

平成30年6月13日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07019

研究課題名(和文) 腸内細菌科細菌細胞内プロテオリシスのレドックス制御

研究課題名(英文) Redox regulation of proteolysis in the Enterobacteriaceae cells

研究代表者

西井 亘(Nishii, Wataru)

国立研究開発法人理化学研究所・横山構造生物学研究室・研究員

研究者番号：30287461

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内の蛋白質分解は、蛋白質の機能・寿命・品質を管理する。Lonプロテアーゼは、細菌細胞質や真核細胞オルガネラにおける蛋白質分解を担っており、蛋白質分解の一連の過程を単一分子内で行う点に特徴がある。本研究では、Lonプロテアーゼについて、X線結晶構造解析をはじめとする構造解析、並びに酵素学的性状の解析を通して、詳細に検討した。その結果、Lonの機能が、従来知られていなかった、ダイナミックな構造変化を通して、多層的・段階的に調節されていることが明らかになった。この結果から、細胞内蛋白質分解の普遍的メカニズムの理解するとともに、感染症治療といった応用展開も期待することができる。

研究成果の概要(英文)：Cellular proteolysis dominates function, turnover, and quality of cellular proteins. Lon protease involves such proteolysis in bacterial cytosols and eukaryotic organelles, and carries out a series of protein degradation processes within a single molecule. In this study, I investigated Lon protease by structural and functional analyses, including X-ray crystallography. The results showed that function of Lon protease is regulated through its dynamic structural changes in a multi-layered and stepwise manner. The results also shed light on the general mechanisms for cellular proteolysis, and provide opportunities to develop therapy, including that for infectious diseases.

研究分野：酵素学

キーワード：タンパク質分解 細胞内プロテオリシス AAA+プロテアーゼ レドックス 腸内細菌科

1. 研究開始当初の背景

(1) 感染症の約半数は、腸内細菌科細菌 Enterobacteriaceae (大腸菌、サルモネラ菌、セラチア菌、クレブシエラ菌、赤痢菌、ペスト菌など) がひきおこす。このことは、腸内細菌科細菌が、好気環境である宿主体外 (有酸素) と、嫌気環境である腸内 (無酸素) のいずれにおいても強健に増殖する、通性嫌気性をもつことに由来すると考えられる。両環境は、生物にとって大きく異なるため、多くの生物は、どちらか一方の環境でしか生育できない。例えば、腸内フローラの 99% を占める偏性嫌気性細菌は、体外の好気環境では生育できず、必然的に感染性が殆どない。従って、腸内細菌科細菌が、環境中の酸素を感知し、細胞機能を最適化するメカニズムは大変重要である。

(2) 細胞機能を担うもっとも重要な生体分子はタンパク質であるが、細胞内では、正常な構造機能を失った、異常なタンパク質も存在する。このような異常タンパク質の生成量は、好気・嫌気両環境間で大きく異なる。すなわち、腸内の嫌気環境では、酸素による酸化ダメージがない。さらに嫌気呼吸によるエネルギー生産量が低いいため、タンパク質の合成を活発に行うことができない。従って、異常タンパク質が殆ど生じない。一方、宿主体外の好気環境においては、酸素によるダメージと、酸素呼吸に伴う活発なタンパク質合成に伴い、異常タンパク質が大量に生成する。このような異常タンパク質は有害であり、細胞内のタンパク質分解酵素 (プロテアーゼ) によって、速やかに分解除去される必要がある。しかし、プロテアーゼは、細胞にとって諸刃の剣であり、過剰に活性が発現すると、細胞内で機能する正常なタンパク質まで分解してしまう。従って、腸内細菌科細菌においては、腸内外の酸素量に応じてプロテアーゼ活性が厳密に制御される必要がある。しかし、そのメカニズムは謎であった。

(3) 細菌細胞内の異常タンパク質を分解する主要なプロテアーゼは、Lon である。申請者は最近、腸内細菌科細菌 Lon が、分子中に、好気・嫌気環境間の酸素量の違いを感知して、活性を最適化する、レドックススイッチを備えていることを、発見した (Nishii et al. (2015) Nat. Chem. Biol. 11, 46-51)。

(4) Lon は分子内のチャンパー内に、基質タンパク質を引き込んで分解する、ATPase associated with diverse cellular activities (AAA+) プロテアーゼであり、全ての生物界に普遍的に存在する。申請者は、腸内細菌科細菌の Lon において、ユニークに保存されている二つのシステイン残基に着目した。そして、これらが好気・嫌気間の酸化還元環境の変化を感知し、可逆的にジスルフィド結合を形成することによって、レドックススイッチとし

て機能すること、すなわち、嫌気環境では活性の低い還元型、好気環境では活性の高い酸化型に Lon をスイッチし、細胞内におけるタンパク質分解活性をそれぞれの環境に最適化することを見出した。さらに、このスイッチが、チャンパー内から分解産物ペプチドを放出する出口孔のサイズを調節することより、活性を制御することを、原子レベルで明らかにした。この類例のない新規のメカニズムは、細菌感染症対策の鍵となることが期待された。

2. 研究の目的

本研究は、腸内細菌科細菌 Lon を中心に、その分子メカニズムの詳細を解析することにより、細胞内プロテオリシスの制御メカニズムを理解することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 大腸菌及びヒト由来 Lon 及び各種バリエーションの組換えタンパク質の調製

Lon は細胞内で大量発現すると、細胞毒性が生じ、また、発現調製の過程で、ヘテロな構造をもつプロトマーが、会合体に取り込まれるなどの理由により、均一な組換え蛋白質試料の大量調製は従来困難であった。

本研究では、conventional な大腸菌蛋白質発現系を用いると同時に、大腸菌抽出液を用いる無細胞蛋白質合成法を応用して、大腸菌及びヒト由来組換え型 Lon 及びそのバリエーションを大量合成した。さらに、精製方法を工夫することで、均一なこれら蛋白質を大量調製した。

(2) X 線結晶構造解析

(1) で調製した大腸菌及びヒト Lon 及びそれらの各種変異体について、結晶化スクリーニングを行い、得られた結晶について、X 線結晶構造解析を行った。

(3) X 線小角分散 (SAXS) 解析

(1) で調製した大腸菌及びヒト Lon 及びそれらの各種変異体について、X 線小角分散解析により、立体構造のモデリングを行うとともに、溶液環境の変化に伴う構造変化について解析した。

(4) 蛋白質科学的解析

(1) で調製した大腸菌及びヒト Lon 及びそれらの各種変異体について、様々な溶液環境において、ゲル濾過クロマトグラフィー、超遠心分析、電子顕微鏡による、分子形状の解析を行った。

(5) 酵素学的性状の解析

(1) で調製した大腸菌及びヒト Lon 及びそれらの各種変異体について、酵素学的性状、及び様々な環境要因が Lon の活性に及ぼす影響するについて検討した。

4. 研究成果

(1) Lon 及び各種バリエーションの高収量・高純度組換え蛋白質の調製方法の開発

大腸菌 Lon 及びそのバリエーションについては、従来法でも、高収量で、ある程度純度の高い組換え蛋白質を得る事は可能であった。しかし本研究で詳細に検討したところ、このようにして調製した蛋白質には、高次構造レベルの heterogeneity が存在していた。このことは、Lon の構造機能相関において重要である一方、その後の構造・機能の解析を複雑にする要因であることが考えられた。本研究では、精製条件・溶液条件を詳細に検討することにより、高次構造が均一な、Lon 試料を調製することに成功した。

ヒト Lon 及びそのバリエーションについては、大量調製のために大腸菌発現系を用いた場合、発現量の低さと細胞毒性が問題であった。本研究は、大腸菌における生合成にコドン最適化するとともに、大腸菌懸濁液を用いた無細胞蛋白質合成法を応用することにより、ヒト Lon の高純度・高収量の調製に成功した。

(2) Lon の静止型構造の発見

Lon の X 線結晶構造は、各種断片蛋白質のそれらが報告されているものの、全長 Lon 蛋白質については未だ不明である。本研究では、Lon の分子メカニズムを理解するため、前述のようにして調製した、大腸菌及びヒトの Lon 及び各種 Lon バリエーションの X 線結晶構造解析を試み、以下の成果を得た。

まず、基質タンパク質、ヌクレオチド、及び金属イオンが結合しない、大腸菌アポ型 Lon プロテアーゼの X 線結晶構造を、3.5 オングストロームの分解能で決定した。この構造は、Lon が通常の細胞内で主にとる、静止状態の Lon (静止型 Lon) の構造であると考えられる。驚くべきことに、この Lon の立体構造は、従来知られる活性型 Lon の 6 量体リング構造と大きく異なる、螺旋状の構造であった。

さらに大腸菌およびヒト由来の各種 Lon バリエーションについても、結晶スクリーニングにおいて、いくつかの有望な結晶を得ることができ、それらの内のいくつかについては、X 線回折データセットを取得した。

(3) Lon の立体構造遷移の解析

上述の静止型 Lon と活性型 Lon の間でおきる構造変化の詳細を解明するため、X 線小角散乱解析 (SAXS) と、散乱データに基づく Lon の立体構造の ab initio モデリングを行った。モデリングから得られた Lon の立体構造は、X 線結晶構造のそれとよく一致しており、両解析手段によって、Lon の構造およびその変化を矛盾なく、かつ相補的に解析することができた。これらの結果、Lon の高次構造は、生理的条件の範囲内におけるマグネシウム、ヌクレオチド等の濃度変化に応じて、らせん構造とリング構造の間で、可逆的かつ速や

かに変化することが明らかになった。これらの結果は、別途行なった、ゲル濾過クロマトグラフィー、超遠心分析、電子顕微鏡の結果と一致していた。

(4) Lon の高次構造と活性の相関の解明

Lon の活性が、酸化還元、pH、マグネシウム、ヌクレオチド等により様々な制御を受けることを、酵素学的手法で詳細に解明した。これらの活性変化は、上述の構造変化とよく対応していた。さらに驚くべきことに、静止型 Lon は活性はないものの、基質蛋白質に対する結合親和性は、活性型 Lon よりも高いことが明らかとなった。

(5) まとめ

以上の結果から、腸内細菌科 (大腸菌) 及びヒトの Lon 及びそれらのバリエーションについて、高収量・高純度の組換え蛋白質を、調製することが可能になった。これらを用いることで、分子構造・機能の解析が今後大きく発展し、さらに生物種間の Lon の構造・機能の差異について理解ができるようになる、と期待できる。

また、構造・機能に関する研究から、Lon 及び、Lon の細活性が、ダイナミックな高次構造変化を通して、多層的・段階的に制御され、そのことによって細胞内の状態に最適化されることを示唆された。

すなわち、通常の細胞条件下で Lon は、静止型の螺旋構造をとり、細胞にとって不要かつ有害な蛋白質分解活性の発現を抑制している。しかし、この構造は、基質蛋白質が出現した際には速やかにそれを捕獲することができ、さらに環境変化に応じて速やかに活性型リング構造に移行することができる。また、その逆も真である。

このメカニズムを通して Lon は、蛋白質分解活性を、必要な時に必要なだけ発現すると考えられる。このメカニズムは、生物種・分子種を超えて普遍的に存在すると考えられる一方、それらの違いに対応する、特有の分子メカニズムもまた、生物種・分子種ごとに存在すると考えられる。今後これらの点をさらに詳細に解明することで、細胞内プロテオシスにおける普遍的メカニズムの解明、並びに、例えば新規の感染症治療法の開発といった応用展開が可能になるであろう。

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 1 件)

Muramatsu, T., Takemoto, C., Kim, Y.-T., Wang, H., Nishii, W., Terada, T., Shirouzu, M., & Yokoyama, S.

“SARS-CoV 3CL protease cleaves its C-terminal autoprocessing site by novel subsite cooperativity”

Proc. Natl Acad. Sci. USA 113,
12997-13002 (2016).査読あり

[学会発表](計 8件)

西井亘、藤井佳史、松村義隆、仙石徹、小島正樹、横山茂之

「Regulation of the Lon AAA+ protease by dynamic structural changes」

ConBio2017、2017/12、神戸

Nishii, W., Seki, E., Yanagisawa, T., Sehngoku, T., Terada, T., Murmatsu, T., Niino-Kukimoto, M, Shirouzu, M., Kojima, M., Kihara, H. & Yokoyama, S.

“Redox regulation of Lon protease activity by a disulfide bond in facultative anaerobes” FASEB Science Research Conference “Functional Disulfide Bonds in Health and Disease”, Steamboat Springs, Colorado, USA (2016)

西井亘、新野陸子、寺田貴帆、白水美香子、村松知成、横山茂之

「AAA+プロテアーゼ Lon の分子メカニズム」

第39回日本分子生物学会年会・公募シンポジウム、2016/12、横浜

Nishii, W., Niino-Kukimoto, M, Terada, T., Shirouzu, M. Muramatsu, T., & Yokoyama, S.

“A redox switch shapes the exit pore of Enterobacteriaceal Lon protease to facultatively regulate proteolysis”

9th General Meeting of the International Proteolysis Society, Penang, Malaysia (2015).

西井亘、松本武久、村松知成、横山茂之

「Production of hepatitis C virus NS2-3 protease by the Escherichia coli cell-free protein synthesis method and control of its activity」

第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会合同大会、2015/12、神戸

村松知成、竹本千重、Hongfei Wang、西井亘、寺田貴帆、白水美香子、横山茂之

「SARS 3CL プロテアーゼの特異な基質認識の意義」

第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会合同大会、2015/12、神戸

西井亘、横山茂之

「アロステリックジスルフィド結合による細胞内プロテオリシスのレドックス制御」

第15回日本蛋白質科学会年会・公募型シ

ンポジウム、2015/6、徳島

村松知成、竹本千重、Yong-Tae Kim、Hongfei Wang、西井亘、寺田貴帆、白水美香子、横山茂之

「SARS コロナウイルス 3CL プロテアーゼによるアミノ酸配列認識の特殊性」第15回日本蛋白質科学会年会、2015/6、徳島

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西井 亘 (NISHII, Wataru)

国立研究開発法人理化学研究所

・横山構造生物学研究室・研究員

研究者番号：

3 0 2 8 7 4 6 1