

計算科学的に解明する核輸送受容体 Hikeshi と Hsc70 の熱依存的な結合メカニズム

渡辺 樹来（筑波大学生物学類）

指導教員：原田 隆平（筑波大学計算科学研究センター）

【背景・目的】

ストレス応答は細胞の生存において必要不可欠の機能であり、シャペロン Hsc70 は熱ショック応答を担うタンパク質の一つである。Hsc70 は定常状態で細胞質に存在するが、熱ショック時に核内に局在し、下流の熱ショック転写因子などに作用する。一般的に核内に輸送されるタンパク質の多くはインポートンによって輸送されるが、インポートンは熱ショック時にその機能が低下する。そのため Hikeshi と呼ばれる核輸送受容体が熱ショック時に Hsc70 を核内へ輸送する。[1]

Hsc70 の輸送体である Hikeshi は熱ショックからの回復に必要なタンパク質であり、Hikeshi が欠損した細胞では熱ショック後の生存率が低くなる。これまでの先行研究から、Hikeshi は単独で核内に移行可能であり、定常状態では核に局在している。Hikeshi は熱ショックで発現量が増えることが明らかにされており、Hsc70 の核局在は Hikeshi の量が増えることによって起こると考えられていた。しかし近年、Hikeshi は熱依存的に Hsc70 との結合活性が上昇することが報告された（図1）。[2] これにより、熱依存的に Hikeshi-Hsc70 が結合することが実験的に明らかとなったが、そのメカニズムは未解明である。そこで、本研究では Hikeshi が熱依存的に Hsc70 との結合活性が上昇するメカニズムの解明を目的とした。

Hikeshi は高温で Hsc70 との結合活性が

上昇するが、変異体(F97A)では常温で結合活性が上昇することが実験的に明らかになっている。野生型(WT)の結晶構造では E ループに位置する残基が疎水性ポケットに埋もれてループ領域がクローズド状態である。一方、F97A の結晶構造は E ループの構造が決定されていないため [3]、F97A の E ループはオープン状態であると考えられる。これらにより、Hikeshi-Hsc70 の結合活性の上昇は E ループの開閉が原因であるという仮説を立てた。本研究では、本仮説を立証するため分子動力学シミュレーション (MD) を用いて結合活性上昇のメカニズムを調査した。

【方法】

本研究ではタンパク質の構造変化を追跡できる計算科学的手法である MD を用いた。MD は分子構造を構成する原子座標を利用して、原子の位置や速度、原子に作用する力を計算する手順を繰り返すことで、分子構造の時間変化を追跡できる。

Hikeshi の結晶構造では一部の構造が欠損していたため、初期構造として AlphaFold2(AF2) を用いてヒト Hikeshi のアミノ酸配列から予測したモデル構造を用いた。F97A の初期構造は可視化ソフト (PyMOL) を用いて AF2 の予測モデルに変異を加え、作成した。最終的に、WT (300 K)、WT (400 K)、F97A (300 K) の計算条件でそれぞれ 1 μ s の MD を実行し、WT (常温、高温)、F97A において E ループが示す構造動態を調査し

た。ここで、E ループの開閉の判別には E ループに位置する残基 (F97) と疎水性ポケットに位置する残基 (W67) に着目し、それらの残基間距離を用いた。

次に E ループが Hsc70 と結合するかを調査した。先行研究より、Hsc70 が基質として認識する配列は 7 残基程度とされている。[4] そのため、7 残基になるよう E ループを 5 つの window に分割し、分割領域と Hsc70 の複合体を AF2 で予測した。また、E ループの結合性を比較するためそのコントロールとして、Hsc70 のモデル基質である NR ペプチド、ポリセリンとの複合体も同様に AF2 で予測した。

【結果・考察】

熱依存的な結合活性の上昇メカニズムを明らかにするため 2 つの調査を行なった。1 つ目は F97A と高温環境における WT がオープン状態を取りやすいかを、2 つ目は E ループは Hsc70 と結合するかを検証した。

1 つ目の調査では、WT と F97A について、常温、高温における E ループの開閉を比較した。その結果、常温における WT と比較して、高温と F97A では E ループと疎水性ポケットとの距離が大きくなることが分かった。この結果から、Hikeshi は高温、または F97A において E ループがオープン状態を取りやすいことが示唆された。

2 つ目の調査では、E ループ、NR ペプチド、ポリセリンと Hsc70 からなる複合体の妥当性を AF2 が出力する iPTM Score により評価した。予測精度を比較したところ、Hikeshi の E ループの後半部分と結合した複合体が高い精度 (0.84) を示し、NR ペプチドのスコア (0.85) と類似していた。これにより、E ループは Hsc70 と複合体を形成し、特に E ループの後半部分と結合しやすいということが示唆された。

以上の結果から、温度依存的な結合活性の上昇は Hikeshi の E ループがオープン状態に変化することで Hsc70 と結合し、複合体の形成が引き起こされると示唆される（図2）。

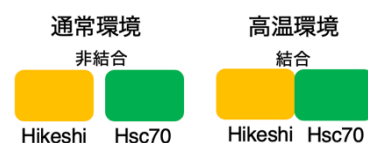


図1. Hikeshi-Hsc70 の結合様式



図2. 本研究から示唆される Hikeshi-Hsc70 結合メカニズム

【参考文献】

1. Kose S et al. *Cell*, **149**, 578-89 (2012).
2. Kose S et al. *Genes. Cells*, **29**, 782-791 (2024).
3. Song J et al. *Acta. Cryst. D*, **71**, 473-83 (2015).
4. Clerico EM et al. *J. Mol. Biol.*, **427**, 1575-88 (2015).