

科学研究費補助金研究成果報告書

平成25年5月30日現在

機関番号：12608
 研究種目：特定領域研究
 研究期間：2007～2011
 課題番号：19058002
 研究課題名（和文） プリオンなどの構造多形と機能発現システムの再構築
 研究課題名（英文） Reconstitution of prions and protein folding

研究代表者 田口 英樹 (Taguchi Hideki)
 東京工業大学・大学院生命理工学研究科・教授
 研究者番号：40272710

研究成果の概要（和文）：

タンパク質が細胞内で機能を発現するためには正しい立体構造にフォールディングしなければならない。その一方で、フォールディングしたタンパク質は状況によってはプリオンやアミロイドといった異常な構造を形成してしまう。本研究では、いかにタンパク質が正しくフォールディングするのか（タンパク質機能発現システムの再構築）とプリオンの形成機構（プリオンなどの構造多形）について1分子レベルから遺伝学にいたるまでの幅広いアプローチにて研究を推進した。

研究成果の概要（英文）：Protein must fold into unique tertiary structure to achieve its function. However, the folding often competes with intermolecular aggregation, which usually spoils the protein function. Protein aggregates include prions and amyloids, both of which cause fatal neurodegenerative diseases. We investigated following topics; 1) comprehensive aggregation analysis of more than 3,000 Escherichia coli proteins by using a reconstituted chaperone-free translation system, ii) global analysis of chaperone effects, iii) identification of in vivo chaperonin substrates, and iv) in vivo structure and dynamics of yeast prions.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	18,900,000	0	18,900,000
2008年度	18,900,000	0	18,900,000
2009年度	18,900,000	0	18,900,000
2010年度	18,900,000	0	18,900,000
2011年度	18,900,000	0	18,900,000
総計	94,500,000	0	94,500,000

研究分野：基礎生物学

科研費の分科・細目：機能生物学

キーワード：タンパク質・フォールディング、シャペロン、酵母プリオン、

1. 研究開始当初の背景

本研究では、「タンパク質社会」の理解に向けて以下の二つのテーマを分担する。

(1) プリオンを含むタンパク質の構造多形の生物学的意義の解明

「アミノ酸配列が立体構造を唯一規定する」という Anfinsen のドグマはタンパク質科学

の根幹をなす基本原理と考えられているが、プリオンやアミロイドのような秩序を持った凝集（線維）に構造転換する場合や、そもそも特定の立体構造を持ちえない天然変性タンパク質（ドメイン）のような「構造多形」がタンパク質全体を理解する上で極めて重要なことがわかってきた。特にアミロイドやプリオンは哺乳類の神経変性疾患の研究からわかってきたものであり、タンパク質フォールディングの秩序維持機構の破綻が疾病につながるという考え方の基礎となっている。このような重要な問題でありながら、これらタンパク質の構造多形に関して多くの問題が手つかずのままである。例えば、プリオンが細胞内でどのような実体にて増殖していくのか、というような問題は本質的であるが、まったく不明である。そのような背景の下、我々は出芽酵母内での酵母プリオンタンパク質 Sup35 の動態を蛍光相関分光法（FCS）で解析する方法を確立した（Kawai-Noma et al., *Genes Cells* 2006）

（2）構成的アプローチによるタンパク質機能発現システムの再構築

タンパク質の機能発現の源はリボソームでのタンパク質合成反応にある。この反応を試験管内で詳細に調べようと思っても、通常は細胞抽出液を用いるために、たとえば、種々のシャペロンの役割分担はどうなっているのか、というようなことは調べようがなかった。しかし、最近実用化されている必須因子のみからなる無細胞タンパク質合成系（PURE システム）ではシャペロンが含まれておらず、これまでに我々は大腸菌の生育に必須のシャペロンであるシャペロニン GroEL が翻訳時のフォールディングにどのような作用を及ぼすのか調べはじめている（Ying et al., *JBC* 2005, 2006）。

さらに、細胞内での GroEL の基質タンパク質候補が絞られてきたが、我々の研究からその基質タンパク質が GroEL の発現を抑制した大腸菌でもフォールディングできること、すなわち GroEL の真の基質タンパク質ではないことを示唆する結果を得た（Fujiwara et al., *J. Bacteriol.* 2007）。

2. 研究の目的

（1）プリオンを含むタンパク質の構造多形の生物学的意義の解明

本研究では、我々のこれまでの酵母プリオンでの実績を背景として、プリオンなどのタンパク質の構造多形が細胞内のタンパク質社会の中でどのような実体で存在し、どのような役割を担っているのか、さまざまなアプローチで調べることを目的とする。

（2）構成的アプローチによるタンパク質機能発現システムの再構築

本研究では、PURE システムを使った翻訳に共役したフォールディング研究をさらに拡張し、より網羅的な解析を推進すると、細胞内での GroEL の基質タンパク質を明確にすることを目的とする。

3. 研究の方法

（1）プリオンを含むタンパク質の構造多形の生物学的意義の解明

FCS や 1 粒子追跡法を駆使して酵母プリオンの伝播機構を明確にする。細胞内でのプリオン凝集の構造を電子顕微鏡などで明らかにする。

（2）タンパク質機能発現システムの再構築

PURE システムで大腸菌の全タンパク質を個別に発現し、それらの凝集性やシャペロンの効果について網羅的に解析する。質量分析と遺伝学を組み合わせることで大腸菌 GroEL の基質タンパク質を同定する。

4. 研究成果

（1）プリオンを含むタンパク質の構造多形の生物学的意義の解明

本研究課題において我々は、酵母プリオンやポリグルタミンをモデルとしてアミロイド構造の細胞内での構造や伝播機構について研究を進めた。研究期間内に、酵母プリオン伝播に必須の役割を果たしている Hsp104 の役割の解明、細胞内でのアミロイドの構造（図 1、Kawai-Noma ら *J. Cell Biol.* 2010）、細胞内でのプリオンタンパク質の 1 分子追跡法の開発などを行った。

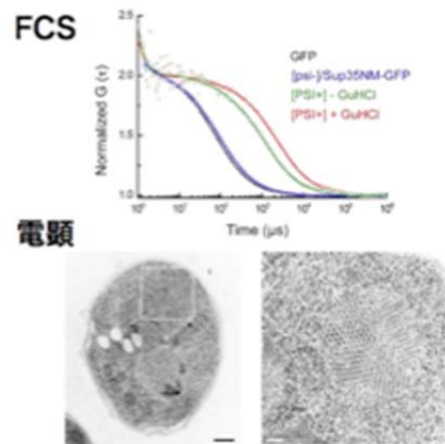


図 1 酵母プリオンの細胞内動態と構造

（2）タンパク質機能発現システムの再構築
タンパク質のフォールディングは常に凝集体形成の危機にさらされている。生体高分子でひしめいている細胞内で凝集体形成がいかに抑制されているかを解明することが「タンパク質の社会」の理解には必須である。本研究課題では、再構築型の無細胞翻訳系を用いた凝集体形成アッセイ、凝集を抑えてフォー

ルディングを助けるシャペロンの役割、について研究を進めた。

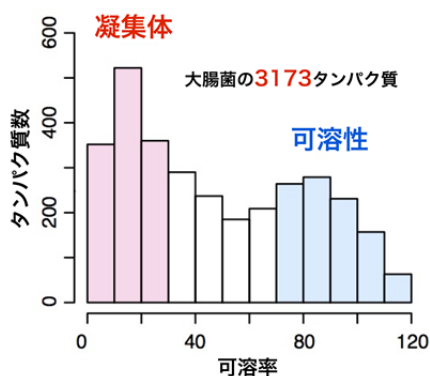


図2 網羅的なタンパク質凝集解析

無細胞翻訳系による研究では、大腸菌の全タンパク質の凝集形成のしやすさ (図2 丹羽ら PNAS2009)、さらに GroEL や DnaK などのシャペロンを加えたときにどのタンパク質の凝集が抑制されるかについて大規模な解析 (図3 丹羽ら PNAS2012) を行った。これらの結果により、タンパク質の一次配列や立体構造と凝集しやすさの相関やシャペロン間の役割分担について新たな知見を得た。

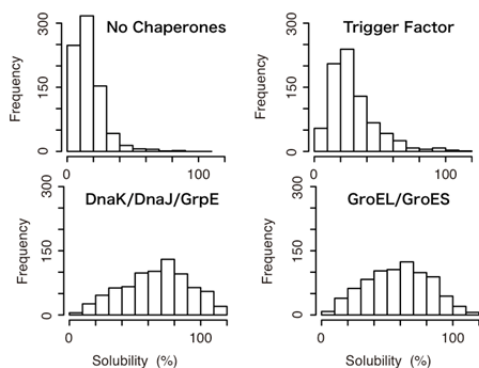


図3 シャペロン効果の網羅的な解析

細胞の生育に必須のシャペロンであるシャペロニン GroEL の細胞内における基質タンパク質を同定し、その性質を明らかにした (図4 藤原ら EMBO J. 2010)。

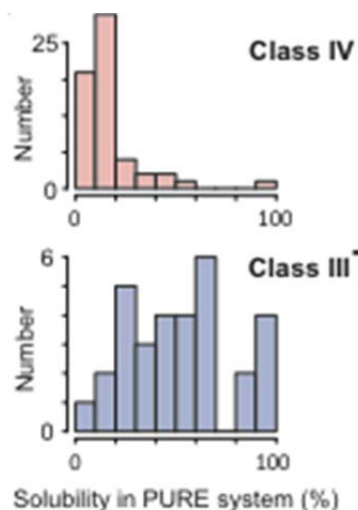


図4 GroEL 基質タンパク質の可溶性分布

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 22 件) 全て査読有り

1. Biswas, S., Kinbara, K., Niwa, T., Taguchi, H., Ishii, N., Watanabe, S., Miyata, K., Kataoka, K., Aida, T.*, Biomolecular Robotics for Chemomechanically Driven Guest Delivery Fueled by Intracellular ATP. Nature Chemistry (2013) published online 2 June 2013
2. Nojima, T.*, Konno, H., Kodera, N., Seio, K., Taguchi, H. and Yoshida, M. Nano-scale alignment of proteins on a flexible DNA back-bone. PLoS One 7, e52534 (2012)
3. Nojima, T., Ikegami, T., Taguchi, H. and Yoshida, M.*, Flexibility of GroES mobile loop is required for efficient chaperonin function, J. Mol. Biol. 422, 291-299 (2012)
4. Niwa, T., Kanamori T., Ueda, T.*, Taguchi, H.*, Global Analysis of Chaperone Effects Using a Reconstituted Cell-Free Translation System, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 109, 8937-8942 (2012)
5. Fujiwara K*, Taguchi, H., Mechanism of methionine synthase overexpression in chaperonin-depleted Escherichia coli, Microbiology 158, 917-924 (2012)
6. Takemoto K*, Niwa T, Taguchi, H., Difference in the distribution pattern of substrate enzymes in the metabolic network of Escherichia coli, according to chaperonin requirement., BMC Syst

- Biol. 5, 98 (2011)
7. Sasaki, Y, Asayama, W., Niwa, T., Sawada, S., Ueda, T., Taguchi, H., Akiyoshi, K. *, Amphiphilic Polysaccharide Nanogels as Artificial Chaperones in Cell-Free Protein Synthesis. *Macromol. Biosci.* 11, 814-820 (2011)
 8. Inoue, Y., Kawai-Noma, S., Koike-Takeshita, A., Taguchi, H. and Yoshida, M. *, Yeast prion protein New1 can break Sup35 amyloid fibrils into fragments in an ATP-dependent manner. *Genes to Cells* 16, 545-556 (2011)
 9. Tsuji, T., Kawai-Noma, S., Pack, C-G., Terajima, H., Yajima, J., Nishizaka, T., Kinjo, M. & Taguchi, H. *, Single-particle tracking of quantum dot-conjugated prion proteins inside yeast cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 405, 638-643 (2011)
 10. Zhou, Z-P., Shimizu, Y., Tadakuma, H. *, Taguchi, H., Ito, K. and Ueda, T., Single molecule imaging of the trans-translation entry process via anchoring of the tagged ribosome. *J. Biochem.* 149, 609-618 (2011)
 11. Kawai-Noma, S., Pack, C-G., Kojidani, T., Asakawa, H., Hiraoka, Y., Kinjo, M., Haraguchi, T., Taguchi, H. *, and Hirata, A. In vivo evidence for the fibrillar structures of Sup35 prions in yeast cells. *J. Cell Biol.* 190, 223-231 (2010)
 12. Fujiwara, K., Ishihama, Y., Nakahigashi, K., Soga, T. and Taguchi, H. *, A systematic survey of in vivo obligate chaperonin-dependent substrates. *EMBO J.* 29, 1552-1564 (2010)
 13. Taguchi, H. * and Kawai-Noma, S., Diffuse oligomer-based transmission of yeast prions. (Review) *FEBS J.* 277, 1359-1368 (2010)
 14. Kubota, H., Mikhailenko, S. V., Okabe, H., Taguchi, H., and Ishiwata, S. *, D-loop of actin differently regulates the motor function of myosins II And V. *J. Biol. Chem.* 284, 35251-35258 (2009)
 15. Kawai-Noma, S., Pack, C-G., Tsuji, T., Kinjo, M., Taguchi, H. *, Single mother-daughter pair analysis to analyze the diffusion properties of yeast prion Sup35 in guanidine-HCl treated [PSI+] cells. *Genes to Cells*, 14, 1045-1054 (2009)
 16. Biswas, S., Kinbara, K., Oya, N., Ishii, N., Taguchi, H., Aida, T. *, A tubular biocontainer: Metal ion-induced 1D assembly of a molecularly engineered chaperonin. *J. Am. Chem. Soc.* 131, 7556-7557 (2009)
 17. Niwa, T., Ying, B.-W., Saito, K., Jin, W. Z., Takada, S., Ueda, T. Taguchi, H. *, Bimodal protein solubility distribution revealed by an aggregation analysis of the entire ensemble of Escherichia coli proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 4201-4206 (2009)
 18. Kanno, R., Koike-Takeshita, A., Yokoyama, K., Taguchi, H., Mitsuoka, K. *, Cryo-EM structure of the native GroEL-GroES complex from *Thermus thermophilus* encapsulating substrate inside the cavity. *Structure* 17, 287-293 (2009)
 19. Hosono, K., Ueno, T., Taguchi, H., Motojima, F., Zako, T., Yoshida, M., Funatsu, T. *, Kinetic analysis of conformational changes of GroEL based on the fluorescence of tyrosine 506. *Protein J.* 27, 461-468 (2008)
 20. Koike-Takeshita, A., Yoshida, M., Taguchi, H. *, Revisiting the GroEL-GroES reaction cycle via the symmetrical intermediate implied by novel aspects of the GroEL (D398A) mutant. *J. Biol. Chem.* 283, 23774-23781 (2008)
 21. Uemura, S., Iizuka, R., Ueno, T., Shimizu, Y., Taguchi, H., Ueda, T., Puglisi, J., Funatsu, T. *, Single molecule imaging of full protein synthesis by immobilized ribosomes. *Nucleic Acids Research* 36, e70 (2008)
 22. Asayama, W., Sawada, S., Taguchi, H., Akiyoshi, K. *, Comparison of refolding activities between nanogel artificial chaperone and GroEL systems, *Int. J. Biol. Macromol.* 42, 241-246 (2008)
- [学会発表] (計 9 件) 招待された国際会議に限る。
- (1) Hideki Taguchi: In vivo structure and dynamics of yeast prion protein. SPIE 2013: Nano-Bio Sensing, Imaging & Spectroscopy, 2013. 2. 20-22 Jeju-do, Korea
 - (2) Hideki Taguchi, Global analyses of protein aggregation and chaperone effects. SFB 3rd International symposium "Molecular Machines in Protein Folding and Protein Transport" 2012年7月23日~25日, Munich, Germany
 - (3) Hideki Taguchi, Global analysis of

chaperone action using a reconstituted cell-free translation system, EMBO Conference “The Biology of Molecular Chaperones” : 2011年5月19日～24日 Grundlsee, Austria

- (4) Hideki Taguchi, A systematic survey of in vivo obligate chaperonin GroE-dependent substrates, 3rd International Symposium on Protein Society : 2010年9月13日～16日 ホテル日航奈良、奈良
- (5) Hideki Taguchi, A comprehensive survey of in vivo obligate GroEL/ES substrates, 4th International Congress on Stress Responses in Biology and Medicine, Symposium “From chaperones to Translocators” 2009.10.6-9、札幌
- (6) Hideki Taguchi, Bimodal protein solubility distribution revealed by an aggregation analysis of the entire ensemble of Escherichia coli proteins, EMBO Conference “The Biology of Molecular Chaperones” : 2009年5月23日～28日 Dubrovnik, Croatia
- (7) Hideki Taguchi, Mechanism of yeast prion propagation revealed by direct observation of prion protein dynamics, International Conference “Protein Folding and Neurodegenerative Diseases” : 2009年4月6日～7日 平安会館、京都
- (8) Hideki Taguchi, Direct observation of yeast prion dynamics in single-living cells 2nd Pacific Rim International Conference on Protein Science : 2008年6月22日～26日 Cairns convention centre, Cairns, Australia
- (9) Hideki Taguchi, Direct observation of

yeast prion Sup35 dynamics in single-living cells, Cold Spring Harbor Laboratory meeting on Molecular Chaperones and Stress Responses, 2008年4月30日～5月4日 Cold Spring Harbor Laboratory, New York, USA

〔図書〕(計1件)

1. 「キーワード：蛋白質の一生」 編集・遠藤斗志也、小椋光、永田和宏、森 和俊、田口 英樹、吉田 賢右 (共立出版) (2008)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等

大腸菌蛋白質可溶性データベース : eSol

<http://www.tanpaku.org/tp-esol>

田口研究室ウェブサイト

<http://www.taguchi.bio.titech.ac.jp>

田口英樹の補足情報

<http://taguchi-hideki.blogspot.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田口 英樹 (Taguchi Hideki)

東京工業大学・大学院生命理工学研究科・教授

研究者番号 : 40272710

(2) 研究分担者

小池 あゆみ (Koike Ayumi)

神奈川工科大学・応用バイオ科学部・教授

研究者番号 : 20454176