



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Molecular Mechanism of the Hsf1-Chaperone System Responsible for Proteostasis [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	川越, 聡一郎
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(理学)
Dissertation Number	甲第15396号
Issue Date	2023-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/89827
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	KAWAGOE_Soichiro_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（理学） 氏名 川越 聡一郎

学位論文題名

Molecular Mechanism of the Hsf1-Chaperone System Responsible for Proteostasis

(タンパク質恒常性の維持を担う Hsf1-シャペロンシステムの分子機構解明)

第一章では本学位論文の背景として、細胞内タンパク質恒常性維持を担うストレスセンサーと分子シャペロンのシステムに着目した理由を述べる。細胞内では、タンパク質の合成、フォールディング、輸送や分解といったプロセスによってタンパク質の恒常性が維持される。このプロセスの中で、フォールディングはタンパク質の機能発現において重要な反応であるが、種々のストレスはそれらタンパク質の変性、ひいては凝集を引き起こす (Fig.1 上段)。このようなストレス下で、適切なフォールディングを補助するのが Heat shock factor 1 (Hsf1) – シャペロンシステムである。このシステム内で生じる、(1) シャペロンによる変性タンパク質のフォールディング回復の補助 (Fig. 1 中段)、(2) Hsf1 のストレス感知による会合状態変化を介したシャペロンの転写誘導 (Fig.1 下段)、の2つの反応がタンパク質恒常性維持に重要な意味を有している。(1)の反応はシャペロンの Foldase 機能とよばれ、この Foldase 機能においては、フォールディングの律速段階となり得るプロリンの *cis/trans* 異性化反応を触媒する PPIase 活性が主要な役割を担っているが、その分子メカニズムは明らかになっていない。一方、(2) の Hsf1 の転写活性制御は、ストレスレベル依存的な Hsf1 の会合状態の段階的な状態変化と結びついており、単量体は転写不活性である一方、多量体とさらに会合の進んだ相分離液滴状態ではシャペロンの転写を促進し、ゲル状液滴の状態になればシャペロンの転写量の低下とアポトーシスを引き起こす。しかし、そのストレス感知による状態変化のメカニズムは未解明である。本学位論文では、第二章で (1) シャペロンの PPIase 活性、第三章から五章では (2) シャペロンの量を制御する Hsf1 の状態変化のメカニズム解析を行い、Hsf1-シャペロンシステムの分子機構を検討することで、細胞内タンパク質恒常性維持機構の根幹をなす過程の分子論的解明を試みる。

第二章では、シャペロンの PPIase 活性の分子機構を検討するため、その立体構造情報が豊富でモデルとして多用

される Trigger Factor の PPIase ドメイン (TF^{PPD}) を対象とし、プロリンの *cis/trans* 異性化の遷移状態の構造推定から、PPIase 活性のメカニズムを明らかにした。TF^{PPD} と変性した基質タンパク質との複合体のように、弱い相互作用により形成される複合体の構造解析に威力を発揮する溶液 NMR 法を用いて、その複合体構造を決定したところ、TF^{PPD} は基質変性タンパク質の疎水性領域に位置するプロリン残基を認識することが明らかとなった。さらに反応過程の構造情報を得るために、分子動力学 (MD) シミュレーションによりその遷移状態の構造を推定したところ、TF^{PPD} の Ile195 の主鎖アミド基と基質変性タンパク質間に分子間水素結合形成が示された。この水素結合の形成が阻害される I195P 変異体では、PPIase 活性が顕著に低下したことから、PPIase 活性は、疎水性領域のプロリン残基の *cis/trans* 異性化の活性化エネルギーを、分子間水素結合によって低下させることで発現すると考えられた。

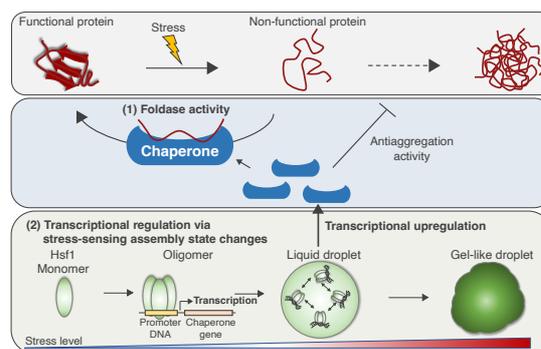


Fig. 1 Hsf1-シャペロンシステムの概要

以上のように、シャペロンは PPIase 活性により Foldase 機能を発現し、変性タンパク質のフォールディングの回復を補助するが、これらのシャペロンの発現はストレスによるタンパク質の変性や凝集に対抗するため、そのストレスセンサーである Hsf1 の状態変化を介して量的に制御される。第三章では、Hsf1 の状態変化の第一段階である多量体化機構を検討した。Hsf1 は細胞内では 37°C から 42°C への昇温によってロイシンジッパードメイン (LZ1-3) が会合した多量体となるが、この熱による多量体化は、Hsf1 の一連の転写制御の第一段階であるにもかかわらず、Hsf1 の大部分が天然変性領域であることから、その構造を実験的に決定することが困難であった。そこで、構造予測プログラム AlphaFold2 を用いて単量体の構造を推定した結果、単量体では LZ1-3 と、短いロイシンジッパードメイン (LZ4) が分子内で会合した状態 (closed 状態) であることが示された。この単量体が多量体化する過程を追跡するため、LZ1-3 の環境変化を反映する Trp169 の蛍光の温度変化測定を実施したところ、Hsf1 は LZ1-3 と LZ4 が解離した状態 (open 状態) を経て多量体化することが分かった。さらに、CD 測定と MD シミュレーションにより、昇温によって LZ4 が変性することが明らかとなったことから、昇温による LZ4 の変性に伴う LZ1-3 からの解離により、LZ1-3 間に分子間相互作用が生じ、互いに会合することで Hsf1 の多量体化が進行すると考えられた。

第四章では、多量体化の次の過程である相分離液滴形成の機構解明を目的とした。熱ストレスを受けた細胞では多くの場合、その pH の低下が誘起されることから、Hsf1 の多量体化からの液滴形成は酸性化により進行すると考えられる。そこで、Hsf1 の液滴形成を追跡可能な濁度測定と顕微鏡観察を行った結果、pH6.0 以下で濁度上昇と液滴形成が認められた。この酸性化による液滴形成のメカニズムを明らかにするため、溶液 NMR 法と CD 測定で Hsf1 の構造変化を追跡したところ、高温下、中性 pH で変性した LZ4 が、酸性 pH では二次構造を形成し、構造形成した LZ4 間の分子間相互作用によって、Hsf1 の相分離液滴の形成が進行することが明らかとなった。さらに、細胞内で Hsf1 と相互作用する PPIase である FKBP52 も、Hsf1 の相分離液滴を促進することがその濁度測定から示され、PPIase 活性は Hsf1 の会合を促進し、ストレス時の Hsf1 の転写活性を増強させていることが示唆された。

第五章では、さらに細胞にストレスがかかった状態で誘導される Hsf1 の相分離液滴から低流動性ゲル状液滴への相転移機構を検討した。熱や酸性化などのストレスは活性酸素種の産生により細胞内環境を酸化的雰囲気にすることから、酸化的・還元的条件、それぞれでの Hsf1 液滴の流動性を検討するために、レーザー光で褪色させた液滴の一部分の蛍光回復を観察する FRAP 法を実施した。その結果、酸化環境でその流動性は著しく低下し、ゲル状に相転移することが示された。このような酸化的雰囲気での相転移機構を明らかにするため、会合状態を反映する非還元 SDS-PAGE によって Hsf1 を評価した結果、酸化条件では 16 量体程度の高次多量体の形成が認められ、Hsf1 は複数の溶媒に露出したシステイン残基を有することから、これは分子間のジスルフィド架橋の結果と考えられた。したがって、酸化環境下では Hsf1 に分子間ジスルフィド結合が形成され、その結果生じる Hsf1 の高次多量体間の相互作用がゲル状液滴への相転移を駆動すると考えられた。

第六章では本学位論文において得られた結果と今後の展望をまとめている。まず、シャペロンの PPIase 活性の作用機序について、その遷移状態を決定することで解明した。次に、このシャペロンの転写を誘導する Hsf1 の会合状態変化は、種類を区別したストレス感知による Hsf1 の局所的な反応によって制御されることを示した。さらに PPIase が Hsf1 の液滴形成を促進し、転写制御する可能性も示唆された。以上の結果から、タンパク質恒常性維持は、ストレスの種類に応じた Hsf1-シャペロンシステムにおける Hsf1 の会合状態変化とそのシャペロン発現量の制御、シャペロンによる変性タンパク質のフォールディングの回復、さらに発現誘導されたシャペロンによる Hsf1 の会合状態変化という一連のサイクルによって達成されると考えられた。今後、シャペロン、Hsf1 それぞれの作用機序に加え、シャペロンと Hsf1 の間でのより詳細な相互制御機構が解明されていくことで、細胞内タンパク質恒常性維持の精緻なメカニズムが明らかになると期待される。