は巨大な 14 量体を形成していることから、細胞外から細胞内に導入するには、その大きさが課題であった。そこで、AD を単離することにした。

第四章、第五章では AD の単離とその安定化、さらに AD(Cys) による  $\alpha$ -synuclein アミロイド線維化抑制効果について評価した。単離した GroELAD はコシャペロニン GroES や ATP 非存在下で相手タンパク質のフォールディングを手助けする「ミニシャペロン」として働くことが知られている。Jain らは、GroEL AD が凝集傾向タンパク質 Maltodextrin-glucosidase と緩やかに結合・解離を繰り返しながら機能的中間体を介してリフォールディング

グさせることを示した[125]。本研究では Hsp60 AD のミニシャペロンとしての機能を調べるために、単離した。しかし、凍結乾燥後サンプルの溶解性の低さや温度依存的二次構造の変化から単離 Hsp60 AD は構造不安定であると判断した。そこで、単離 Hsp60 AD 立体構造の N 末端と C 末端が近いことに着目し、両方にシステイン残基を導入することでジスルフィド結合形成による構造安定化を試みた。システイン残基導入によるタンパク質の安定化は、1987 年に Pantoliano ら[126]によって報告されたタンパク質工学的手法の一つである。システイン残基導入後(AD(Cys))は、溶解性・二次構造から安定化したことが確認できた。AD(Cys)と  $\alpha$ -synuclein の解離定数測定や Thioflavin T 蛍光測定の結果から、14 量体 Hsp60 より  $\alpha$ -synuclein との相互作用は弱いものの、アミロイド線維化を抑制することが示された。次に、細胞内でも AD(Cys)はミニシャペロンとして働くか調べることにした。

第六章では細胞内に導入した AD(Cys) による  $\alpha$ -synuclein 凝集・細胞障害性抑制効果を調査した。細胞にあらかじめ AD(Cys)タンパク質を導入しておくこと、酸化ストレス下で形成される  $\alpha$ -synuclein の凝集とそれに伴う細胞死を抑制することが本研究で示された。Hsp の細胞内導入による細胞防御の効果について様々な報告がある。細胞浸透ペプチドを用いて Hsp を導入すると、細胞の受けるストレスが軽減される[73,127-129]。Sontag ら[76] は、グループ II 型の細胞質シャペロニン CCT1 の単離 AD が細胞に入り、Huntingtin の凝集を減らすことを示した。さらに、Hsp 導入による動物実験も進められている。SOD1 タンパク質の構造異常が原因として知られる筋萎縮性側索硬化症のモデルマウスに Hsp70 を腹腔注射すると、マウスの寿命が延び、病状進行が遅延したことが報告されている[130]。また、アルツハイマー病モデルマウスに Hsp70 を鼻腔注入すると脳内の A $\beta$  蓄積が抑制され、記憶の維持につながった[131]。これらの研究では、マウスの腹腔内や鼻腔に Hsp70 溶液をそのまま投与し、効果が得られた。将来 AD(Cys)を動物実験に適用する際にもそのまま溶液を投与するか、もしくはドラッグデリバリーシステムを利用して、より効率よく作用させるなどの応用も考えられる。本研究で作製した AD(Cys)は 14 量体 Hsp60 に比べ小型なため、細胞導入



の困難さを解決し、動物実験など今後の展開が期待できる。図7にヒトシャペロン変異体やそのADによる $\alpha$ -synucleinのアミロイド線維凝集抑制効果について分かりやすくまとめた。

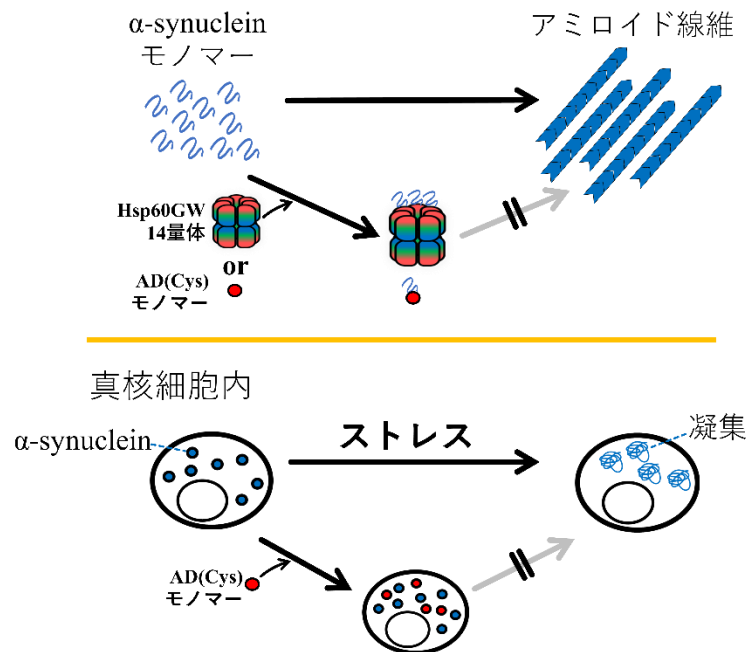


図 7. Hsp60 GW と AD(Cys)による $\alpha$ -synuclein凝集・アミロイド線維化抑制モデル

AD(Cys)が細胞内でミニシャペロンとして機能することを示した本研究の成果は、AD(Cys)がアミロイド関連疾患の薬剤として応用できる可能性を示した。今後はこの結果をさらに動物を用いた研究で実証できれば、将来的にはヒトに対するバイオ創薬に発展することも考えられ、これからの展開を大いに期待したい。患者にとって治療法の選択肢が多いことは有益であり、従来の治療法に併せてAD(Cys)が新たなバイオ医薬品となれば、これまで難しいとされてきたPDやレビー小体型認知症の発症予防や根治への可能性に貢献できるのではないだろうか。

## 謝辞

本研究を進めるにあたり，終始ご指導いただきました河田康志教授，溝端知宏教授，本郷邦  
広助教に心より感謝いたします。また，福井直也研究員をはじめ，蛋白質工学研究室の皆様  
に重ねて御礼申し上げます。最後に，大学院への入学に理解を示し，支え続けてくれた家族  
に感謝いたします。

## 引用文献

1. Klaiaps, C.L.; Jayaraj, G.G.; Hartl, F.U. Pathways of cellular proteostasis in aging and disease. *Journal of Cell Biology* **2018**, *217*, 51-63, doi:10.1083/jcb.201709072.
2. Yamamoto, H.; Kawata, Y. 神経変性疾患に関わるタンパク質の凝集と分子シャペロンの効果. *化学と生物* 2019.
3. Laskey, R.A.; Honda, B.M.; Mills, A.D.; Finch, J.T. Nucleosomes are assembled by an acidic protein which binds histones and transfers them to DNA. *Nature* **1978**, *275*, 416-420, doi:10.1038/275416a0.
4. Ellis, J. Proteins as molecular chaperones. *Nature* **1987**, *328*, 378-379, doi:10.1038/328378a0.
5. Ritossa, F. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in drosophila. *Experientia* **1962**, *18*, pages 571-573.
6. Pato, M.; Banerjee, M.; Desmet, L.; Toussaint, A. Involvement of heat-shock proteins in bacteriophage Mu development. *Journal of Bacteriology* **1987**, *169*, 5504-5509, doi:10.1128/jb.169.12.5504-5509.1987.
7. Barraclough, R.; Ellis, R.J. Protein-synthesis in chloroplasts.9. Assembly of newly-synthesized large subunits into ribulose biphosphate carboxylase in isolated intact pea-chloroplasts. *Biochimica Et Biophysica Acta* **1980**, *608*, 19-31, doi:10.1016/0005-2787(80)90129-x.
8. Musgrove, J.E.; Johnson, R.A.; Ellis, R.J. Dissociation of the ribulosebiphosphate-carboxylase large-subunit binding-protein into dissimilar subunits. *European Journal of Biochemistry* **1987**, *163*, 529-534, doi:10.1111/j.1432-1033.1987.tb10900.x.
9. Hemmingsen, S.M.; Woolford, C.; Vandervies, S.M.; Tilly, K.; Dennis, D.T.; Georgopoulos, C.P.; Hendrix, R.W.; Ellis, R.J. Homologous plant and bacterial proteins chaperone oligomeric protein assembly. *Nature* **1988**, *333*, 330-334, doi:10.1038/333330a0.
10. McMullin, T.W.; Hallberg, R.L. A highly evolutionarily conserved mitochondrial protein is structurally related to the protein encoded by the *Escherichia-coli* GroEL gene. *Molecular and Cellular Biology* **1988**, *8*, 371-380, doi:10.1128/mcb.8.1.371.
11. Endo, T.; Mori, K.; Taguchi, H. バイオ研究マスターシリーズ/タンパク質の一生集中マスター/細胞における成熟・輸送・品質管理, 株式会社 羊土社: 2007; pp. 51.
12. Nagata, K.; Mori, M.; Yoshida, M. 分子シャペロンによる細胞機能制御, シュプリンガー・フェアラーク東京株式会社: 2001,第3刷 2002; pp. 10.
13. Goloubinoff, P.; Christeller, J.T.; Gatenby, A.A.; Lorimer, G.H. Reconstitution of active dimeric ribulose biphosphate carboxylase from an unfolded state depends on 2 chaperonin proteins and Mg-ATP. *Nature* **1989**, *342*, 884-889, doi:10.1038/342884a0.
14. Xu, Z.H.; Horwich, A.L.; Sigler, P.B. The crystal structure of the asymmetric GroEL-GroES-(ADP)(7) chaperonin complex. *Nature* **1997**, *388*, 741-750, doi:10.1038/41944.

15. Rye, H.S.; Roseman, A.M.; Chen, S.X.; Furtak, K.; Fenton, W.A.; Saibil, H.R.; Horwich, A.L. GroEL-GroES cycling: ATP and nonnative polypeptide direct alternation of folding-active rings. *Cell* **1999**, *97*, 325-338, doi:10.1016/s0092-8674(00)80742-4.
16. Roseman, A.M.; Chen, S.X.; White, H.; Braig, K.; Saibil, H.R. The chaperonin ATPase cycle: Mechanism of allosteric switching and movements of substrate-binding domains in GroEL. *Cell* **1996**, *87*, 241-251, doi:10.1016/s0092-8674(00)81342-2.
17. Machida, K.; Fujiwara, R.; Tanaka, T.; Sakane, I.; Hongo, K.; Mizobata, T.; Kawata, Y. Gly192 at hinge 2 site in the chaperonin GroEL plays a pivotal role in the dynamic apical domain movement that leads to GroES binding and efficient encapsulation of substrate proteins. *Biochim. Biophys. Acta, Proteins Proteomics* **2009**, *1794*, 1344-1354, doi:10.1016/j.bbapap.2008.12.003.
18. Fukui, N.; Araki, K.; Hongo, K.; Mizobata, T.; Kawata, Y. Modulating the Effects of the Bacterial Chaperonin GroEL on Fibrillogenic Polypeptides through Modification of Domain Hinge Architecture. *J. Biol. Chem.* **2016**, *291*, 25217-25226, doi:10.1074/jbc.M116.751925.
19. Nisemblat, S.; Yaniv, O.; Parnas, A.; Frolow, F.; Azem, A. Crystal structure of the human mitochondrial chaperonin symmetrical football complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2015**, *112*, 6044-6049, doi:10.1073/pnas.1411718112.
20. Braig, K.; Otwinowski, Z.; Hegde, R.; Boisvert, D.C.; Joachimiak, A.; Horwich, A.L.; Sigler, P.B. The crystal-structure of the bacterial chaperonin GroEL at 2.8-Angstrom. *Nature* **1994**, *371*, 578-586, doi:10.1038/371578a0.
21. Uhlen, M.; Fagerberg, L.; Hallstrom, B.M.; Lindskog, C.; Oksvold, P.; Mardinoglu, A.; Sivertsson, A.; Kampf, C.; Sjostedt, E.; Asplund, A., et al. Tissue-based map of the human proteome. *Science* **2015**, *347*, doi:10.1126/science.1260419.
22. Uhlen, M.; Oksvold, P.; Fagerberg, L.; Lundberg, E.; Jonasson, K.; Forsberg, M.; Zwahlen, M.; Kampf, C.; Wester, K.; Hober, S., et al. Towards a knowledge-based Human Protein Atlas. *Nature Biotechnology* **2010**, *28*, 1248-1250, doi:10.1038/nbt1210-1248.
23. Singh, B.; Patel, H.V.; Ridley, R.G.; Freeman, K.B.; Gupta, R.S. Mitochondrial import of the human chaperonin (Hsp60) protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1990**, *169*, 391-396, doi:10.1016/0006-291x(90)90344-m.
24. Ghosh, J.C.; Dohi, T.; Kang, B.H.; Altieri, D.C. Hsp60 regulation of tumor cell apoptosis. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 5188-5194, doi:10.1074/jbc.M705904200.
25. Soltys, B.J.; Gupta, R.S. Cell surface localization of the 60 kDa heat shock chaperonin protein (hsp60) in mammalian cells. *Cell Biology International* **1997**, *21*, 315-320, doi:10.1006/cbir.1997.0144.
26. Atay, S.; Gercel-Taylor, C.; Kesimer, M.; Taylor, D.D. Morphologic and proteomic

- characterization of exosomes released by cultured extravillous trophoblast cells. *Experimental Cell Research* **2011**, *317*, 1192-1202, doi:10.1016/j.yexcr.2011.01.014.
27. Kim, S.C.; Stice, J.P.; Chen, L.; Jung, J.S.; Gupta, S.; Wang, Y.; Baumgarten, G.; Trial, J.; Knowlton, A.A. Extracellular Heat Shock Protein 60, Cardiac Myocytes, and Apoptosis. *Circulation Research* **2009**, *105*, 1186-+, doi:10.1161/circresaha.109.209643.
  28. Leitner, A.; Joachimiak, L.A.; Bracher, A.; Monkemeyer, L.; Walzthoeni, T.; Chen, B.; Pechmann, S.; Holmes, S.; Cong, Y.; Ma, B.X., et al. The Molecular Architecture of the Eukaryotic Chaperonin TRiC/CCT. *Structure* **2012**, *20*, 814-825, doi:10.1016/j.str.2012.03.007.
  29. Ross, C.A.; Poirier, M.A. Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nat. Med.* **2004**, *10*, S10-S17, doi:10.1038/nm1066.
  30. Selkoe, D.J. Folding proteins in fatal ways. *Nature* **2003**, *426*, 900-904, doi:10.1038/nature02264.
  31. Virchow, R. Über eine in Gehirn und Rückenmark des Menschen aufgefundene Substanz mit der chemischen Reaction der Cellulose. *Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medicin* **1854**, *6*, 135-138.
  32. Cohen, S.A.; Calkins, E. Electron Microscopic Observations on a Fibrous Component in Amyloid of Diverse Origins. *nature* **1959**, *183*, 1202-1203.
  33. Biancalana, M.; Koide, S. Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils. *Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics* **2010**, *1804*, 1405-1412, doi:10.1016/j.bbapap.2010.04.001.
  34. Arosio, P.; Knowles, T.P.J.; Linse, S. On the lag phase in amyloid fibril formation. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2015**, *17*, 7606-7618, doi:10.1039/c4cp05563b.
  35. Blackley, H.K.L.; Sanders, G.H.W.; Davies, M.C.; Roberts, C.J.; Tendler, S.J.B.; Wilkinson, M.J. In-situ atomic force microscopy study of beta-amyloid fibrillization. *Journal of Molecular Biology* **2000**, *298*, 833-840, doi:10.1006/jmbi.2000.3711.
  36. DePace, A.H.; Weissman, J.S. Origins and kinetic consequences of diversity in Sup35 yeast prion fibers. *Nature Structural Biology* **2002**, *9*, 389-396, doi:10.1038/nsb786.
  37. Ban, T.; Hamada, D.; Hasegawa, K.; Naiki, H.; Goto, Y. Direct observation of amyloid fibril growth monitored by thioflavin T fluorescence. *Journal of Biological Chemistry* **2003**, *278*, 16462-16465, doi:10.1074/jbc.C300049200.
  38. Inoue, Y.; Kishimoto, A.; Hirao, J.; Yoshida, M.; Taguchi, H. Strong growth polarity of yeast prion fiber revealed by single fiber imaging. *Journal of Biological Chemistry* **2001**, *276*, 35227-35230, doi:10.1074/jbc.C100304200.
  39. Okumura, H.; Itoh, S.G. Structural and fluctuational difference between two ends of A beta amyloid fibril: MD simulations predict only one end has open conformations. *Scientific Reports* **2016**, *6*, doi:10.1038/srep38422.

40. Forno, L.S. Neuropathology of Parkinson's disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **1996**, *55*, 259-272, doi:10.1097/00005072-199603000-00001.
41. Wakabayashi, K.; Yoshimoto, M.; Tsuji, S.; Takahashi, H. alpha-synuclein immunoreactivity in glial cytoplasmic inclusions in multiple system atrophy. *Neuroscience Letters* **1998**, *249*, 180-182, doi:10.1016/s0304-3940(98)00407-8.
42. Jao, C.C.; Hegde, B.G.; Chen, J.; Haworth, I.S.; Langen, R. Structure of membrane-bound alpha-synuclein from site-directed spin labeling and computational refinement. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2008**, *105*, 19666-19671, doi:10.1073/pnas.0807826105.
43. Fauvet, B.; Mbefo, M.K.; Fares, M.B.; Desobry, C.; Michael, S.; Ardah, M.T.; Tsika, E.; Coune, P.; Prudent, M.; Lion, N., et al. alpha-Synuclein in Central Nervous System and from Erythrocytes, Mammalian Cells, and Escherichia coli Exists Predominantly as Disordered Monomer. *Journal of Biological Chemistry* **2012**, *287*, 15345-15364, doi:10.1074/jbc.M111.318949.
44. Araki, K.; Yagi, N.; Nakatani, R.; Sekiguchi, H.; So, M.; Yagi, H.; Ohta, N.; Nagai, Y.; Goto, Y.; Mochizuki, H. A small-angle X-ray scattering study of alpha-synuclein from human red blood cells. *Scientific Reports* **2016**, *6*, doi:10.1038/srep30473.
45. Bridi, J.C.; Hirth, F. Mechanisms of alpha-Synuclein Induced Synaptopathy in Parkinson's Disease. *Frontiers in Neuroscience* **2018**, *12*, 18, doi:10.3389/fnins.2018.00080.
46. Bartels, T.; Choi, J.G.; Selkoe, D.J. alpha-Synuclein occurs physiologically as a helically folded tetramer that resists aggregation. *Nature* **2011**, *477*, 107-U123, doi:10.1038/nature10324.
47. Dettmer, U.; Newman, A.J.; Luth, E.S.; Bartels, T.; Selkoe, D. In Vivo Cross-linking Reveals Principally Oligomeric Forms of alpha-Synuclein and beta-Synuclein in Neurons and Non-neural Cells. *Journal of Biological Chemistry* **2013**, *288*, 6371-6385, doi:10.1074/jbc.M112.403311.
48. Nuber, S.; Rajsombath, M.; Minakaki, G.; Winkler, J.; Muller, C.P.; Ericsson, M.; Caldarone, B.; Dettmer, U.; Selkoe, D.J. Abrogating Native alpha-Synuclein Tetramers in Mice Causes a L-DOPA-Responsive Motor Syndrome Closely Resembling Parkinson's Disease. *Neuron* **2018**, *100*, 75+, doi:10.1016/j.neuron.2018.09.014.
49. Goers, J.; Manning-Bog, A.B.; McCormack, A.L.; Millett, I.S.; Doniach, S.; Di Monte, D.A.; Uversky, V.N.; Fink, A.L. Nuclear localization of alpha-synuclein and its interaction with histones. *Biochemistry* **2003**, *42*, 8465-8471, doi:10.1021/bi0341152.
50. Khalaf, O.; Fauvet, B.; Oueslati, A.; Dikiy, I.; Mahul-Mellier, A.L.; Ruggeri, F.S.; Mbefo, M.K.; Vercruyse, F.; Dietler, G.; Lee, S.J., et al. The H50Q Mutation Enhances alpha-Synuclein Aggregation, Secretion, and Toxicity. *Journal of Biological Chemistry* **2014**, *289*, 21856-21876, doi:10.1074/jbc.M114.553297.

51. Zhang, L.; Zhang, C.Y.; Zhu, Y.Y.; Cai, Q.; Chan, P.; Ueda, K.; Yu, S.; Yang, H. Semi-quantitative analysis of alpha-synuclein in subcellular pools of rat brain neurons: An immunogold electron microscopic study using a C-terminal specific monoclonal antibody. *Brain Research* **2008**, *1244*, 40-52, doi:10.1016/j.brainres.2008.08.067.
52. Devi, L.; Raghavendran, V.; Prabhu, B.M.; Avadhani, N.G.; Anandatheerthavarada, H.K. Mitochondrial import and accumulation of alpha-synuclein impair complex I in human dopaminergic neuronal cultures and Parkinson disease brain. *Journal of Biological Chemistry* **2008**, *283*, 9089-9100, doi:10.1074/jbc.M710012200.
53. Jones, D.R.; Moussaud, S.; McLean, P. Targeting heat shock proteins to modulate alpha-synuclein toxicity. *Therapeutic Advances in Neurological Disorders* **2014**, *7*, 33-51, doi:10.1177/1756285613493469.
54. Fujiwara, H.; Hasegawa, M.; Dohmae, N.; Kawashima, A.; Masliah, E.; Goldberg, M.S.; Shen, J.; Takio, K.; Iwatsubo, T. alpha-Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions. *Nature Cell Biology* **2002**, *4*, 160-164, doi:10.1038/ncb748.
55. Izawa, Y.; Tateno, H.; Kameda, H.; Hirakawa, K.; Hato, K.; Yagi, H.; Hongo, K.; Mizobata, T.; Kawata, Y. Role of C-terminal negative charges and tyrosine residues in fibril formation of alpha-synuclein. *Brain and Behavior* **2012**, *2*, 595-605, doi:10.1002/brb3.86.
56. Braak, H.; Del Tredici, K.; Rub, U.; de Vos, R.A.I.; Steur, E.; Braak, E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiology of Aging* **2003**, *24*, 197-211, doi:10.1016/s0197-4580(02)00065-9.
57. Hawkes, C.H.; Del Tredici, K.; Braak, H. Parkinson's disease: a dual-hit hypothesis. *Neuropathology and Applied Neurobiology* **2007**, *33*, 599-614, doi:10.1111/j.1365-2990.2007.00874.x.
58. Brundin, P.; Li, J.Y.; Holton, J.L.; Lindvall, O.; Revesz, T. Research in motion: the enigma of Parkinson's disease pathology spread. *Nature Reviews Neuroscience* **2008**, *9*, 741-745, doi:10.1038/nrn2477.
59. McLean, P.J.; Kawamata, H.; Shariff, S.; Hewett, J.; Sharma, N.; Ueda, K.; Breakefield, X.O.; Hyman, B.T. TorsinA and heat shock proteins act as molecular chaperones: suppression of alpha-synuclein aggregation. *Journal of Neurochemistry* **2002**, *83*, 846-854, doi:10.1046/j.1471-4159.2002.01190.x.
60. Auluck, P.K.; Chan, H.Y.E.; Trojanowski, J.Q.; Lee, V.M.Y.; Bonini, N.M. Chaperone suppression of alpha-synuclein toxicity in a Drosophila model for Parkinson's disease. *Science* **2002**, *295*, 865-868, doi:10.1126/science.1067389.
61. Parkinson, J. An essay on the shaking palsy (Reprinted). *Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences* **2002**, *14*, 223-236, doi:10.1176/appi.neuropsych.14.2.223.
62. Goetz, C.G. The History of Parkinson's Disease: Early Clinical Descriptions and Neurological

- Therapies. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* **2011**, *1*, doi:10.1101/cshperspect.a008862.
63. Uehara, T.; Choong, C.J.; Nakamori, M.; Hayakawa, H.; Nishiyama, K.; Kasahara, Y.; Baba, K.; Nagata, T.; Yokota, T.; Tsuda, H., et al. Amido-bridged nucleic acid (AmNA)-modified antisense oligonucleotides targeting alpha-synuclein as a novel therapy for Parkinson's disease. *Scientific Reports* **2019**, *9*, doi:10.1038/s41598-019-43772-9.
  64. Benskey, M.J.; Sellnow, R.C.; Sandoval, I.M.; Sortwell, C.E.; Lipton, J.W.; Manfredsson, F.P. Silencing Alpha Synuclein in Mature Nigral Neurons Results in Rapid Neuroinflammation and Subsequent Toxicity. *Frontiers in Molecular Neuroscience* **2018**, *11*, doi:10.3389/fnmol.2018.00036.
  65. Zharikov, A.D.; Cannon, J.R.; Tapias, V.; Bai, Q.; Horowitz, M.P.; Shah, V.; El Ayadi, A.; Hastings, T.G.; Greenamyre, J.T.; Burton, E.A. shRNA targeting alpha-synuclein prevents neurodegeneration in a Parkinson's disease model. *Journal of Clinical Investigation* **2015**, *125*, 2721-2735, doi:10.1172/jci64502.
  66. Mori, A.; Hatano, T.; Inoshita, T.; Shiba-Fukushima, K.; Koinuma, T.; Meng, H.; Kubo, S.; Spratt, S.; Cui, C.X.; Yamashita, C., et al. Parkinson's disease-associated iPLA2-VIA/PLA2G6 regulates neuronal functions and alpha-synuclein stability through membrane remodeling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2019**, *116*, 20689-20699, doi:10.1073/pnas.1902958116.
  67. Wirdefeldt, K.; Adami, H.O.; Cole, P.; Trichopoulos, D.; Mandel, J. Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence. *European Journal of Epidemiology* **2011**, *26*, S1-S58, doi:10.1007/s10654-011-9581-6.
  68. Kundel, F.; De, S.; Flagmeier, P.; Horrocks, M.H.; Kjaergaard, M.; Shamma, S.L.; Jackson, S.E.; Dobson, C.M.; Klenerman, D. Hsp70 Inhibits the Nucleation and Elongation of Tau and Sequesters Tau Aggregates with High Affinity. *Acs Chemical Biology* **2018**, *13*, 636-646, doi:10.1021/acscchembio.7b01039.
  69. Taguchi, Y.V.; Gorenberg, E.L.; Nagy, M.; Thrasher, D.; Fenton, W.A.; Volpicelli-Daley, L.; Horwich, A.L.; Chandra, S.S. Hsp110 mitigates alpha-synuclein pathology in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2019**, *116*, 24310-24316, doi:10.1073/pnas.1903268116.
  70. Gorbatyuk, M.S.; Shabashvili, A.; Chen, W.J.; Meyers, C.; Sullivan, L.F.; Salganik, M.; Lin, J.H.; Lewin, A.S.; Muzyczka, N.; Gorbatyuk, O.S. Glucose Regulated Protein 78 Diminishes alpha-Synuclein Neurotoxicity in a Rat Model of Parkinson Disease. *Molecular Therapy* **2012**, *20*, 1327-1337, doi:10.1038/mt.2012.28.
  71. Cox, D.; Whiten, D.R.; Brown, J.W.P.; Horrocks, M.H.; San Gil, R.; Dobson, C.M.; Klenerman, D.; van Oijen, A.M.; Ecroyd, H. The small heat shock protein Hsp27 binds alpha-synuclein



- fibrils, preventing elongation and cytotoxicity. *J. Biol. Chem.* **2018**, *293*, 4486-4497, doi:10.1074/jbc.M117.813865.
72. Ekimova, I.V.; Plaksina, D.V.; Pastukhov, Y.F.; Lapshina, K.V.; Lazarev, V.F.; Mikhaylova, E.R.; Polonik, S.G.; Pani, B.; Margulis, B.A.; Guzhova, I.V., et al. New HSF1 inducer as a therapeutic agent in a rodent model of Parkinson's disease. *Experimental Neurology* **2018**, *306*, 199-208, doi:10.1016/j.expneurol.2018.04.012.
  73. Nagel, F.; Falkenburger, B.H.; Tonges, L.; Kowsky, S.; Poppelmeyer, C.; Schulz, J.B.; Bahr, M.; Dietz, G.P.H. Tat-Hsp70 protects dopaminergic neurons in midbrain cultures and in the substantia nigra in models of Parkinson's disease. *J. Neurochem.* **2008**, *105*, 853-864, doi:10.1111/j.1471-4159.2007.05204.x.
  74. Tunesi, M.; Raimondi, I.; Russo, T.; Colombo, L.; Micotti, E.; Brandi, E.; Cappelletti, P.; Cigada, A.; Negro, A.; Ambrosio, L., et al. Hydrogel-based delivery of Tat-fused protein Hsp70 protects dopaminergic cells in vitro and in a mouse model of Parkinson's disease. *Npg Asia Materials* **2019**, *11*, 15, doi:10.1038/s41427-019-0128-8.
  75. Sot, B.; Rubio-Munoz, A.; Leal-Quintero, A.; Martinez-Sabando, J.; Marcilla, M.; Roodveldt, C.; Valpuesta, J.M. The chaperonin CCT inhibits assembly of alpha-synuclein amyloid fibrils by a specific, conformation-dependent interaction. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, doi:10.1038/srep40859.
  76. Sontag, E.M.; Joachimiak, L.A.; Tan, Z.Q.; Tomlinson, A.; Housman, D.E.; Glabe, C.G.; Potkin, S.G.; Frydman, J.; Thompson, L.M. Exogenous delivery of chaperonin subunit fragment ApiCCT1 modulates mutant Huntingtin cellular phenotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2013**, *110*, 3077-3082, doi:10.1073/pnas.1222663110.
  77. Ojha, B.; Fukui, N.; Hongo, K.; Mizobata, T.; Kawata, Y. Suppression of amyloid fibrils using the GroEL apical domain. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, doi:10.1038/srep31041.
  78. Jin, J.H.; Li, G.J.; Davis, J.; Zhu, D.; Wang, Y.; Pan, C.; Zhang, J. Identification of novel proteins associated with both alpha-synuclein and DJ-1. *Molecular & Cellular Proteomics* **2007**, *6*, 845-859, doi:10.1074/mcp.M600182-MCP200.
  79. Rakovic, A.; Grunewald, A.; Voges, L.; Hofmann, S.; Orolicki, S.; Lohmann, K.; Klein, C. PINK1-Interacting Proteins: Proteomic Analysis of Overexpressed PINK1. *Parkinsons Disease* **2011**, doi:10.4061/2011/153979.
  80. Davison, E.J.; Pennington, K.; Hung, C.C.; Peng, J.H.; Rafiq, R.; Ostareck-Lederer, A.; Ostareck, D.H.; Ardley, H.C.; Banks, R.E.; Robinson, P.A. Proteomic analysis of increased Parkin expression and its interactants provides evidence for a role in modulation of mitochondrial function. *Proteomics* **2009**, *9*, 4284-4297, doi:10.1002/pmic.200900126.
  81. Kawamoto, Y.; Akiguchi, I.; Nakamura, S.; Honjyo, Y.; Shibasaki, H.; Budka, H. 14-3-3 proteins in Lewy bodies in Parkinson disease and diffuse Lewy body disease brains. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* **2002**, *61*, 245-253, doi:10.1093/jnen/61.3.245.

82. Periquet, M.; Corti, O.; Jacquier, S.; Brice, A. Proteomic analysis of parkin knockout mice: alterations in energy metabolism, protein handling and synaptic function. *Journal of Neurochemistry* **2005**, *95*, 1259-1276, doi:10.1111/j.1471-4159.2005.03442.x.
83. Satoh, J.; Onoue, H.; Arima, K.; Yamamura, T. The 14-3-3 protein forms a molecular complex with heat shock protein Hsp60 and cellular prion protein. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* **2005**, *64*, 858-868, doi:10.1097/01.jnen.0000182979.56612.08.
84. Monti, C.; Bondi, H.; Urbani, A.; Fasano, M.; Alberio, T. Systems biology analysis of the proteomic alterations induced by MPP+, a Parkinson's disease-related mitochondrial toxin. *Frontiers in Cellular Neuroscience* **2015**, *9*, 11, doi:10.3389/fncel.2015.00014.
85. Zhao, C.; Li, H.; Zhao, X.J.; Liu, Z.X.; Zhou, P.; Liu, Y.; Feng, M.J. Heat shock protein 60 affects behavioral improvement in a rat model of Parkinson's disease grafted with human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived dopaminergic-like neurons. *Neurochemical Research* **2016**, *41*, 1238-1249, doi:10.1007/s11064-015-1816-6.
86. Mangione, M.R.; Vilasi, S.; Marino, C.; Librizzi, F.; Canale, C.; Spigolon, D.; Bucchieri, F.; Fucarino, A.; Passantino, R.; Cappello, F., et al. Hsp60, amateur chaperone in amyloid-beta fibrillogenesis. *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.* **2016**, *1860*, 2474-2483, doi:10.1016/j.bbagen.2016.07.019.
87. Parnas, A.; Nisemlat, S.; Weiss, C.; Levy-Rimler, G.; Pri-Or, A.; Zor, T.; Lund, P.A.; Bross, P.; Azem, A. Identification of Elements That Dictate the Specificity of Mitochondrial Hsp60 for Its Co-Chaperonin. *Plos One* **2012**, *7*, doi:10.1371/journal.pone.0050318.
88. Someya, Y.; Yui, H. Fluorescence Lifetime Probe for Solvent Microviscosity Utilizing Anilinonaphthalene Sulfonate. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 5470-5476, doi:10.1021/ac100116j.
89. Bharat, S.V.; Shekhtman, A.; Pande, J. The cataract-associated V41M mutant of human gamma S-crystallin shows specific structural changes that directly enhance local surface hydrophobicity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2014**, *443*, 110-114, doi:10.1016/j.bbrc.2013.11.073.
90. Macion-Dazard, R.; Callahan, N.; Xu, Z.; Wu, N.; Thibonnier, M.; Shoham, M. Mapping the binding site of six nonpeptide antagonists to the human V-2-renal vasopressin receptor. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2006**, *316*, 564-571, doi:10.1124/jpet.105.095554.
91. Utz, J.R.J.; Lorentz, C.P.; Markowitz, D.; Rudser, K.D.; Diethelm-Okita, B.; Erickson, D.; Whitley, C.B. START, a double blind, placebo-controlled pharmacogenetic test of responsiveness to sapropterin dihydrochloride in phenylketonuria patients. *Molecular Genetics and Metabolism* **2012**, *105*, 193-197, doi:10.1016/j.ymgme.2011.10.014.
92. Kyte, J.; Doolittle, R.F. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of Molecular Biology* **1982**, *157*, 105-132, doi:10.1016/0022-2836(82)90515-0.
93. Narhi, L.; Wood, S.J.; Steavenson, S.; Jiang, Y.J.; Wu, G.M.; Anafi, D.; Kaufman, S.A.; Martin,

- F.; Sitney, K.; Denis, P., et al. Both familial Parkinson's disease mutations accelerate alpha-synuclein aggregation. *Journal of Biological Chemistry* **1999**, *274*, 9843-9846, doi:10.1074/jbc.274.14.9843.
94. Xue, C.; Lin, T.Y.W.; Chang, D.; Guo, Z.F. Thioflavin T as an amyloid dye: fibril quantification, optimal concentration and effect on aggregation. *Royal Society Open Science* **2017**, *4*, doi:10.1098/rsos.160696.
95. Ishida, R.; Okamoto, T.; Motojima, F.; Kubota, H.; Takahashi, H.; Tanabe, M.; Oka, T.; Kitamura, A.; Kinjo, M.; Yoshida, M., et al. Physicochemical Properties of the Mammalian Molecular Chaperone HSP60. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, doi:10.3390/ijms19020489.
96. Liberek, K.; Lewandowska, A.; Zietkiewicz, S. Chaperones in control of protein disaggregation. *Embo Journal* **2008**, *27*, 328-335, doi:10.1038/sj.emboj.7601970.
97. Kannaian, B.; Sharma, B.; Phillips, M.; Chowdhury, A.; Manimekalai, M.S.S.; Aday, S.S.; Ng, J.T.Y.; Kumar, A.; Lim, S.; Mu, Y.G., et al. Abundant neuroprotective chaperone Lipocalin-type prostaglandin D synthase (L-PGDS) disassembles the Amyloid-beta fibrils. *Scientific Reports* **2019**, *9*, doi:10.1038/s41598-019-48819-5.
98. Gong, H.; He, Z.H.; Peng, A.L.; Zhang, X.; Cheng, B.A.; Sun, Y.; Zheng, L.; Huang, K. Effects of several quinones on insulin aggregation. *Sci. Rep.* **2014**, *4*, doi:10.1038/srep05648.
99. Fenton, W.A.; Kashi, Y.; Furtak, K.; Horwich, A.L. Residues in chaperonin GroEL required for polypeptide binding and release. *Nature* **1994**, *371*, 614-619, doi:10.1038/371614a0.
100. Chen, L.L.; Sigler, P.B. The crystal structure of a GroEL/peptide complex: Plasticity as a basis for substrate diversity. *Cell* **1999**, *99*, 757-768, doi:10.1016/s0092-8674(00)81673-6.
101. Noi, K.; Kitamura, A.; Hirai, H.; Hongo, K.; Sakurai, T.; Mizobata, T.; Kawata, Y. Suppression of Sup35 amyloid fibril formation by group II chaperonin from *Thermoplasma acidophilum*. *Am. J. Mol. Biol.* **2012**, *2*, 265-275, doi:10.4236/ajmb.2012.23028.
102. Zahn, R.; Buckle, A.M.; Perrett, S.; Johnson, C.M.; Corrales, F.J.; Golbik, R.; Fersht, A.R. Chaperone activity and structure of monomeric polypeptide binding domains of GroEL. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1996**, *93*, 15024-15029, doi:10.1073/pnas.93.26.15024.
103. Altamirano, M.M.; Golbik, R.; Zahn, R.; Buckle, A.M.; Fersht, A.R. Refolding chromatography with immobilized mini-chaperones. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, *94*, 3576-3578, doi:10.1073/pnas.94.8.3576.
104. Singh, A.; Upadhyay, V.; Upadhyay, A.K.; Singh, S.M.; Panda, A.K. Protein recovery from inclusion bodies of *Escherichia coli* using mild solubilization process. *Microbial Cell Factories* **2015**, *14*, doi:10.1186/s12934-015-0222-8.
105. Sharapova, O.A.; Yurkova, M.S.; Fedorov, A.N. A minichaperone-based fusion system for producing insoluble proteins in soluble stable forms. *Protein Engineering Design & Selection*

- 2016**, 29, 57-64, doi:10.1093/protein/gzv060.
106. Yurkova, M.S.; Sharapova, O.A.; Zenin, V.A.; Fedorov, A.N. Versatile format of minichaperone-based protein fusion system. *Scientific Reports* **2019**, 9, doi:10.1038/s41598-019-51015-0.
  107. Tam, S.; Geller, R.; Spiess, C.; Frydman, J. The chaperonin TRiC controls polyglutamine aggregation and toxicity through subunit-specific interactions. *Nat. Cell Biol.* **2006**, 8, 1155-U1211, doi:10.1038/ncb1477.
  108. Ellman, L.G. Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1959**, 82, 70-77.
  109. Abriata, L.A. A Simple Spreadsheet Program To Simulate and Analyze the Far-UV Circular Dichroism Spectra of Proteins. *Journal of Chemical Education* **2011**, 88, 1268-1273, doi:10.1021/ed200060t.
  110. Oh, H.J.; Easton, D.; Murawski, M.; Kaneko, Y.; Subjeck, J.R. The chaperoning activity of hsp110 - Identification of functional domains by use of targeted deletions. *Journal of Biological Chemistry* **1999**, 274, 15712-15718, doi:10.1074/jbc.274.22.15712.
  111. Scheibel, T.; Weikl, T.; Buchner, J. Two chaperone sites in Hsp90 differing in substrate specificity and ATP dependence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1998**, 95, 1495-1499, doi:10.1073/pnas.95.4.1495.
  112. Thapliyal, C.; Jain, N.; Rashid, N.; Chaudhuri, P. Kinetics and thermodynamics of the thermal inactivation and chaperone assisted folding of zebrafish dihydrofolate reductase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2018**, 637, 21-30, doi:10.1016/j.abb.2017.11.006.
  113. Sharma, K.K.; Kumar, R.S.; Kumar, G.S.; Quinn, P.T. Synthesis and characterization of a peptide identified as a functional element in alpha A-crystallin. *Journal of Biological Chemistry* **2000**, 275, 3767-3771, doi:10.1074/jbc.275.6.3767.
  114. Raju, M.; Santhoshkumar, P.; Sharma, K.K. Cell-Penetrating Chaperone Peptide Prevents Protein Aggregation and Protects against Cell Apoptosis. *Advanced Biosystems* **2018**, 2, doi:10.1002/adbi.201700095.
  115. Subrizi, A.; Toropainen, E.; Ramsay, E.; Airaksinen, A.J.; Kaarniranta, K.; Urtti, A. Oxidative Stress Protection by Exogenous Delivery of rhHsp70 Chaperone to the Retinal Pigment Epithelium (RPE), a Possible Therapeutic Strategy Against RPE Degeneration. *Pharmaceutical Research* **2015**, 32, 211-221, doi:10.1007/s11095-014-1456-6.
  116. Blum, D.; Torch, S.; Lambeng, N.; Nissou, M.F.; Benabid, A.L.; Sadoul, R.; Verna, J.M. Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Progress in Neurobiology* **2001**, 65, 135-172, doi:10.1016/s0301-0082(01)00003-x.
  117. Ungerstedt, U. 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *Eur. J. Pharmacol.* **1968**, 5, 107-110.

118. Outeiro, T.F.; Klucken, J.; Strathearn, K.E.; Liu, F.; Nguyen, P.; Rochet, J.C.; Hyman, B.T.; McLean, P.J. Small heat shock proteins protect against alpha-synuclein-induced toxicity and aggregation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2006**, *351*, 631-638, doi:10.1016/j.bbrc.2006.10.085.
119. Klucken, J.; Shin, Y.; Masliah, E.; Hyman, B.T.; McLean, P.J. Hsp70 reduces alpha-synuclein aggregation and toxicity. *Journal of Biological Chemistry* **2004**, *279*, 25497-25502, doi:10.1074/jbc.M400255200.
120. Armenteros, J.J.A.; Sonderby, C.K.; Sonderby, S.K.; Nielsen, H.; Winther, O. DeepLoc: prediction of protein subcellular localization using deep learning. *Bioinformatics* **2017**, *33*, 3387-3395, doi:10.1093/bioinformatics/btx431.
121. Velazquez, J.M.; Lindquist, S. hsp70 - Nuclear concentration during environmental-stress and cytoplasmic storage during recovery. *Cell* **1984**, *36*, 655-662, doi:10.1016/0092-8674(84)90345-3.
122. Tapia, H.; Morano, K.A. Hsp90 Nuclear Accumulation in Quiescence Is Linked to Chaperone Function and Spore Development in Yeast. *Molecular Biology of the Cell* **2010**, *21*, 63-72, doi:10.1091/mbc.E09-05-0376.
123. Shendelman, S.; Jonason, A.; Martinat, C.; Leete, T.; Abeliovich, A. DJ-1 is a redox-dependent molecular chaperone that inhibits alpha-synuclein aggregate formation. *Plos Biology* **2004**, *2*, 1764-1773, doi:10.1371/journal.pbio.0020362.
124. Xu, C.Y.; Kang, W.Y.; Chen, Y.M.; Jiang, T.F.; Zhang, J.; Zhang, L.N.; Ding, J.Q.; Liu, J.; Chen, S.D. DJ-1 Inhibits alpha-Synuclein Aggregation by Regulating Chaperone-Mediated Autophagy. *Frontiers in Aging Neuroscience* **2017**, *9*, doi:10.3389/fnagi.2017.00308.
125. Jain, N.; Knowles, T.J.; Lund, P.A.; Chaudhuri, T.K. Minichaperone (GroEL191-345) mediated folding of MalZ proceeds by binding and release of native and functional intermediates. *Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics* **2018**, *1866*, 941-951, doi:10.1016/j.bbapap.2018.05.015.
126. Pantoliano, M.W.; Ladner, R.C.; Bryan, P.N.; Rollence, M.L.; Wood, J.F.; Poulos, T.L. Protein engineering of subtilisin BPN' - enhanced stabilization through the introduction of 2 cysteines to form a disulfide bond. *Biochemistry* **1987**, *26*, 2077-2082, doi:10.1021/bi00382a002.
127. Kim, S.A.; Chang, S.; Yoon, J.H.; Ahn, S.G. TAT-Hsp40 inhibits oxidative stress-mediated cytotoxicity via the inhibition of Hsp70 ubiquitination. *FEBS Lett.* **2008**, *582*, 734-740, doi:10.1016/j.febslet.2008.01.053.
128. Nagel, F.; Dohm, C.P.; Bahr, M.; Wouters, F.S.; Dietz, G.P.H. Quantitative evaluation of chaperone activity and neuroprotection by different preparations of a cell-penetrating Hsp70. *J. Neurosci. Methods* **2008**, *171*, 226-232, doi:10.1016/j.jneumeth.2008.03.008.
129. Doepfner, T.R.; Ewert, T.A.S.; Tonges, L.; Herz, J.; Zechariah, A.; ElAli, A.; Ludwig, A.K.;

- Giebel, B.; Nagel, F.; Dietz, G.P.H., et al. Transduction of Neural Precursor Cells with TAT-Heat Shock Protein 70 Chaperone: Therapeutic Potential Against Ischemic Stroke after Intraatrial and Systemic Transplantation. *Stem Cells* **2012**, *30*, 1297-1310, doi:10.1002/stem.1098.
130. Gifondorwa, D.J.; Robinson, M.B.; Hayes, C.D.; Taylor, A.R.; Prevette, D.M.; Oppenheim, R.W.; Caress, J.; Milligan, C.E. Exogenous delivery of heat shock protein 70 increases lifespan in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neuroscience* **2007**, *27*, 13173-13180, doi:10.1523/jneurosci.4057-07.2007.
131. Bobkova, N.V.; Garbuz, D.G.; Nesterova, I.; Medvinskaya, N.; Samokhin, A.; Alexandrova, I.; Yashin, V.; Karpov, V.; Kukharsky, M.S.; Ninkina, N.N., et al. Therapeutic Effect of Exogenous Hsp70 in Mouse Models of Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimers Disease* **2014**, *38*, 425-435, doi:10.3233/jad-130779.