



# 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	<a href="https://hdl.handle.net/2115/89827">https://hdl.handle.net/2115/89827</a>
Rights(URL)	<a href="https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/">https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/</a>
Type	doctoral thesis
File Information	KAWAGOE_Soichiro_review.pdf, 審査の要旨



# 学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（理学） 氏名 川越 聡一郎

審査担当者	主査	教授	坂口 和靖	(徳島大学先端酵素学研究所)
	副査	教授	渡慶次 学	
	副査	教授	佐田 和己	
	副査	教授	石森 浩一郎	
	副査	教授	齋尾 智英	

## 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)

本学位論文は、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を目指して、代表的なシャペロン蛋白質であるトリガーファクターによる変性蛋白質の立体構造回復の補助機能 (Foldase 機能) とストレスセンサー蛋白質である Hsf-1 によるシャペロン蛋白質の転写制御機構について、NMR や CD、蛍光測定などの分光学的手法や液-液相分離解析のための濁度測定、顕微鏡観察、蛍光回復 (FRAP) 法、さらには分子動力学的手法も組み合わせることで、変性蛋白質におけるシャペロンの立体構造回復機構やストレス刺激によるストレスセンサータンパク質の会合状態制御機構を詳細に検討しており、それらの結果を全 6 章にまとめている。

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ており、本論文で対象とする Heat shock factor 1 (Hsf1) - シャペロンシステムの生物学的重要性やその分子機構解明における課題が示され、その Foldase 機能における主要な反応であるプロリンの cis/trans 異性化反応 (PPIase 活性) の分子機構と Hsf1 の転写活性を制御する会合状態変化の制御機構の解明を本論文の目的とすることが記されている。

第二章では、代表的な PPIase 活性を示すトリガーファクターの PPIase ドメイン (TFPPD) について、溶液 NMR 法を用いることで、その基質変性蛋白質との複合体構造を決定したところ、TFPPD 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り、分子動力学 (MD) シミュレーションからは、その遷移状態として TFPPD 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。このような遷移状態における水素結合形成の提案は、これまで分子機構の詳細が不明であった Foldase 機能の分子論的理解を大きく進めるものである。

第三章から第五章では、熱や酸性化、酸化などのストレスに応じてシャペロンの転写制御を行う Hsf1 の状態変化の機構解明を目指して、まず第三章ではその多量体化機構を検討している。Hsf1 は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、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から、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) であることを示し、さらに LZ1-3 の環境変化を反映する Trp169 の蛍光の温度変化測定からは、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を見出した。一方、CD 測定と MD シミュレーションからは、昇温によって LZ4 が変性することが示され、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機構を提案している。これらの多量体化の機構は温度ストレスセンサーとしての Hsf1 の機能発現の分子機構を初めて明らかにした成果である。

第四章では、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、Hsf1 の構造変化を溶液 NMR 法と CD 測定により、その液滴形成を濁度測定と顕微鏡観察で追跡した結果、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を見出している。このような液滴形成は、細胞内で Hsf1 と相互作用する PPIase である FKBP52 によっても引き起こされることから、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も示唆している。このような液滴形成は、細胞内における高温、酸性化による液-液相分離の誘導とその制御機構の存在を示しており、細胞内におけるストレス応答機構として興味深い。

第五章では、細胞にさらにストレスが負荷され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を、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 法で追跡した結果、酸化環境でその相分離液滴の流動性は著しく低下し、ゲル状に相転移することを明らかにしている。このような相転移は、溶媒に露出したシステイン残基の変異で抑制されることから、酸化条件下での分子間のジスルフィド架橋によって形成される 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結論付けている。

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おり、本論文の結果から、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ことを提案している。

以上、本論文の内容は蛋白質の恒常性維持機構、特に変性蛋白質の立体構造回復機構やストレス応答機構について多くの新しい知見と提案を含むことから、その学術的意義が認められ、博士（理学）の授与に値すると判断する。