

平成22年 5月12日現在

研究種目：若手研究（A）  
 研究期間：2007～2009  
 課題番号：19687010  
 研究課題名（和文）  
 カプセル化による凝集性蛋白質の構造解析法の開発  
 研究課題名（英文）  
 Novel chaperonin-encapsulation system for aggregation-prone proteins.  
 研究代表者  
 星野 大 (HOSHINO Masaru)  
 京都大学・薬学研究科・准教授  
 研究者番号：70304053

## 研究成果の概要（和文）：

タンパク質は、食物を消化しエネルギーに変換したり、光や匂いなどの刺激に反応したりする「生命活動」において中心的役割を担っています。タンパク質がその機能を発揮するためには、それぞれの設計図に応じて、ある特定のかたちを取る必要があります。タンパク質のかたちを調べる方法に、核磁気共鳴法というものがありますが、いくつかのタンパク質では使えません。これを改良し、より多くのタンパク質について調べる事が出来るような方法を考案しました。

## 研究成果の概要（英文）：

The protein has a central role in "vital activities", including digestion of foods, conversion of nutrients into energy, and sensing external stimulations such as light or smell. These function of proteins depend on their specific tertiary structure, which could be visualized by nuclear magnetic resonance spectroscopy. A novel method which will allow the investigation of aggregation-prone proteins by NMR was developed.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	10,500,000	3,150,000	13,650,000
2008年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2009年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
年度			
年度			
総計	19,100,000	5,730,000	24,830,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：NMR, 分子シャペロン, GroE, 会合・凝集, 構造生物学

## 1. 研究開始当初の背景

これまでに3,000を超える蛋白質の立体構造がNMRにより決定されており、蛋白質の立体構造決定法としての溶液NMRの地位は既に確立されたものとなっている。ところが

が、生体内において重要な役割を果たす蛋白質の中には、NMR測定に必要な高い蛋白質濃度の条件下において、非特異的な会合体を形成してしまうものが少なくない。会合体の形成はNMR測定において致命的であり、そ

れを効率良く取り除く／抑制する手法の開発が強く望まれている。

## 2. 研究の目的

本研究は、これまで NMR による構造解析においてしばしば大きな障害となっていた非特異的な会合体の生成を、大腸菌の分子シャペロンである GroEL/ES により形成される「カプセル」の中に標的蛋白質分子を1つずつ閉じ込めることにより物理的に抑制し、NMR による構造解析を可能にするという、直接的かつ最も効果的な手法の開発を目的とする。

## 3. 研究の方法

大腸菌の分子シャペロン GroE は、基質蛋白質を結合する GroEL サブユニットと、それと共同して働く GroES サブユニットにより構成される。まず、GroEL が変性状態にある蛋白質を特異的に認識・結合した後に、GroES が「ふた」の様に結合する事により、基質蛋白質を GroEL/ES 複合体の内部に隔離する。ATP の加水分解により、一定時間後に GroEL/ES/基質蛋白質三重複合体が解離することにより、GroEL/ES 複合体内部でネイティブ構造へとフォールディングした基質蛋白質が、溶液中へと開放される (図 1 A)。

本研究では、図 1 A 中央に示されている三重複合体 (cis-intermediate) に着目し、過渡的に形成される同三重複合体を安定に保つ事により、蛋白質を一分子ずつ隔離するための「カプセル」として用いる手法の開発を行なった。これにより、水溶液中で自己凝集してしまう蛋白質を一分子ずつ隔離し、高分解能溶液 NMR により構造解析を行う新規構造解析法の開発を目的とした (図 1 B)。

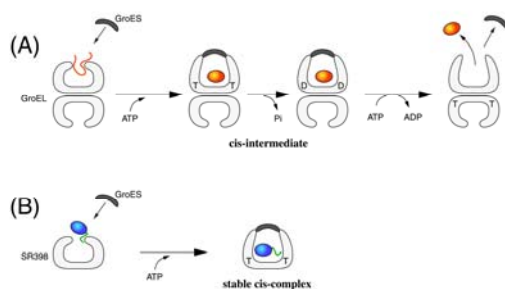


図 1 分子シャペロン GroE の ATP 反応サイクル (A)、および会合性蛋白質の構造解析のための分子シャペロンカプセル化システム (B) の模式図。

## 4. 研究成果

### (1) シス三重複合体の安定化

分子シャペロンとして機能している野生

型 GroE は、変性状態にある蛋白質のみを基質として認識・結合する。また、ATP の加水分解を通じて反応サイクルが進行するために、シス三重複合体は数十秒程度で解離する事が知られている。本研究では、シス三重複合体を安定に保つために、ATP 加水分解活性が低下した SR398 変異型 GroEL を用いて複合体の作製を行った。更に、任意の蛋白質を、ネイティブ構造を保持したまま GroEL に認識・結合するために、GroEL と安定な複合体を形成する事が報告されている 12 残基のペプチド配列 (SBP) を付加することにより、ネイティブ条件下における複合体の作製を試みた。

本手法の有効性を検証するために、NMR による解析が詳細に報告されているユビキチンをモデル基質蛋白質として用いた。ユビキチンは安定な球状蛋白質であり、これまでいかなる条件下においても GroEL との相互作用は報告されていない。同蛋白質に、GroEL 認識ペプチドを付加した ubq-SBP を作製し、SR398 変異型 GroEL との相互作用を解析した (図 2)。

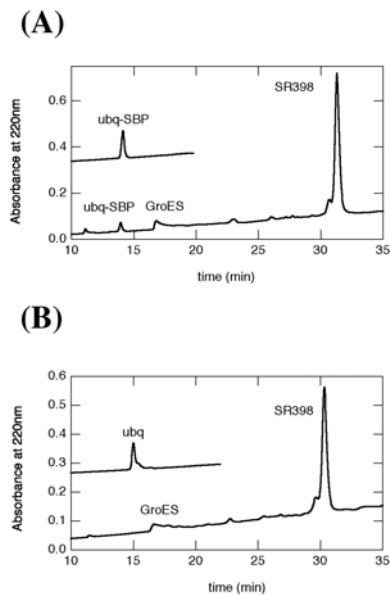


図 2 SR398 変異型 GroEL と ubq 蛋白質の相互作用。SR398/GroES と ubq-SBP (A) および野生型 ubq (B) を ATP 共存化でインキュベートしたのちに、ゲル濾過クロマトグラフィーにより SR398 を含む画分を回収し、逆相 HPLC により各タンパク質を定量化した。SBP 配列を付加した場合のみ SR398/GroES と共溶出する事が明らかとなった。ubq 蛋白質のみをアプライした結果を各クロマトグラム上部に示す。

図2に示す通り、SBP配列を付加したubq-SBP蛋白質はSR398/GroESと相互作用する事が明らかとなった。複合体形成反応は準生理学的条件下において行っており、同条件下ではubq蛋白質はネイティブ構造を保持していると考えられる。また、SBP配列をもたない野生型ubq蛋白質においては複合体は検出されていないことから、複合体の形成がSR398とSBP配列の特異的な相互作用によるものである事が明らかとなった。

## (2) シス三重複合体のNMRスペクトル

上記の結果をもとに、 $^{15}\text{N}$ 安定同位体標識したubq-SBP蛋白質を作製し、多次元NMR測定を行った。図3に、水溶液中単体およびSR398/GroES複合体中でのubq-SBPの $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ HSQCスペクトルを示す。

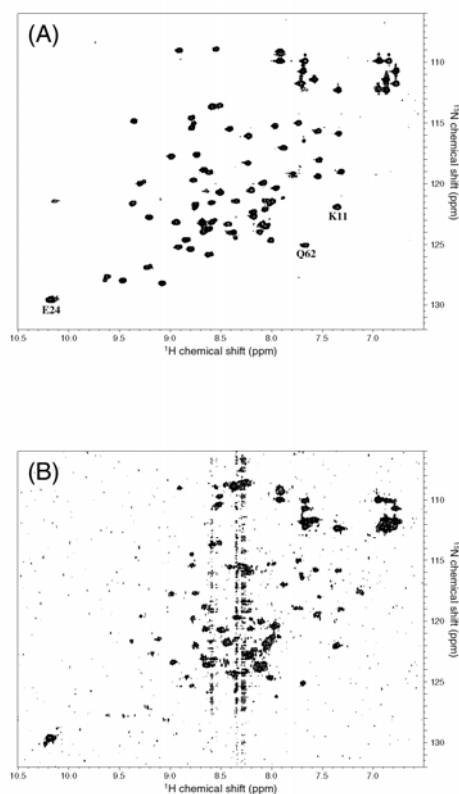


図3 水溶液条件 (A) および SR398/GroES 複合体内部 (B) における ubq-SBP の  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC スペクトル。図4にて解析したピークを、アミノ酸一文字標記と残基番号で示す。

図3に示すとおり、両スペクトルにおける各ピークの化学シフト値は完全に一致した。このことから、SR398/GroES複合体内部においてもubq蛋白質がネイティブ構造を保持している事が明らかとなった。しかしながら

その一方で、複合体内部におけるスペクトルにおいてシグナル対ノイズ比が減少していることが示された。これは、内腔という限られた空間内に隔離された測定対象蛋白質の運動性が抑制されている事を示唆する。内腔内におけるubq-SBP蛋白質の運動性を定量的に解析するために、いくつかのピークにおいて $^1\text{H}$ 軸に沿ってスペクトルのスライスを取得し、それぞれのピークをローレンツ曲線でフィッティングする事により、横緩和速度定数 ( $R_2$ ) を見積もった (図4)

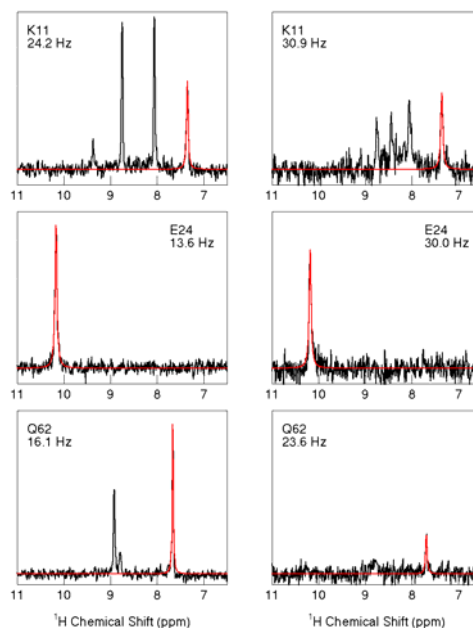


図4 水溶液中 (左) および SR398/GroES 複合体内部 (右) において測定されたubq-SBP  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC スペクトルの断面図。実測データを黒で、ローレンツ曲線でフィッティングした結果を赤で示す。残基番号およびそれぞれのピークの線幅をヘルツ単位で示す。

一般にNMR信号の線幅は、個々の核スピンの横緩和速度定数 ( $R_2$ ) に比例する。横緩和は、核スピンの磁場の摂動により誘起され、それを取り囲む他の核スピンの距離および角度の時間変化を考慮した非常に複雑な式で記述される。局所的な分子運動によりもたらされる磁場の摂動の寄与が相対的に小さいと仮定すると、横緩和速度定数は周期ゼロのスペクトル密度関数に比例する事になり、従って分子全体の回転相関時間  $\tau_c$  に比例する関数となる。

図4に示した解析結果から、複合体内部において取得されたスペクトルから得られたピークの線幅は、溶液中単体で得られたもののおおよそ2倍程度であることが明らかとなった。このことは、複合体内部におけるubq-SBPの  $\tau_c$ 、すなわち分子全体の運動性が

おおよそ2倍程度抑制されている事を示す。X線結晶構造より、ユビキチン分子ならびにGroEL/ES 内腔の体積はそれぞれ 19,000 Å<sup>3</sup>, 175,000 Å<sup>3</sup> と見積もれる。体積で10倍、半径では2倍程度の差であるため、内腔内に隔離された ubq-SBP 分子が SR398 の内壁と衝突し、運動性が抑制されている可能性が示唆される。

### (3) 国内外におけるインパクト

大腸菌の GroE は、本来、変性したタンパク質を基質として認識・結合し、そのフォールディング反応を介助する分子シャペロンとして機能している。GroEL/ES により構成される内腔に隔離されたタンパク質が、どのような過程を経てネイティブ構造を獲得するのか、すなわち、アンフィンゼンにより予測されたとおりに自発的に巻き戻るのか、あるいは GroEL/ES の内腔との相互作用によりネイティブ構造へと導かれるのかは、今日のタンパク質科学における大きな争点の一つである。

本研究により、ubq-SBP 蛋白質が内腔内外で同一の構造を形成している事が、多次元 NMR での直接的観測により証明された。本研究は、GroE 内部に隔離された蛋白質がネイティブ構造を保持している事を多次元 NMR を用いて直接観測・証明した世界で初めての報告であり、蛋白質科学において多大なインパクトを与えると期待される。

更に、NMR 信号の詳細な解析により、ubq-SBP 分子は、SR398/GroES 内腔に隔離されることによりある程度の抑制を受けるものの、比較的自由に運動している事が示された。これは、SR398/GroES と ubq-SBP の間の相互作用が非常に弱く、従って GroE 内部に隔離された蛋白質は本来アミノ酸配列によって規定されるネイティブ構造を自発的に獲得することを示唆するものである。本研究により、蛋白質の立体構造構築原理を理解する上で重要な知見が得られたと考えられる。

### (4) 今後の展望

本研究により、水溶液条件下において自己凝集をおこす蛋白質を溶液多次元 NMR により詳細に解析する道が拓けたと考えられる。これまでに、SR398/GroES 内腔に隔離した後、可逆的に疎水的な SBP 配列を除去する事により、シグナル/ノイズ比が格段に向上したスペクトルを得る事に成功している。今後、アミロイド線維等の自己凝集性の高い蛋白質の構造解析へと応用可能であると期待される。

### 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)

1. S. Tanaka, Y. Kawata, G. Otting, N.E. Dixon, K. Matsuzaki & M. Hoshino, Chaperonin-encapsulation of proteins for NMR. *Biochim. Biophys. Acta* (2010) 1804, 866-871. 査読有。

[学会発表] (計3件)

1. 増原 泰英, 河田 康志, 松崎 勝巳, 星野 大「分子シャペロンカプセル化システムの構築」第48回NMR討論会、2009年11月10日、九州大学馬出病院キャンパス
2. 田中 慎治, 河田 康志, 松崎 勝巳, 星野 大「溶液NMRによる凝集性タンパク質の新規構造解析法」日本薬学会第129回年会、2009年3月27日、国立京都国際会館
3. 田中 慎治, 河田 康志, 松崎 勝巳, 星野 大「溶液高分解能NMRによる凝集性タンパク質の新規構造解析法の開発」日本生物物理学会第46回年会、2008年12月5日、福岡国際会議場

[その他]

ホームページ等

<http://www.pharm.kyoto-u.ac.jp/yakkai/>

### 6. 研究組織

#### (1) 研究代表者

星野 大 (HOSHINO Masaru)

京都大学・薬学研究科・准教授

研究者番号：70304053

#### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

#### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：