

**DnaJ の二量体構造は十分なコシヤペロン
活性の發揮を保証する**

**Dimeric conformation of DnaJ ensures its enough
cochaperone activity**

金沢大学大学院自然科学研究科

自然システム学専攻

内田 朋弥

A heat shock protein 70 (Hsp70) chaperone system consists of Hsp70, Hsp40, and a nucleotide-exchange factor. It helps unfolded proteins to fold into their native conformations. Hsp40 has both chaperone and cochaperone activity. Typical Hsp40s assume a homodimeric structure that is critical in functioning as a chaperone. Here, using an *Escherichia coli* Hsp70 chaperone system consisting of DnaK, DnaJ, and GrpE, the relationship between the dimeric structure and the cochaperone activity of Hsp40 was examined. Expression systems were constructed and two heterodimer DnaJs that included a mutated protomer lacking the cochaperone activity were purified. Their normal chaperone activity was demonstrated by examining aggregation prevention activity using urea-denatured luciferase. When the cochaperone activity of the heterodimer DnaJs was investigated by measuring an ATPase activity of DnaK and a heat-denatured G6PDH refolding activity of the DnaK chaperone system, they showed reduced cochaperone activity. These results indicate that two intact protomers are required for full cochaperone activity of Hsp40, and suggest that one Hsp40 molecule promotes simultaneous binding of multiple Hsp70 molecules to one substrate molecule, which is needed in efficient folding of denatured proteins.

【背景】

新規に合成されたポリペプチドはそれぞれが固有の立体構造に折り畳まれ、機能を発揮する。最終的な立体構造はその一次配列により決定されるが、多くのポリペプチドは適切に折り畳まれるために、分子シャペロンと呼ばれる一群のタンパク質の介助を必要とする。主要な分子シャペロンとして熱ショックタンパク質(Heat Shock Protein)である Hsp100、Hsp90、Hsp70、シャペロニンとスモール Hsp が知られており、それらの中でも Hsp70 は中心的な役割を担っている。Hsp70 シャペロンシステムは原核生物から真核生物まで広く保存されており、生体内でのタンパク質の品質管理に関わっている。Hsp70 シャペロンシステムは立体構造形成前のポリペプチドや変性したタンパク質と相互作用し、それらの正常な立体構造形成を補助する。また、凝集したタンパク質の解きほぐしや、著しく構造が崩れているタンパク質の分解にも関与することが報告されている。Hsp70 シャペロンシステムは Hsp70 とコシャペロンである Hsp40、ヌクレオチド交換因子で構成される。Hsp70 は自身に結合した ATP の加水分解に従って立体構造を変化させ、基質に対する親和性を変化させる。コシャペロンである Hsp40 は Hsp70 と相互作用し、Hsp70 の ATPase 活性を促進することで Hsp70 を基質高親和性へと変換することができる。このような活性は Hsp40 のコシャペロン活性と呼ばれている。また、Hsp40 は単独で立体構造形成前のポリペプチドや変性したタンパク質に結合し、その凝集を防ぐシャペロン活性も持つ。Hsp40 は複数のドメインで構成され、タンパク質の N 末端から、J ドメイン、glycine/phenylalanine リッチ領域(G/F 領域)、C 末端ドメイン(CTD)と呼ばれている。J ドメインは Hsp70 との相互作用ドメインでありすべての Hsp40 で保存されている。G/F 領域と CTD は基質結合に関与することが報告されている。タンパク質の二つのプロトマーが C 末端同士で結合したホモ二量体が Hsp40 の機能単位である。そのホモ二量体構造はシャペロン活性において重要であることが示されている。

【目的】

これまでに、一量体で存在する Hsp40 変異体を用いた解析により、Hsp40 の二量体構造はシャペロン活性に重要であることが示されてきた。一方、二量体構造とコシャペロン活性の関係は明らかになっていない。本研究では、Hsp40 は二量体構造を形成することにより、一分子あたりに二つの J ドメインを有する点に着目した。これによって、Hsp40 と Hsp70 の相互作用効率が上昇している可能性がある。大腸菌の Hsp70 シャペロンシステムである DnaK シャペロンシステムを使用し、解析を行うこととした。二量体構造の一方のプロトマーにコシャペロン活性を失う変異を持つヘテロ二量体型 DnaJ(大腸菌 Hsp40)を精製し、解析を行うことで Hsp40 の二量体構造とコシャペロン活性の関係を明らかにする。

【実験方法】

①ヘテロ二量体型 DnaJ の精製

ヘテロ二量体型 DnaJ を精製するために、DnaJ 発現ベクターを構築した。コシャペロン活性を欠失させるアミノ酸置換(H33Q または D35N)を導入した変異型 DnaJ 発現ベクターも構築した。大腸菌を二種類のベクターで共形質転換することで共発現系を構築し、ヘテロ二量体型 DnaJ の精製条件の検討を行った。

②化学変性ルシフェラーゼ抗凝集活性測定

化学変性したルシフェラーゼを変性剤が含まれていないバッファーで希釈することで凝集反応を開始させた。凝集反応は蛍光分光光度計で測定した。DnaJ 存在下での凝集反応を測定し、DnaJ のシャペロン活性を評価した。

③ATPase 活性測定

DnaK シャペロンシステムに ATP を加えると、反応サイクルの進行によって ATP が分解され、遊離リン酸が増加する。DnaJ はコシャペロン活性によって DnaK の ATPase 活性を上昇させ、ATP の分解を促進する。DnaJ 存在条件での遊離リン酸量を経時的に測定し、ATPase 速度(Pi nmol/min/DnaK)を求めた。ATPase 速度を比較することでコシャペロン活性を評価した。

④熱変性 G6PDH リフォールディングアッセイ

熱変性した Glucose 6-phosphate dehydrogenase(G6PDH)を DnaK シャペロンシステム入りのバッファーで希釈すると、G6PDH の構造が元に戻り、酵素活性が回復する(リフォールディング)。リフォールディング反応は経時的に進行するので、リフォールディング速度(%/min)を求めることができる。リフォールディング速度を比較することで DnaJ のコシャペロン活性を評価した。

【結果】

①ヘテロ二量体型 DnaJ の精製

ヘテロ二量体型 DnaJ を精製するために、末端に異なるタグ(His タグ、Strep タグ)が付加された DnaJ 発現ベクターを構築した。二種のベクターで大腸菌 HMS174(DE3)株を形質転換することで、DnaJ の共発現系を構築した(図 1)。アミノ酸置換は His タグが付加されている DnaJ に導入した。発現条件・精製条件を検討した結果、各種クロマトグラフィーを組み合わせることでプロトマーの一方に His タグ、もう一方に Strep タグが付加されているヘテロ二量体型 DnaJ の精製に成功した。

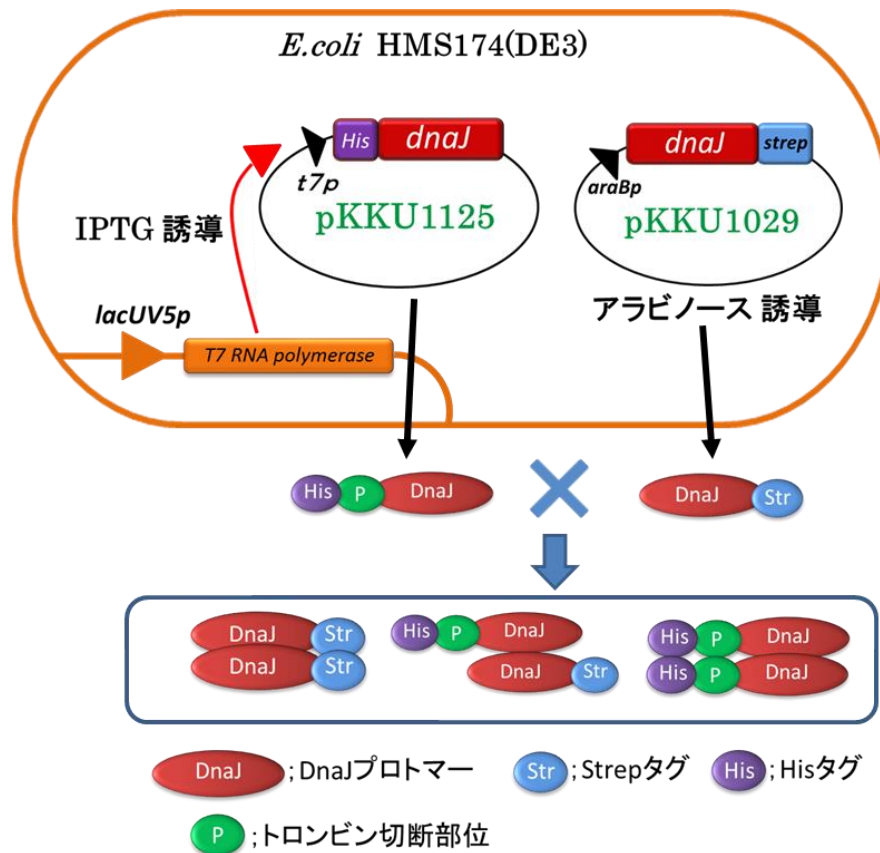


図1 ヘテロ二量体型 DnaJ の発現系

大腸菌 HMS174(DE3)株を pKKU1029、pKKU1125 により共形質転換した。pKKU1029 は *Salmonella typhimurium* 由来の *araB* プロモーター、リプレッサーをコードする遺伝子 *araC* を持ち、アラビノースの添加により *araB* プロモーター下流の *dnaJ-strep* 遺伝子の発現を誘導できる。pKKU1125 は T7 フェージ由来の T7 プロモーター (*T7p*) を含む。大腸菌 HMS174(DE3)は染色体上の LacUV5 プロモーターの下流に T7 フェージの RNA ポリメラーゼ遺伝子がコードされているので、IPTG の添加によって T7 RNA ポリメラーゼ遺伝子が発現し、pKKU1125 上の T7 プロモーター下流の *his-dnaJ* 遺伝子の発現を誘導することができる。大腸菌内では青枠内に示す DnaJ が形成される。真ん中に描かれている、His タグプロトマーと Strep タグプロトマーで構成された DnaJ を精製した。

②化学変性ルシフェラーゼ抗凝集活性測定

BSA 存在下では、ルシフェラーゼの凝集反応による散乱強度の上昇が確認された(図 2)。一方で、DnaJ がルシフェラーゼと同濃度で存在する条件(実線グラフ)ではすべての DnaJ で凝集が抑制され、散乱強度の上昇が抑えられた。また、DnaJ がルシフェラーゼの半分の濃度で存在する条件(点線グラフ)では凝集抑制が弱くなり、散乱強度は緩やかに上昇した。この時、すべての DnaJ は同程度の凝集抑制を示した。

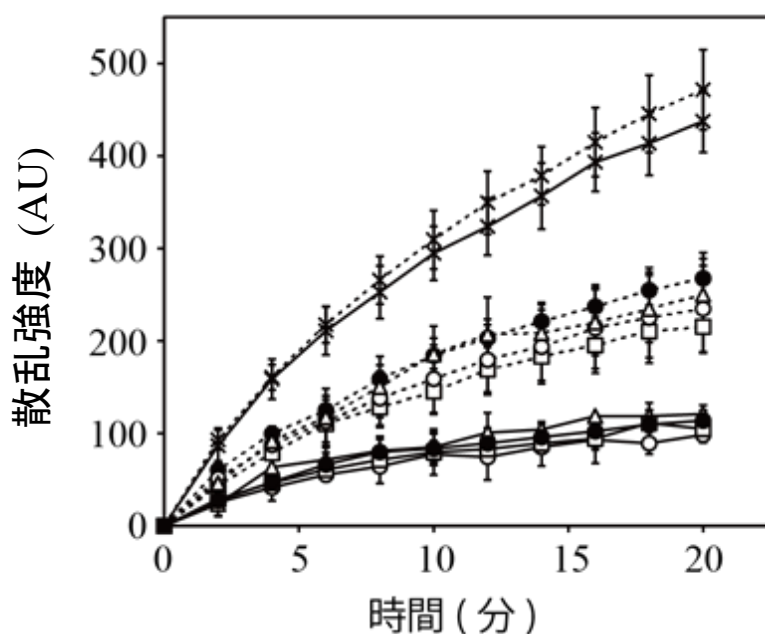


図 2 化学変性ルシフェラーゼ抗凝集活性測定

変性ルシフェラーゼ(8 μM)を BSA または DnaJ [0.04 μM (点線) または 0.08 μM (実線)]を含むルシフェラーゼ測定バッファーで 100 倍希釈し(最終濃度 0.08 μM)、室温で静置した。各タンパク質は次の記号で示す。×:BSA、●: 野生型、○: タグ付き野生型、△: H33Q ヘテロ二量体、□: D35N ヘテロ二量体

③ATPase 活性測定

各 DnaJ 存在下での ATPase 速度を比較したところ、DnaJ の濃度上昇に伴い ATPase 速度が上昇した。ヘテロ二量体型 DnaJ 存在条件でも DnaJ の濃度上昇に伴い ATPase 速度が上昇したが、野生型と比較すると低下していた。ヘテロ二量体型 DnaJ によって野生型と同程度の ATPase 速度を達成するためには、野生型の 2 倍の濃度条件が必要とされた (図 3)。

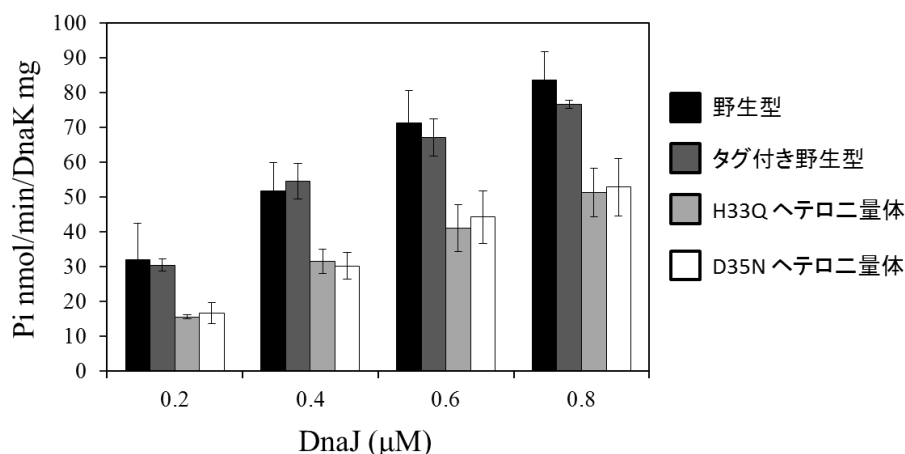


図 3 DnaJ 存在下での DnaK ATPase 活性

④熱変性 G6PDH リフォールディングアッセイ

各 DnaJ 存在下でのリフォールディング速度を比較したところ、DnaJ の濃度上昇に伴いリフォールディング速度が上昇した。ヘテロ二量体型 DnaJ 存在条件でも DnaJ の濃度上昇に伴いリフォールディング速度が上昇したが、野生型と比較すると低下していた。ヘテロ二量体型 DnaJ によって野生型と同程度のリフォールディング速度を実現するためには、野生型の 2 倍の濃度条件が必要とされた (図 4)。

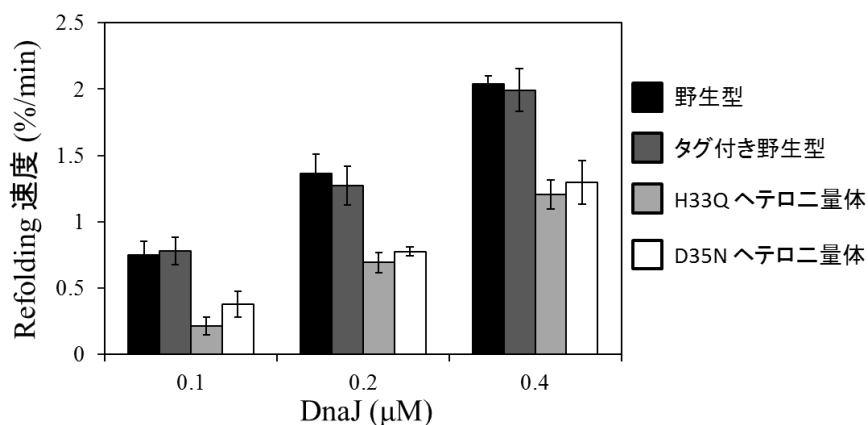


図 4 DnaJ 存在条件での DnaK シャペロンサイクルによる G6PDH のリフォールディング

学位論文審査報告書（甲）

1. 学位論文題目（外国語の場合は和訳を付けること。）

DnaJの二量体構造は十分なコシャペロン活性の発揮を保證する

2. 論文提出者 (1) 所属 自然科学研究科自然システム学専攻

(2) 氏名 内田朋弥

3. 審査結果の要旨（600～650字）

申請者は Hsp40 の代表として大腸菌の DnaJ タンパク質を用いて、ホモ二量体構造と活性の関係を調べた。片方のプロトマーの‘Jドメイン’にアミノ酸置換変異を持つ‘ヘテロ二量体型 DnaJ’を構築して活性測定を行い、ヘテロ二量体型 DnaJ は、変性状態のポリペプチドに結合して凝集を抑制する‘シャペロン活性’を保持しているが、Hsp70 の持つ ATP アーゼ活性を刺激して Hsp70 が変性状態のポリペプチドに安定に結合することを促す‘コシャペロン活性’が低下していることを明らかにした。

Hsp70 は、新生ポリペプチド鎖や変性タンパク質の正常な立体構造形成を補助する分子シャペロンとして知られている。Hsp40 は分子シャペロンとしての機能に加えて、Hsp70 のはたらきを補助するコシャペロンとしても機能する。主要な Hsp40 はホモ二量体構造をとり、そのシャペロン活性に二量体構造が重要であることは既に報告されているが、コシャペロン活性と二量体構造の関係は不明であった。申請者の研究により、十分なコシャペロン活性には、1分子の Hsp40 当たり2つの正常な Jドメインが必要であることが示され、コシャペロン活性にも二量体構造が重要であることが明らかになった。このことは、基質タンパク質上での Hsp40 と Hsp70 の相互作用のモル比が「1：多」であること意味するのと同時に、両者の相互作用様式にさまざまな興味深い示唆を与える。よって、本研究は博士（理学）を授与するのに充分であると判断した。

4. 審査結果 (1) 判定 (いずれかに○印) 合格 ・ 不合格

(2) 授与学位 博士（理学）