

科学研究費補助金研究成果報告書

平成25年5月15日現在

機関番号：34304

研究種目：特定領域研究

研究期間：2007～2011

課題番号：19058004

研究課題名（和文） 分子シャペロンによるタンパク質のハンドリング

研究課題名（英文） Protein handling by molecular chaperones

研究代表者

吉田 賢右 (YOSHIDA MASASUKE)

京都産業大学・総合生命科学部・教授

研究者番号：90049073

研究成果の概要（和文）：

膜のシャペロンを2種発見した。pspAは、膜のイオン透過性の修復、uncIは疎水的なc-サブユニットの膜組み込みに働く。DnaK-DnaJ-DafA複合体は、高温になると解離して、DnaKとDnaJがClpBと協力してシャペロン活性を持つことがわかった。GroEL-変性タンパク質にGroESが結合すると、ポリペプチドの一部がGroELに繫留しているtethering中間体ができて、次に、これが空洞内部あるいは外に放出されることがわかった。

研究成果の概要（英文）：

We found two kinds of new membrane chaperones. pspA repairs the leaks of ions through damaged membranes, and uncI assists membrane integration of hydrophobic c-subunit of ATP synthase. DnaK-DnaJ-DafA turns out to be inactive complex. As temperature raises, the complex dissociates and DnaK and DnaJ start to work as disaggregation chaperone in cooperation with ClpB. Polypeptide in the GroEL cage capped by GroES spends most time as tethered state. Then, it is released into the chaperonin cage or outside.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	17,500,000	0	17,500,000
2008年度	23,100,000	0	23,100,000
2009年度	23,100,000	0	23,100,000
2010年度	23,100,000	0	23,100,000
2011年度	23,100,000	0	23,100,000
総計	109,900,000	0	109,900,000

研究分野：生化学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：シャペロン、シャペロニン、GroEL、DnaK、DafA、ClpB

1. 研究開始当初の背景

分子シャペロンの作用機構研究の残された中心的な課題の一つは、分子シャペロンが、基質蛋白質をどのようにハンドリング（操作）しているか、その分子的理解であると考えられた。操作には基本的な方式が3つあると思われる。第1は、タンパク質をヒモにしてリングの穴の中を糸通しする場合

である。ClpBやFtsHなどリング状分子シャペロンが知られている。この糸通し方式は、タンパク質の膜透過においても使われている。第2は、分子シャペロンの分子内空洞の中に変性タンパク質を閉じこめる場合である。GroEL/GroESがその代表である。第3は、変性したタンパク質をつかまえて、はなす、これだけを行う場合である。

DnaK/DnaJ 系がよく知られている。いずれも、ATP のエネルギーで反応が進行する。

2. 研究の目的

分子機構として未解決の問題は、それぞれ (第1) ポリペプチド鎖を一方に引っ張る糸通しのメカニズム、(第2) 変性タンパク質を狭い空洞に招き入れる仕組みと其中での折れたたみ方、(第3) 結合と解離の制御、であると考えられた。これを解明する

3. 研究の方法

構造を解いてそれに基づいて、分子機構を研究する。生化学的研究、FRET などの物理化学的測定、および決め手となる1分子観察を行う。ポリペプチドの“穴通し”の開始のようす、引き込み力の起源と制御を1分子で観察する。ClpB の凝集体認識、ポリペプチドの引きずり出し、可溶化の機構を明らかにする。GroEL については、基質タンパク質と GroES がともに GroEL に強く結合している3者複合体の実体を明らかにする。

4. 研究成果

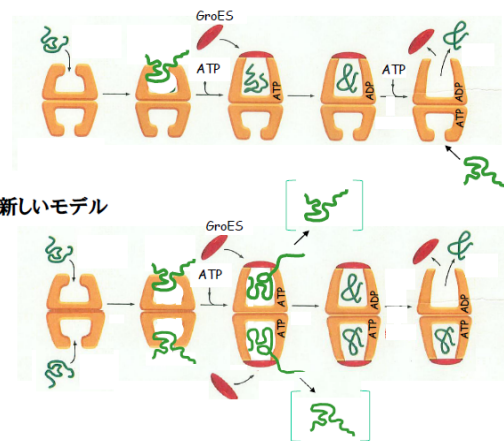
(1) 当初予定しなかった膜タンパク質のシャペロンを2種、発見した。PspA は、外来の膜タンパク質を大腸菌に合成させると大量に合成が誘導される大腸菌のタンパク質で機能不明であった。これを調べてみると、膜のイオン透過性を修復することがわかった。膜の内側表面にメッシュのように結合して傷んだ膜の構造を修復するらしい。UncI は、ATP 合成酵素のオペロンに存在する遺伝子から合成されるが、その機能は不明であった。私たちは、これが、ATP 合成酵素のサブユニットの中でもっとも疎水的なc-サブユニットの膜組み込みに働く因子であることを見出した。

(2) ClpB と DnaK-DnaJ-GrpE の協力によって、凝集したタンパク質が再び水に溶ける形にもどり、さらに活性を示すようになる。好熱菌では、DnaK と DnaJ は、DnaK-DnaJ-DafA 複合体として精製されるので、実験は、この複合体と ClpB と GrpE の三者を凝集したタンパク質に加える。この複合体がどんなやり方で脱凝集-再生に関わるのか、判然としなかった。今回、DafA は高温になると変性して複合体は解離して DnaK と DnaJ は個別に働くことができるようになることがわかった。すなわち、DnaK-DnaJ-DafA はストレスのない状態の安定複合体で、この状態では DnaK と DnaJ は活性を発揮できない。いわば、両者は DafA によって格納されているわけで、これが高温になると、解き放たれてシャペロンとして活躍を始めるわけである。DnaK-DnaJ-DafA 複合体の結晶解析はまだ成功していない。ま

た、ClpB によるポリペプチド引き込みの1分子観察も追及したが、米国のグループが似た実験に成功したので中止した。彼らの結果は、引き込みはパワーストローク (<20 pN) であり、1回の引き込み長さは5-8 アミノ酸残基である。

(3) シャペロニン GroEL-GroES の反応サイクルは、すでに10年以上前におもに A. Horwich のグループによって基本的なところは解明された、と考えられており、現在のほとんどの生化学・細胞生物学の教科書に Horwich モデル (下図「今までのモデル」) が紹介されている。しかし、私たちを含む日本の研究グループの最近の研究によれば、モデルを支える実験の解釈に誤りがあり、Horwich モデルは書き換えられる必要がある (下図「新しいモデル」)。

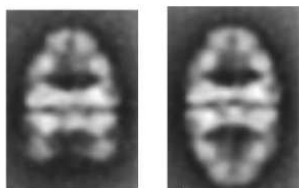
今までのモデル (“molecular biology of the Cell” の図を改変)



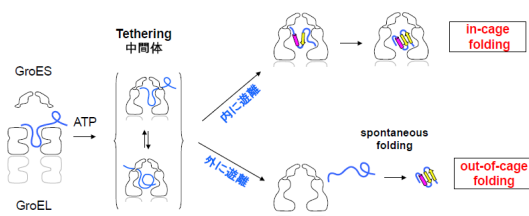
シャペロニン (GroEL) は2つのリングから成る。2つのリングは、向かい合って結合していて、それぞれのリングは内部に大きな空洞を持つ。Horwich モデルにしたがうと、以下のような素過程でフォールディングを介助する反応が進む。変性タンパク質 (ポリペプチド) は1つのリングのへりに結合する→そのリング (cis-ring) に ATP が結合するとリングの構造が変わる (closed→open) →すると、フタである GroES が結合できる→GroES が結合すると、ポリペプチドは外に逃げないで、閉じられた空洞の中に収納される→ポリペプチドは、空洞の中でただちにフォールディングを開始する→およそ8秒で ATP が加水分解されて ADP となる→すると、反対側のリング (trans-ring) にポリペプチドと ATP が結合できるようになる→フタ (GroES) がリング (cis-ring) から離れる、ポリペプチドは (フォールディングが終わっていても、いなくても) 空洞から外へ放たれる→反対側のリング (trans-ring) に GroES が結合する。あとは、trans-ring を cis-ring と読み変えて繰り返す。

Horwich モデルは2つの点で変更が必要であ

る。A. Horwich モデルでは、2つのリングで同時にフォールディングが進行することはない。シーソー機構と呼ばれるように、常に1つのリングだけが働いている。しかし、新モデルでは、2つのリングで同時にフォールディングが進行できる。反応中に出現する GroEL-GroES 中間体は、Horwich モデルでは、片方のリングに GroES が結合している弾丸 (bullet) 型複合体 (電子顕微鏡像、下図左) である。新モデルでは、GroES は両方のリングに結合しているため、フットボール (football) 型複合体 (下図右) である。



B. また、Horwich モデルでは、GroES がリングに結合したとたんポリペプチドが空洞内に収納される。収納されたポリペプチドは、空洞内部の空間で自由に動ける。しかし、新モデルでは、GroES が結合した後もポリペプチドは完全に空洞に収納されるわけではなく、フタ (GroES) とリングの間のすきまあたりにゆるく繋 (つな) ぎとめられている (繋留; tethering) (下図)。ポリペプチドの一部は、空洞の外部にちょろちょろとはみ出している。繋留が外れてポリペプチドが空洞



内に放出されるとすばやくフォールディングは完成する (in-cage folding)。しかし、時にはポリペプチド全体が外に逃げ出してしまふ。そのときは、ポリペプチドは自分でフォールディングする (out-of-cage folding) (できなければ凝集してしまう)。

(4) GroEL-GroES によるフォールディングサイクルの主要な中間体が football だとすると、リング間の相互作用や ATP 加水分解の共同性など、今までの多くの研究が見直される必要がある。また、GroES やポリペプチドの量が football を作るには少なすぎる時には、(今のシーソーモデルとは異なるかもしれないが) bullet 中間体を経るサイクルとなることは考えられるが、その実態もまだわかっていない。

Tethering 中間体の影響はさらに大きい。

GroEL-GroES 空洞内のフォールディングが、自発的なフォールディング (spontaneous folding) とどう違うか、NMR や同位体交換、質量分析、などの高度な方法で熱心に研究され、多くの論文が有名ジャーナルに発表されてきた。Anfinsen の原理「立体構造の情報はすべてアミノ酸配列に含まれている」について、ひょっとしたら反例を示せるのではないかと、という期待もある。Horwich らは、GroEL-GroES はフォールディングのために安全な (凝集の危険のない) 小部屋を提供しているだけだ、と考え、Hartl らは GroEL-GroES はもっと積極的にフォールディングを加速する仕組みを備えている、と主張している。しかし、両者も含めて今までのすべての研究は、一部のポリペプチドが外に逃げ出すとか、空洞内のポリペプチドが GroEL に繋留されている、などということは全く想定せずに行われてきた。となると、今までの解釈は大きな変更を強いられる。

例えば、Hartl らは DMMBP (maltose binding protein に2つ変異をいれたもの) というタンパク質のフォールディングが GroEL-GroES によって数倍早くなる、という実験などから、GroEL-GroES 空洞のフォールディングの促進を次のように説明する。A. 狭いところに閉じ込めた効果と、B. 空洞内表面のマイナス電荷と空洞の底の適当に疎水的な残基によって、C. kinetically-trapped intermediate (一旦そこに陥るとなかなか抜け出せないフォールディングの中間体) に陥らないで速やかにフォールドする。しかし、彼らの実験条件では、DMMBP ポリペプチドの実に 80~95% が空洞の外に逃げ出している。彼らが空洞内フォールディングと思ってあれこれ解析していたものは、空洞外の溶液中の自発的なフォールディング (spontaneous folding) であった。

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 14 件)

- ① Motojima F, Motojima-Miyazaki Y, Yoshida M. Revisiting the contribution of negative charges on the chaperonin cage wall to the acceleration of protein folding. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012 Sep 25; 109(39): 15740-5.
- ② Mizuno S, Nakazaki Y, Yoshida M, Watanabe YH. Orientation of the amino-terminal domain of ClpB affects the disaggregation of the protein. FEBS J. 2012; 279: 1474-84. 663-6. 査読あり
doi: 10.1111/j.1742-4658.2012.08540.x.
- ③ Yamasaki T, Nakazaki Y, Yoshida M, Watanabe YH. Roles of conserved arginines

- in ATP-binding domains of AAA+ chaperone ClpB from *Thermus thermophilus*. FEBS J. 2011; 278:2395-403. 査読あり
doi: 10.1111/j.1742-4658.2011.08167.x.
- ④ Inoue Y, Kawai-Noma S, Koike-Takeshita A, Taguchi H, Yoshida M, Yeast Prion Protein New1 Can Break Sup35 Amyloid Fibrils into Fragments in an ATP-dependent Manner. Genes to Cell, 2011, 16, 545-556. 査読あり
doi: 10.1111/j.1365-2443.2011.01510.x.
- ⑤ Motojima F, Yoshida M. Polypeptide in the chaperonin cage partly protrudes out and then folds inside or escapes outside. EMBO J. 2010; 29: 4008-19. 査読あり
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20959808>
- ⑥ Motojima-Miyazaki Y, Yoshida M, Motojima F. Ribosomal protein L2 associates with *E. coli* HtpG and activates its ATPase activity. Biochem Biophys Res Commun. 2010; 400: 241-5. 査読あり
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20727857>
- ⑦ Mizutani T, Nemoto S, Yoshida M, Watanabe YH. Temperature-dependent regulation of *Thermus thermophilus* DnaK/DnaJ chaperones by DafA protein. Genes Cells. 2009; 14: 1405-13. 査読あり
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19930469>
- ⑧ Nojima T, Yoshida M. Probing open conformation of GroEL rings by cross-linking reveals single and double open ring structures of GroEL in ADP and ATP. J Biol Chem. 2009; 284: 22834-9. 査読あり
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19520865>
- ⑨ Watanabe YH, Nakazaki Y, Suno R, Yoshida M. Stability of the two wings of the coiled-coil domain of ClpB chaperone is critical for its disaggregation activity. Biochem J. 2009; 421: 71-7. 査読あり
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19351326>
- ⑩ Nojima T, Murayama S, Yoshida M, Motojima F. Determination of the Number of Active GroES Subunits in the Fused Heptamer GroES Required for Interactions with GroEL. J. Biol. Chem., 2008; 283: 18385-92. 査読あり
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18430731>
- ⑪ 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., 2008; 283: 23774-81. 査読あり
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18567584>.
- ⑫ Ozaki Y, Suzuki T, Kuruma Y, Ueda T, Yoshida M. UncI protein can mediate ring-assembly of c-subunits of FoF1-ATP synthase in vitro. Biochem Biophys Res Commun. 2008;3 67(3): 663-6. 査読あり
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18182163>
- ⑬ Suzuki T, Ozaki Y, Sone N, Feniouk BA, Yoshida M. The product of uncI gene in F1Fo-ATP synthase operon plays a chaperone-like role to assist c-ring assembly. Proc Natl Acad Sci USA. 2007; 104(52): 20776-81. 査読あり
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18083842>
- ⑭ Kobayashi R, Suzuki T, Yoshida M. Escherichia coli phage-shock protein A (PspA) binds to membrane phospholipids and repairs proton leakage of the damaged membranes. Mol Microbiol. 2007; 66: 100-9. 査読あり
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18183492>
- [学会発表] (計 20 件)
- ① M. Yoshida, T. Ando, D. Yamamoto*, F. Motojima “Football” with tethered polypeptide; renovation of chaperonin mechanism. 2012. Sept 20. EMBL symposium. Heiderburg, Germany_
- ② Motojima F, Motojima-Miyazaki Y, Tanaka S, Yoshida M. Tethering mechanism of chaperonin. Cold Spring Harbor at Suzhou. 2011, Sept. 27 China
- ③ Motojima F, Yoshida M. Polypeptide in the chaperonin cage partly protrudes out and then folds inside or escapes outside. ISCP Nara, 2010. Sept. 17 Nara, Japan
- ④ Motojima F, Yoshida M. The folding pathway of blue fluorescent protein in spontaneous and chaperonin-assisted folding. FASEB SRC, Protein folding in the cell. July 25-30, 2010, Saxtons River, Vermont. USA
- ⑤ Motojima F, Yoshida M. Fold or escape; fates of substrate polypeptide in the critical GroEL/GroES intermediate. Cold Spring Harbor Meeting. May 4, 2010. USA
- ⑥ Kobayashi R, Ozaki Y, Suzuki T, Yoshida M. New Membrane Chaperones. Cold Spring Harbor Meeting. May 2, 2008, USA
- ⑦ Motojima F, Yoshida M. GroEL/ES-assisted folding of bfp starts from an extended state and is faster than free folding. Cold Spring Harbor Meeting. May 2, 2008, USA

〔その他〕
ホームページ等

<http://www.cc.kyoto-su.ac.jp/~fmotojim/index-j.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 賢右 (YOSHIDA MASASUKE)
京都産業大学・総合生命科学部・教授
研究者番号：90049073

(2) 研究分担者

渡辺 洋平 (WATANABE YOHEI)
甲南大学・理工学部・講師
研究者番号：40411839

元島 史尋 (MOTOJIMA FUMIHIRO)
京都産業大学・総合生命科学部・助教
研究者番号：70372464
2009年

濡木 理 (NUREKI SATOSHI)
東京大学・理学系研究科・教授
研究者番号：10272460
2007-2008年

(3) 連携研究者

なし