

令和 3 年 4 月 19 日

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成 31 年度

受付番号 201960469

氏名 外山 侑樹

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地 (派遣先国名) 用務地: トロント (国名: カナダ)

2. 研究課題名 (和文) ※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。

熱ショック因子の温度感知機構の構造生物学的解明3. 派遣期間: 平成 31 年 4 月 1 日 ~ 令和 3 年 3 月 31 日

4. 受入機関名及び部局名

受入機関名: University of Toronto部局名: Departments of Molecular Genetics, Biochemistry and Chemistry5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意 (A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入も可)**

(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)

(注)「6. 研究発表」以降については様式 10-別紙 1~4 に記入の上、併せて提出すること。

1. 熱ショック因子タンパク質 (HSF1) の発現系と精製法の確立

本研究で研究対象とするタンパク質、熱ショック因子 1 (Heat Shock Factor, HSF1) は温度上昇を感知して DNA のプロモーター配列に結合し、分子シャペロンの転写誘導を促進することで、熱ショックに対する防御を司る転写因子である。HSF1 の温度依存的な構造変化、ならびに転写誘導活性の変化を *in vitro* で解析するうえで、HSF1 タンパク質を十分な収量、純度で取得する必要がある。

まず大腸菌タンパク質発現系を用いた HSF1 全長タンパク質の大量発現、ならびに精製法を確立することを目指した。ヒト由来 HSF1 タンパク質は Uniprot データベース (ID: Q00613) から取得したアミノ酸配列をもとに、大腸菌のコドン使用頻度に最適化した DNA 配列をデザインし、人口遺伝子合成により合成された DNA を取得した。HSF1 全長 DNA を含む発現ベクター pET-SUMO (Invitrogen) を大腸菌株 BL21 (DE3) に形質転換し、N 末端 SUMO (small ubiquitin-related modifier) 融合タンパク質として大量発現を行った。発現タンパク質は、Ni-NTA アガロース担体を用いたアフィニティ精製、Ulp1 プロテアーゼによるタグの切断、そして Superdex 200 16/600 カラムを用いたゲルろ過クロマトグラフィーにより精製を行った。ゲルろ過クロマトグラフィーの結果、HSF1 タンパク質は主に溶出体積の異なる 2 つのピークに分離して溶出していることが分かった。先行研究 (Hentze *et al.*, *eLife* 2016; 5:e11576) の解析結果を参考に、高分子量側のピークは HSF1 2 量体、低分子量側のピークは HSF1 単量体に該当すると判断した (図 1A)。また各ピークの SDS-PAGE 解析により、HSF1 タンパク質を十分な純度で精製することができたと判断した (図 1B)。ピーク体積の比較からおよそ 2 量体と単量体はおよそ 4:1 の存在比であることが示唆された。生体内において不活性化状態は単量体状態、もしくは 2 量体であると報告されているため、調製した HSF1 は不活性化状態であると判断した。

HSF1 は単量体、2 量体の不活性化状態から熱ショック依存的に 3 量体を形成することで活性化状態となり、DNA 結合能を獲得することで転写活性化を引き起こすと考えられている。そこで、精製した HSF1

全長タンパク質が熱ショック依存的な多量体化状態の変化を示すかどうかを、ゲルろ過クロマトグラフィー解析により検討した。調製した HSF1 の 2 量体画分を用いて、生理的な活性化を誘起する 42°C で 10 分、20 分、30 分インキュベートしたのち、HSF1 の多量体化状態をゲルろ過クロマトグラフィーにより解析した。その結果、インキュベート時間依存的に溶出体積は高分子量側に変化し、熱ショック依存的に 3 量体、もしくはそれ以上の多量体を形成していることが分かった。この結果は、調製した HSF1 が熱ショックを感知し、多量体化する活性を有していることを確認した (図 1C)。

さらに、HSF1 全長タンパク質は 529 残基であること、また NMR で解析するうえで化学シフト値の分散が小さい天然変性領域を多く含むことから、シグナルの縮重によって NMR シグナル帰属や残基特異的な解析が困難になることが予想された。これを解消するために、HSF1 配列中のなかでも熱ショック感受性を担うコイルドコイル領域 (HSF1cc, 残基番号 126-411) のみを切り出したタンパク質をデザインした。HSF1cc は全長タンパク質と同様に発現、精製を行い、ゲルろ過クロマトグラフィーによる解析から 2 量体以上の多量体化状態を形成しうることを確認した。NMR による HSF1cc のシグナルの帰属とタンパク質主鎖炭素 ^{13}C 、窒素 ^{15}N 化学シフト値に基づく 2 次構造解析、さらに残基間近接情報に基づいた 3 次構造解析に着手しており、論文発表の準備を進めている。

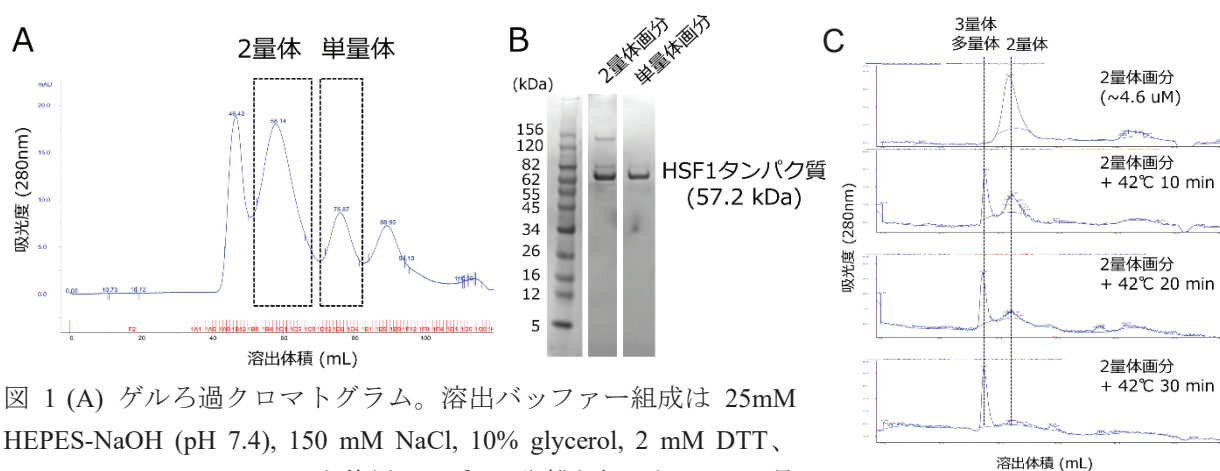


図 1 (A) ゲルろ過クロマトグラム。溶出バッファー組成は 25mM HEPES-NaOH (pH 7.4), 150 mM NaCl, 10% glycerol, 2 mM DTT、Superdex200 16/600 カラムを使用し、4°C で分離を行った。(B) 2 量体画分、単量体画分の SDS-PAGE 解析結果。2 量体画分、単量体画分に HSF1 タンパク質が溶出していること、十分な純度で精製できたことを確認した。(C) 熱ショック依存的な HSF1 溶出体積の変化。ゲルろ過クロマトグラム。溶出バッファー組成は 25mM HEPES-NaOH (pH 7.4), 150 mM NaCl, 10% glycerol, 2 mM DTT、Superdex200 10/300 カラムを使用し、室温で分離を行った。

2. NMR による多量体タンパク質-リガンド相互作用解析のための理論的枠組みの確立

HSF1 タンパク質は活性化状態においては 3 量体として存在することから、HSF1 タンパク質と DNA プロモーター配列、HSF1 と各種アダプタータンパク質、ならびに後述するような HSF1 の分解に関与するプロテアーゼタンパク質との相互作用は、単量体に対する相互作用と比べてより多くの熱力学定数を含む複雑な結合モデルを考慮する必要がある。これまで等温滴定カロリーメトリーなどの手法においては、このような多量体タンパク質に対する段階的な結合を記述する理論が確立していたものの、NMR を用いて解析する理論的枠組みは十分に確立していなかった。この理由として、NMR においては、核スピンは微視的な化学環境の違いを反映し、多量体を構成する各サブユニット (プロトマー) は NMR スペクトル上で異なる化学シフトを与えうるという特徴のために、等温滴定カロリーメトリーなどで一般的に用いられる手法をそのまま適用することが困難であることが挙げられる。

そこで、HSF1 のような多量体タンパク質に対する段階的なリガンド結合反応を NMR により解析するための理論的枠組みを確立することとした。詳細は原著論文にて発表済みであるが、ここでは HSF1 のようなホモ 3 量体タンパク質に対する結合を例として概説する。リガンド分子がホモ 3 量体の各プロトマーに一分子ずつ段階的に結合するとき、非結合状態 (P_3)、1, 2, 3 分子のリガンドが結合した状態 (それぞれ P_3L , P_3L_2 , P_3L_3) の 4 状態を取りうる。このとき各状態のモル濃度は、1, 2, 3 段階目の巨視的結合定数を $K_{\text{mac},i}$ ($\{i \in 1, 2, 3\}$)、微視的結合定数を K 、そして 1, 2, 3 段階目のリガンド結合の協同性を示す協同性因子 α_i ($\{i \in 2, 3\}$) を用いて以下の方程式群を解くことによって計算することが可能である。このとき P_T ,

L_T は系中に存在する総タンパク質、総リガンド濃度を表し、 $[L]$ は遊離リガンド濃度を表す。

$$\begin{aligned}
P_3 + L &\rightleftharpoons P_3L & K_{mac,1} = \frac{[P_3L]}{[P_3][L]} = 3K & [P_3L] = 3K[P_3][L] \\
P_3L + L &\rightleftharpoons P_3L_2 & K_{mac,2} = \frac{[P_3L_2]}{[P_3L][L]} = \alpha_2K & [P_3L_2] = 3\alpha_2K^2[P_3][L]^2 \\
P_3L_2 + L &\rightleftharpoons P_3L_3 & K_{mac,3} = \frac{[P_3L_3]}{[P_3L_2][L]} = \frac{1}{3}\alpha_3K & [P_3L_3] = \alpha_2\alpha_3K^3[P_3][L]^3 \\
P_T &= [P_3] + [P_3L] + [P_3L_2] + [P_3L_3] \\
&= [P_3](1 + 3K[L] + 3\alpha_2K^2[L]^2 + \alpha_2\alpha_3K^3[L]^3) \\
L_T &= [L] + [P_3L] + 2[P_3L_2] + 3[P_3L_3] \\
&= [L] + 3K[P_3][L] + 6\alpha_2K^2[P_3][L]^2 + 3\alpha_2\alpha_3K^3[P_3][L]^3
\end{aligned}$$

このとき NMR シグナルが各プロトマーにおける微視的環境の結合、非結合状態のみを反映すると仮定した場合、NMR 磁化としては 6 種類の異なる磁化項 $M_{k,l}$ ($k \in U, B, l \in P_3, P_3L, P_3L_2, P_3L_3$ (k は微視的な結合、非結合状態、 l は観測する核スピンの存在するプロトマーのリガンド結合状態を表す) を含み、これら 6 種類の磁化項の存在割合 $p_{k,l}$ ($k \in U, B, l \in P_3, P_3L, P_3L_2, P_3L_3$) は以下の式により定義される。

$$\begin{aligned}
&\{p_{U,P_3}, p_{U,P_3L}, p_{U,P_3L_2}, p_{B,P_3L}, p_{B,P_3L_2}, p_{B,P_3L_3}\} \\
&= \frac{1}{3P_T} (3[P_3], 2[P_3L], [P_3L_2], [P_3L], 2[P_3L_2], 3[P_3L_3])
\end{aligned}$$

微視的な結合状態、非結合状態の交換速度が両状態の化学シフト値 (ω_U, ω_B) の差よりも十分に小さい場合には、異なる 2 つのシグナルが観測され、それぞれのシグナル強度比は下記の式によって示される。

$$\begin{aligned}
I_{(U,P_3)+(U,P_3L)+(U,P_3L_2)} &= a'(3[P_3] + 2[P_3L] + [P_3L_2]), \quad (\omega_U) \\
I_{(B,P_3L)+(B,P_3L_2)+(B,P_3L_3)} &= b'([P_3L] + 2[P_3L_2] + 3[P_3L_3]), \quad (\omega_B)
\end{aligned}$$

一方、交換速度が十分に速い場合は 2 状態のシグナルは平均化され、見かけの化学シフト値 ω_{obs} は以下の式で表せられる。

$$\omega_{obs} = (p_{U,P_3} + p_{U,P_3L} + p_{U,P_3L_2})\omega_U + (p_{B,P_3L} + p_{B,P_3L_2} + p_{B,P_3L_3})\omega_B$$

以上より、様々なリガンド濃度で測定した際の見かけの非結合状態、結合状態のシグナル強度、もしくは見かけの化学シフト変化を上式にフィッティングすることにより、段階的なリガンド結合反応を定量的に解析することが可能となる。ここまでは、熱力学的なパラメーターの算出について述べたが、速度論パラメーターも同様に議論することが可能である。

以上の結果は原著論文として *Journal of Magnetic Resonance* 誌 (Harkness, **Toyama**, and Kay, *Journal of Magnetic Resonance* 318, 106802, 2020) に共筆頭、共責任著者として発表した。

3. HSF1 に共役した下流のエフェクター因子の活性化機構の解析

HSF1 の熱ショック依存的な活性化機構を理解するうえで、HSF1 分子の熱ショック依存的な構造変化に加え、HSF1 により転写活性化を受ける下流のエフェクター因子の活性化の分子機構を理解することが、本シグナル経路の生理的な役割を包括的に理解するうえで重要であると考えた。そこで、HSF1 の転写活性化を受けることが報告されており (Liu et al., *Aging (Albany NY)*, 11(20): 8982, 2019)、またその分子の活性が熱ショック依存的に変化する分子として HtrA2 (High temperature requirement A2) プロテアーゼに着目した解析にも着手することとした。HtrA2 は結晶構造解析から酵素活性部位を有するプロテアーゼドメインと基質結合に関与する PDZ ドメインからなるサブユニットが 3 量体を形成することが知られている (図 3A)。この 3 量体構造は活性部位が PDZ ドメインにより覆われた不活性化状態であることが提唱されているが、活性化に伴いどのような構造、運動性の変化が生じるか詳細な分子機構は明らかとなっていない。これを明らかとするうえで、溶液中においてタンパク質の動的構造の変化を検出できる核磁気共鳴 (NMR) 法による解析が有効であると考えた。

ヒト由来 HtrA2 タンパク質は Uniprot データベース (ID: O43464) から取得したアミノ酸配列をもとに、大腸菌のコドン使用頻度に最適化した DNA を調製し、HtrA2 遺伝子配列を含む発現ベクターを大腸菌株

BL21 (DE3) に形質転換し、N 末端 SUMO (small ubiquitin-related modifier) 融合タンパク質として大量発現を行った。菌体を超音波破碎後、Ni-NTA アガロース担体を用いたアフィニティ精製、Ulp1 プロテアーゼによる SUMO タグの切断、Phenyl Sepharose 担体を用いた疎水性相互作用クロマトグラフィー、Superdex 200 16/600 カラムを用いたゲルろ過クロマトグラフィーにより精製を行った。また、NMR による解析には、均一重水素化、Ile, Leu, Val, Met 側鎖メチル基を選択的に ^1H - ^{13}C 標識したタンパク質を用いた。

HtrA2 の ^1H - ^{13}C heteronuclear multi-quantum coherence (HMQC) スペクトルを取得し、各メチル基の変異体とのスペクトルの比較、ならびに nuclear Overhauser effect によるメチル基間近接情報をもとにシグナルの帰属を行った。一部のメチル基は HMQC スペクトル上に複数のシグナルを与え、HtrA2 濃度依存性の解析から、これらのシグナル多型はこれまでに未同定であった 6 量体と、既知の 3 量体との間の平衡に起因していることが分かった。NMR 化学シフト変化部位、変異体解析、そして X 線小角散乱 (SAXS) を統合した解析から、6 量体状態のモデル構造を明らかにすることに成功した (図 3A)。6 量体構造は PDZ ドメイン同士が会合した樽状の構造であることが分かった。

また、PDZ ドメインに結合する 8 残基のペプチド (DD-PDZopt) の滴定実験から、項目 2 において確立した理論を応用することで、ペプチドリガンドの段階的な結合の各結合定数を定量的に算出することに成功した (図 3B)。そして得られた熱力学モデルから、HtrA2 の 6 量体状態はペプチドリガンドが結合できない自己疎外状態であること、そして 3 量体に対するペプチド結合反応は段階的に生じ、各結合段階に正の協同性が存在すること、またペプチドリガンド結合状態はプロテアーゼドメインと PDZ ドメインが解離した開いた構造を形成していることを明らかとした (図 3C)。以上の結果は原著論文として『米国科学アカデミー紀要』 (Toyama et al., *PNAS* 118 (11), e2025022118, 2021) に共筆頭、共責任著者として発表した。さらに、HSF1cc と HtrA2 の相互作用に着目した解析も行い、野生型 HtrA2 を用いたタンパク質分解アッセイの結果から、HSF1cc は HtrA2 により効率的に分解されることが明らかとなった。本結果は HSF1 の発現量レベルが HtrA2 の活性に制御されていることを強く示唆するものであり、現在投稿論文の準備を進めている。

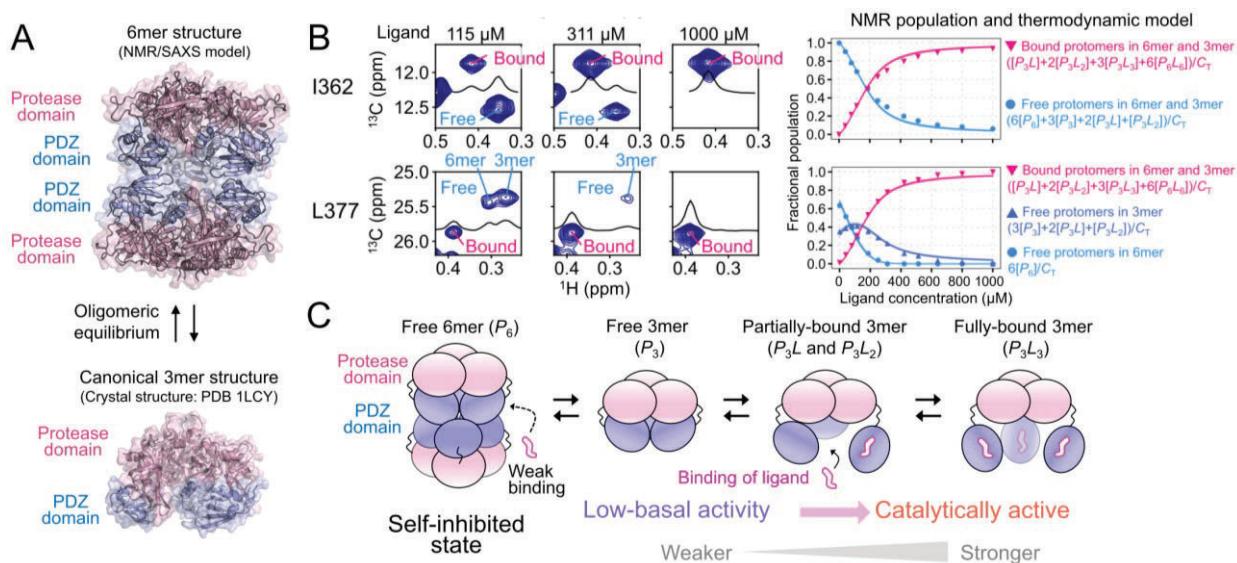


図 3 (A) HtrA2 の 3 量体の結晶構造 (PDB ID: 1LCY) と本研究より明らかとなった 6 量体の NMR/SAXS モデル構造。 (B) 異なる濃度の DD-PDZopt ペプチド存在下における HtrA2 ^1H - ^{13}C HMQC スペクトルの比較、Ile362, Leu377, Met420 領域の拡大図を示した。右には各状態のシグナル強度のリガンド濃度に対するプロットを示し、フィッティングの結果を実線にて示した。 (C) 本研究から明らかとなった HtrA2 の活性化モデル。