

氏名（本籍）	岡本 知也（兵庫県）
専攻分野の名称	博士（理学）
学位記番号	工博甲 第2号
学位授与の日付	平成29年 3月22日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	工学資源学研究科・生命科学専攻
学位論文題目（英文）	哺乳類分子シャペロン HSP60 の生理機能及び機能的構造に関する研究 (Studies on the physiological function and functional structure of the mammalian molecular chaperon HSP60)
論文審査委員	(主査) 教授 伊藤 英晃 (副査) 教授 涌井 秀樹 (副査) 教授 尾高 雅文 (副査) 教授 疋田 正喜

論文内容の要旨

生体が健康を維持して正常に生きていくためには、生体内の恒常性（ホメオスタシス）を維持することが重要である。とりわけ、タンパク質はホメオスタシスにとって重要な役割を持ち、生体内外の各種ストレスによって簡単に崩れる。プロテオスタシスの崩壊はホメオスタシス自体に影響を与え、細胞の働きに異常をきたし、がんなどの各種疾患を引き起こす。

このタンパク質恒常性に深くかかわっているのが、分子シャペロンと呼ばれるタンパク質群である。生体で働くタンパク質は新規合成された後、アミノ酸配列によって定められた正しい構造に折りたたまれ（フォールディング）、必要とする細胞小器官に運ばれ、単一もしくは複数分子と固有の立体構造をとる（アッセムブリ）ことによって正常な働きを表す。タンパク質の立体構造は生体内の pH 変化や熱変化などのストレスによって容易に崩れ（変性）、タンパク質の活性を失う（失活）。分子シャペロンの機能の一つの例として、これらタンパク質の機能発現及び維持に重要な役割を持つことである。特に有名な分子シャペロンとしては熱によって誘導されるものがあり、そのため HSP（熱ショックタンパク質：Heat Shock Protein）とも呼ばれている。HSP はその分子量によって種類分けされており、よく知られているものとして HSP60、HSP70、HSP90 などがある。上述したタンパク質のフォールディングや生理機能・構造維持に特に関与している分子として HSP60 が知られており、申請者はこの HSP60 という分子シャペロンに着目した。

HSP60は大腸菌シャペロン GroEL のホモログ（相同体）である。GroEL の分子機構や構造を対象とした詳細な分子レベル解析は非常に多くの研究者が携わり、解明されてきた。しかしながら、哺乳類の、特に遺伝子組み換えを用いない野生型の HSP60 はほとんど解析されていない。申請者は本研究において、野生型 HSP60 の精製法の確立に加えて、生体内における HSP60 の生理機能と関連する構造変化解析、結果から予測される反応モデルの構築を目的として、分子レベルでのインビトロ解析を行った。

①ブタ肝臓からの HSP60 の精製法の確立

ブタ肝臓抽出物から、野生型 HSP60 の精製法の確立を行った。また、同時に HSP60 の補因子（コシャペロン）である HSP10 の精製も行った。サイズ排除クロマトグラフィーによる分子量測定、及び透過型電子顕微鏡（TEM）の結果、HSP60 は通常状態で安定な 7 量体リング構造（シングルリング構造）を形成することが判明した。

②アデノシン三リン酸（ATP）存在下における HSP60 および HSP60/HSP10 の構造変化

TEM およびグルタルアルデヒドクロスリンク実験より、シングルリング HSP60 が互いに重なり合う 14 量体ダブルリング構造へと一部構造変化することが判明した。コシャペロン HSP10 存在下において、TEM による分子観察より、HSP60 は ATP 存在下で HSP10 と結合し、フットボール型複合体を含むダブルリング構造へと構造変化した。100 分子観察により、HSP60 は、ATP、HSP10 両存在下において約 70% がダブルリング構造をとることが判明した。

論文審査結果の要旨

生体が健康を維持して正常に生きていくためには、生体内の恒常性（ホメオスタシス）を維持することが重要である。とりわけ、タンパク質はホメオスタシスにとって重要な役割を持ち、生体内外の各種ストレスによって簡単に崩れる。プロテオスタシスの崩壊はホメオスタシス自体に影響を与え、細胞の働きに異常をきたし、がんなどの各種疾患を引き起こす。

このタンパク質恒常性に深くかかわっているのが、分子シャペロンと呼ばれるタンパク質群である。生体で働くタンパク質は新規合成された後、アミノ酸配列によって定められた正しい構造に折りたたまれ（フォールディング）、必要とする細胞小器官に運ばれ、単一もしくは複数分子と固有の立体構造をとる（アッセンブリ）ことによって正常な働きを表す。タンパク質の立体構造は生体内の pH 変化や熱変化などのストレスによって容易に崩れ（変性）、タンパク質の活性を失う（失活）。分子シャペロンの機能の一つの例として、これらタンパク質の機能発現及び維持に重要な役割を持つことである。特に有名な分子シャペロンとしては熱によって誘導されるものがあり、そのため HSP（熱ショックタンパク質：Heat Shock Protein）とも呼ばれている。HSP はその分子量によって種類分けされており、よく知

られているものとしてHSP60, HSP70, HSP90などがある。上述したタンパク質のフォールディングや生理機能・構造維持に特に関与している分子としてHSP60が知られており、申請者はこのHSP60という分子シャペロンに着目した。

HSP60は大腸菌シャペロニンGroELのホモログ（相同体）である。GroELの分子機構や構造を対象とした詳細な分子レベル解析は非常に多くの研究者が携わり、解明されてきた。しかしながら、哺乳類の、特に遺伝子組み換えを用いない野生型のHSP60はほとんど解析されていない。申請者は本研究において、野生型HSP60の精製法の確立に加えて、生体内におけるHSP60の生理機能と関連する構造変化解析、結果から予測される反応モデルの構築を目的として、分子レベルでのインビトロ解析を行った。

①ブタ肝臓からのHSP60の精製法の確立：ブタ肝臓抽出物から、野生型HSP60の精製法の確立を行った。また、同時にHSP60の補因子（コシャペロン）であるHSP10の精製も行った。サイズ排除クロマトグラフィーによる分子量測定、及び透過型電子顕微鏡（TEM）の結果、HSP60は通常状態で安定な7量体リング構造（シングルリング構造）を形成することが判明した。

②アデノシン三リン酸（ATP）存在下におけるHSP60およびHSP60/HSP10の構造変化：TEMおよびグルタルアルデヒドクロスリンク実験より、シングルリングHSP60が互いに重なり合う14量体ダブルリング構造へと一部構造変化することが判明した。コシャペロンHSP10存在下において、TEMによる分子観察より、HSP60はATP存在下でHSP10と結合し、フットボール型複合体を含むダブルリング構造へと構造変化した。100分子観察により、HSP60は、ATP、HSP10両存在下において約70%がダブルリング構造をとることが判明した。

③HSP60のATPase活性に対するHSP10の影響：HSP60とHSP10の相互作用に対するATPの影響を調べた。アルミニウムフロライド（AlFx）を用いてHSP60のATPase活性を失速させると、HSP10の結合力が増加し、ほとんどのHSP60がフットボール複合体を形成した。

④ATPase活性によって制御されるHSP60/HSP10複合体のタンパク質フォールディング活性：グアニジンによって変性させたローダネーゼ、クエン酸合成酵素、及び熱変性ローダネーゼは、ATP存在下においてHSP60/HSP10複合体によってリフォールディングされた。単量体タンパク質であるローダネーゼのリフォールディングはAlFxの添加によってわずかに増加したが、本質的に二量体として存在するクエン酸合成酵素は大きく減少した。熱変性及びトリプシン消化耐性実験の結果とも一致しており、HSP60/HSP10複合体の基質結合・放出が、ATPase活性によって厳密に制御されていることが示唆された。

⑤ATP加水分解活性の速度論敵解析：HSP60とGroELの間で、ATPに対する反応性に違いがあるかどうかを調べるために、異なる濃度条件下における加水分解活性を測定し、curve fittingを用いることで速度論パラメーターを算出した。その結果、HSP60はGroELと異なり、0から1 mMにおいて、2段階のintra-ring positive cooperativityと、1 mM以上における弱いinter-ring negative cooperativityを持っていることが明らかになった。

⑥HSP60はGTPase活性も有する：ATPと同じプリンヌクレオチドに分類されるGTPについても、HSP60との関係を解析した。HSP60はGTPase活性も有しているが、その活性はATPと比較して低く、リフォールディング活性も十分に発揮できなかったことから、あくまで補助機能としてGTPase活性を有していると推察される。しかしながら、GTP分子はATP加水分解にわずかに影響を及ぼしたが、効率的なリフォールディングには影響しなかった。細胞質濃度条件下（3.5 mM ATPおよび0.5 mM GTP）では、加水分解は低く抑えられているにもかかわらず、リフォールディング活性は保たれていた。これらの結果は、生体内においてHSP60はヌクレオチドの消費を抑えて効率的に働いていることを示唆している。

この研究内容は斯界の発展に貢献すると共に、博士の学位に価する。