

氏名	さくらぎ きよゆり 櫻木小百合
学位(専攻分野)	博士(医学)
学位記番号	医博第2140号
学位授与の日付	平成11年5月24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	医学研究科病理系専攻
学位論文題目	Interaction between the nucleotide exchange factor Mge1 and mitochondrial Hsp 70 Ssc 1 (ミトコンドリア Hsp 70 Ssc 1 とヌクレオチド解離因子 Mge 1 の相互作用に関する研究)
論文調査委員	(主査) 教授 淀井淳司 教授 石本秋稔 教授 永田和宏

### 論文内容の要旨

Hsp 70 と呼ばれる分子量約 70 kDa の分子シャペロンは、蛋白質の折り畳みや膜透過というような細胞内でのプロセスを行うために非 native 型の蛋白質に結合する。C 末端の 28 kDa は非折り畳み型蛋白質に結合し、N 末端の 44 kDa は ATP と相互作用を行うことによりその結合を調節しており、弱い ATPase 活性を有する。

ヌクレオチド解離因子はある種の Hsp 70 系で必須である。近年、酵母のミトコンドリアに局在する Mge1 はミトコンドリアの HSP 70 である Ssc 1 からのヌクレオチドの放出を刺激することが示された。E. coli の GrpE は最初に見つけられたヌクレオチド解離因子であり、DnaK (Hsp 70) とともに働く。Mge 1 と GrpE は構造的に類似していることが示唆され、実際 Mge 1 は E. coli 内で、GrpE の代わりに働くことが可能である。

DnaK と GrpE の 6 箇所の結合部位のうち 1 か所は DnaK のループ上にある。このループは多種の Hsp 70 でよく保存されており、DnaK:GrpE や Ssc 1:Mge 1 の結合にとって重要であることが分かっている。Ssc 1 のループのメカニズムを明らかにするために、ループと結合する Mge 1 上の部位に変異体 (108 番目のリジンのアラニンへの置換変異体、213 番目のアルギニンのアラニンへの置換変異体、及び双方の置換を持つ変異体) を作成し、酵母細胞を用いてその解析を行った。その結果 K 108 A/R 213 A のみかすかに温度感受性を示した。さらに我々は GrpE を用いて Mge 1 の K 108 A, R 213 A 及び K 108 A/R 213 A に相当する変異体を作成し、E. coli で解析を行った結果、変異体は野生株と変わらない生育を示した。

その後、in vitro でいくつかの生化学的な解析を行った。野生型と変異体の蛋白質を精製し、single turnover で ATPase 活性の測定を行ったところ、K 108 A/R 213 A 変異体蛋白質は野生型と比べて Ssc 1 の ATPase 活性を刺激するのに 10 倍の濃度を要するということが分かった。次に我精製蛋白質を用いて、より複雑で生物学的なルシフェーゼの巻き戻りを DnaK, DnaJ (E. coli 由来の Hsp 40), Mge 1 の系を用いて調べた。その結果 K 108 A/R 213 A はルシフェーゼの巻き戻りを刺激することが出来るが、野生型と同程度に機能する為には野生型と比べて約 10 倍の濃度を要することが分かった。上記の結果より、変異体 Mge 1 は安定に Ssc 1 と結合することができない可能性が考えられた為、Ssc 1 と Mge 1 蛋白質の相互作用について in vitro の系を用いて調べた。野生型 Mge 1 は ATP を加えたときのみ Ssc 1 との複合体が壊れたが、K 108 A/R 213 A では複合体自体を形成することが出来なかった。さらに詳細に調べるために野生型もしくは変異体の Mge 1 を持つ精製ミトコンドリア内での Ssc 1 と Mge 1 の相互作用について検討した。その結果、野生株と異なり K 108 A/R 213 A は 37 度で Ssc 1 との結合が弱かった。

これらの結果より、Ssc 1 のループと Mge 1 との直接的な相互作用はヌクレオチドの効果的な放出には不要であるが、Mge 1:Ssc 1 の相互作用の安定化に関与していると考えられた。K 108 A/R 213 A MGE 1 変異体の生育が野生株と変わらないことは、in vivo より in vitro での機能に両蛋白質のより強い相互作用が求められることを示している。

## 論文審査の結果の要旨

ミトコンドリアに局在する Hsp 70 (Ssc 1) は、蛋白質のミトコンドリア膜透過に関与している。高等真核細胞のモデルとして酵母を用い、Ssc 1 とそのコ・シャペロン Mge 1 との相互作用を明らかにする目的で Mge 1 の結合領域 IV の変異株を作成した。K 108 A, R 213 A, および K 108 A/R 213 A を作成した結果、2 アミノ酸置換変異株のみが微かに温度感受性を示した。Mge 1 と変異体蛋白を用い Ssc 1 の ATPase 活性の活性化能を調べた結果、2 アミノ酸置換変異体は野生体の約 10 倍量の蛋白を要した。また、ルシフェラーゼの巻き戻し (refolding) の解析でも同様の結果を得た。これらの蛋白の結合能の差を *in vitro* と *in vivo* で調べた結果、2 アミノ酸置換変異体は著しく Ssc 1 に対する結合能を欠いていた。

これらの結果より両蛋白の結合領域 IV での結合は、ヌクレオチドの効果的な放出には不要であるが、結合の安定化に関与すると思われた。2 アミノ酸置換変異株が正常に近い生育を示すことは、*in vitro* での機能に両蛋白のよい強い相互作用が必要であることを示している。

以上の研究は普遍的な蛋白の輸送と折り畳みの機構の理解に貢献し、様々なミトコンドリアに関する疾病の解明に大きく寄与するものである。

したがって、本論文は博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成 11 年 3 月 16 日実施の論文内容とそれに関連した試問をうけ、合格と認められたものである。