

(様式2)

学位論文の概要及び要旨

氏 名 山本 英絵 印

題 目 ヒト分子シャペロンHsp60とそのアピカルドメインによる α -synuclein凝集・アミロイド線維形成抑制に関する研究

学位論文の概要及び要旨

加齢に伴い発症率が上がるパーキンソン病などの神経変性疾患は、高齢化が進む社会で今後さらに患者が増えることが懸念されている。パーキンソン病患者脳内には、レビー小体と呼ばれる封入体が見られ、この主な構成物はアミロイド線維化した α -synucleinである。一方、熱ショックタンパク質 (Hsp) などの分子シャペロンは、他のタンパク質の折れたたみを介助する役割がある。さまざまなHspによる α -synucleinのアミロイド線維化抑制効果の研究が進められているが、ミトコンドリア分子シャペロンであるヒトHsp60については、明らかにされていない。そこで本研究では、Hsp60による α -synucleinの凝集やアミロイド線維化抑制効果について検証した。Hsp60グループのアピカルドメイン(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配向が変化する「開閉式」で、「閉じた」構造からADの配向が上方に変わり「開いた」構造になると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。先行研究で大腸菌Hsp60であるGroELの構造変化と α -synucleinなどのアミロイド線維化抑制効果について解析を行なった。GroELのADを上押し上げた構造のGroEL G192Wがアミロイド線維化を強く抑制することを報告した。この成果を本研究ではHsp60に応用し、Hsp60 G190W(GW)を作製した。190番目のグリシンは、アピカルドメインとインターメディアイトドメインの間のヒンジに存在する。このグリシンを高いトリプトファンに置き換えると、トリプトファンがADを上押し上げた配向で固定されると考えられる。ゲルろ過クロマトグラフィー解析や透過型電子顕微鏡での観察から、予想通りHsp60 GWは野生型と同じく14量体構造を保ちながらADの配向が上方に変化していることが示された。0.1モノマーモル比のHsp60野生型を α -synuclein と共存させてもアミロイド線維化を完全に抑えることはできなかったが、0.1モノマーモル比のHsp60 GWは α -synuclein のアミロイド線維化を完全に抑制した。ADを上方に押し上げ、「開いた」構造に変化させたHsp60 GWはHsp60野生型に比べて α -synucleinのアミロイド線維化を低用量で抑制することがわかった。Hsp60

GWは、 α -synucleinモノマーとの結合がHsp60野生型に比べ強力であることが解離定数測定で示され、Hsp60 GWの持つ高い表面疎水性が α -synucleinとの相互作用に影響したと考えられた。ADの配向の違いにより、 α -synucleinアミロイド線維化抑制効果に大きな違いが出たことから、単離したADの α -synucleinアミロイド線維化抑制効果を調べることにした。しかし単離ADは、温度変化によって二次構造が変化する不安定な構造であることがわかった。そこでADの立体構造で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の形成を誘起し、安定化をはかった。システイン残基を導入すると(AD(Cys))、熱耐性をもたせることができ、システイン残基導入前より安定構造であることが示された。AD(Cys)は濃度依存的に α -synucleinのアミロイド線維化を抑制し、2モル比や3モル比のAD(Cys)存在下で α -synucleinのThioflavin T蛍光強度の上昇を強く抑えた。免疫沈降法でAD(Cys)が α -synucleinと結合することを示し、その相互作用の強さを解離定数測定で調べた。 α -synucleinに対するAD(Cys)の解離定数は、AD(Cys)は5.04 nMであった。AD(Cys)は、14量体Hsp60と比べて小型である。そこでAD(Cys)を動物細胞にタンパク質導入し、細胞内で α -synucleinの凝集や毒性を抑えるかどうかを調べた。まず α -synucleinにGFP蛍光を付加したGFP- α -synucleinが継代を重ねても発現するGFP- α -synuclein安定発現株を作製した。GFP- α -synuclein安定発現株は、細胞質全体にGFP蛍光を放ち、 α -synucleinの発現が確認された。この細胞に酸化ストレスをかけると、 α -synucleinが凝集し、GFP蛍光が点状に見られた。 α -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。あらかじめAD(Cys)を細胞に導入しておいたGFP- α -synuclein安定発現株と、非導入細胞に等しく酸化ストレスをかけ、GFP- α -synucleinの凝集と細胞障害性(細胞死)を調べた。AD(Cys)導入細胞は、非導入細胞に比べGFP- α -synucleinの凝集率が低かった。さらに、AD(Cys)導入細胞は、細胞障害性も低く抑えられた。AD(Cys)が細胞内で、 α -synucleinに作用し、酸化ストレスによる凝集や細胞死から細胞を保護した可能性が示唆された。

以上の結果より、ヒトHsp60による α -synucleinのアミロイド線維化抑制効果を初めて明らかにした。Hsp60野生型とHsp60 GW変異体との比較からADの重要性を示した。さらに、単離AD(Cys)が細胞内でも α -synucleinの凝集や細胞障害性抑制に働くミニシャペロンであることを初めて明示し、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、実験動物体内で実証できれば、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。