

平成 21 年 4 月 30 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19770137

研究課題名（和文） 分子シャペロンの協調メカニズムの解明

研究課題名（英文） Molecular mechanism of chaperone network

研究代表者

座古 保 (ZAKO TAMOTSU)

独立行政法人理化学研究所・前田バイオ工学研究室・専任研究員

研究者番号：50399440

研究成果の概要：シャペロニン(CPN)はATP依存的に基質である変性タンパク質をリフォールディングする代表的なシャペロンである。一方プレフォルディン(PFD)は変性タンパク質を捕捉し、CPNへ受け渡すと考えられている。本研究では、ATPアナログを用いてCPNの構造変化サイクルを人為的に止め、PFDとの相互作用解析をおこなった。その結果、ADP状態(OPEN構造)のCPNに最も強く結合し基質タンパク質を受け渡していることが明らかとなった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	0	2,100,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	390,000	3,790,000

研究分野：生物物理学

科研費の分科・細目：タンパク質・核酸の構造・動態・機能

キーワード：(1)好熱菌タンパク質 (2)分子シャペロン (3)シャペロニン (4)プレフォルディン (5)分子間相互作用 (6)リフォールディング (7)蛍光偏光異方性解消法

## 1. 研究開始当初の背景

シャペロニンに代表される、分子シャペロンと呼ばれるタンパク質は、細胞内で作られるタンパク質の機能発現、機能保持に不可欠である。また、狂牛病など、シャペロニンが重要な働きをすると考えられる疾病例も見つかり、その役割の解明がますます重要になってきている。

近年、プレフォルディン(PFD)と呼ばれる、シャペロニン(CPN)と協調して働く分子シャペロンが新たに同定された。プレフォルディンは、遺伝子ノックアウト実験等により、細胞骨格の形成に必須であることが明らかとなった。また、アクチンやチューブリン以外のタンパク質についても、リボソームにおいて生成されたペプチドや変性したタンパク質に結合して凝集を防ぐとともにシャペロ

ニンへ受け渡し、折れたたみを促進していると考えられているが、詳しい分子メカニズムは不明であった。

プレフォルディンはクラゲ状の構造をした分子シャペロンであり、申請者はこれまでに、プレフォルディンが末端部位において変性タンパク質と強く結合し(KDは約5-20nM)、シャペロニン存在下で解離が促進されることを見出し、プレフォルディンとシャペロニンが協調してタンパク質の折れたたみを促進するメカニズムの一端を明らかにした(J. Biol. Chem. (2004) 279, 31788-95, Recent Res. Devel. Biophys. (2004), 3, 475-483, FEBS Lett. (2005) 579, 3718-24).

また、プレフォルディンとシャペロニンのそれぞれの相互作用部位を同定し、それぞれの先端部分で相互作用していることを明らかにした。さらに、静電相互作用がこれらの相互作用に重要な寄与をしているモデルを初めて提案した(J. Biol. Chem. (2004) 279, 31788-95, J. Mol. Biol. (2006) 364 110-20)。これは疎水的相互作用が主だとこれまで考えられていた分子シャペロン間の相互作用において、他の相互作用が重要であることを示した初めての例になった。

しかし、生体内におけるプレフォルディンとシャペロニンの協調メカニズムの解明には、さらにATP加水分解サイクルに伴うシャペロニンの構造変化の制御を行う必要がある。細胞内ではシャペロニンはATP依存的な構造変化サイクルを繰り返しており、細胞内でのプレフォルディンとシャペロニンの協調メカニズムの解明には、プレフォルディンが構造変化サイクルにおいてどの構造のシャペロニンに結合し、どのタイミングで解離するかなどを明らかにすることが必要不可欠である。

## 2. 研究の目的

本研究では、ATPアナログを用いて、シャペロニンの構造変化サイクルを人為的に止め、これらの構造状態に対するプレフォルディンの結合・解離を分析する。申請者はこれまでにADP-BeFxなどのATP加水分解中間体を模したATPアナログを用いることで、シャペロニンの構造変化サイクルを途中で止めることに成功している(J. Biol. Chem. (2005) 280, 40375-83)。これにより、各構造状態のシャペロニンとプレフォルディンの相互作用観察が可能となる。さらに、プレフォルディンと基質である変性タンパク質の複合体とシャペロニンの各構造状態の相互作用解析を行い、プレフォルディンとシャペロニンの2つの分子シャペロンの協調メ

カニズムの詳細を明らかにする。

## 3. 研究の方法

本研究では、より詳細にプレフォルディンとシャペロニンの相互作用解析を行うため、構造を制御したシャペロニンとの相互作用解析を行う。用いるGroupII型シャペロニンは蓋となるhelical protrusion部位を持っており、この蓋が開閉することでそれぞれopen構造、closed構造を形成する。蓋の開閉はATPの加水分解サイクルによって制御されている(図1)。

申請者はこれまでに、ATPアナログを用いることで、ATP加水分解に伴うシャペロニンの構造変化サイクルを途中で止めることに成功している(J. Biol. Chem. (2005) 280, 40375-83)(図1)。すなわち、ADP-BeFx、ATP-BeFxとシャペロニンをインキュベート

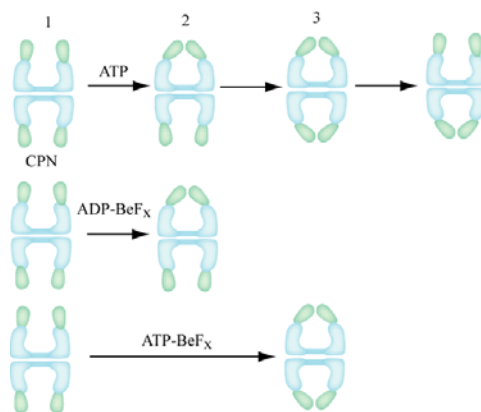


図1 ATPアナログによるシャペロニンの構造変化制御

することで、それぞれ図2の2、3の構造状態に留めることができる。よって、これらの構造状態のシャペロニンとプレフォルディンの相互作用を解析することで、プレフォルディンがどの構造のシャペロニンに結合し、いつ解離するかを明らかにすることができる。

本研究では相互作用解析に蛍光偏光解析法を用いる。この方法ではフルオレセインなどの蛍光色素でラベルしたプレフォルディン(約90kDa)がシャペロニン(約1000kDa)と複合体をつくと大幅に分子量が増えることによる蛍光の偏光消度変化を測定することで複合体形成を検出できる方法である(図2)。蛍光タンパク質を固定化せず測定を行えるためシャペロニンが構造変化することができ、蛍光分光器に設置済みのペルチェ式セルホルダー温度制御ユニットによりシャペロニンが構造変化を起こす温度(約60度)での測定が可能となる。

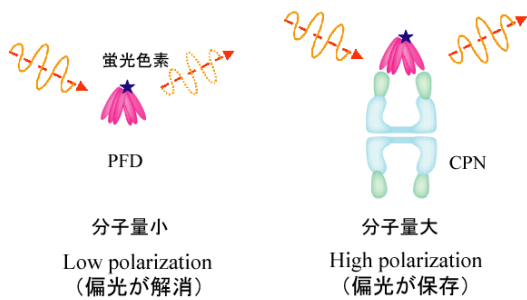


図2 蛍光偏光解析法による相互作用解析

本研究では、シャペロニンとプレフォルデインの組み合わせとして、超好熱性古細菌 *Thermococcus* sp. strain KS-1 由来のシャペロニン変異体 (CPN $\alpha$ K250E/K256E) および *Pyrococcus horikoshii* 由来のプレフォルデオン (PhPFD) を用いた。申請者はこれまでにこれらのシャペロンが強く相互作用し、プレフォルデインからシャペロニンへと基質タンパク質が受け渡されることを示しており (J. Mol. Biol. (2006) 364 110-20)、本研究にも適している。

#### 4. 研究成果

##### (1) ATP アナログによるシャペロニン構造変化

本研究で用いている超好熱性古細菌 *Thermococcus* sp. strain KS-1 由来のシャペロニン変異体 (CPN $\alpha$ K250E/K256E) がヌクレオチド依存的構造変化を示すかどうかをプロテアーゼアッセイにより確認した (図3)。GroupII 型のシャペロニンは open 構造と close 構造に構造変化する蓋を有しているが、open 構造では蓋はプロテアーゼにより分解されるのに対し、close 構造ではプロテアーゼ耐性をもつ。よって、プロテアーゼ耐性を調べることでシャペロニンの構造を見分けることができる。

本実験ではプロテアーゼとしてサーモライシンを用い、1 mM の ATP アナログ (ADP, AMP-PNP, ATP) 存在下で 45°C、10 分反応させ、反応物を SDS-PAGE 解析することでプロテアーゼ分解の有無を調べた。その結果、ヌクレオチド非存在下ではシャペロニンは open 構造をとっているのに対し、AMP-PNP では close 構造をとっていることが確認された。また、興味深いことに ADP 存在下では open 構造をとっていた (図3)

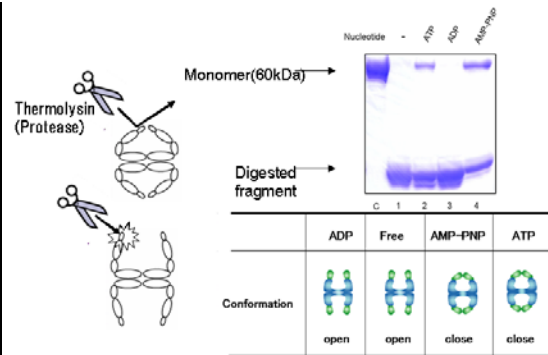


図3 プロテアーゼによる各ヌクレオチド存在下でのシャペロニン構造変化検出

##### (2) 各 ATP アナログ存在下でのシャペロニン・プレフォルデインの相互作用解析

蛍光偏光解析法を用いて、フルオレセイン (FL) でラベルした PhPFD (FL-PhPFD)。ここで、ラベルによる活性への影響がないように、PhPFD の活性部位と反対部分に導入したシステイン残基 (L69C) 特異的にラベル剤を導入した。10 mM FL-PhPFD に対し、25 nM から 20  $\mu$ M まで濃度を変化させた CPN $\alpha$ K250E/K256E を加え、45°C で 10 分間インキュベートした後に蛍光偏光測定を行った (図4)。反応は 1 mM 各ヌクレオチドアナログ存在下で行った。CPN と PhPFD の解離定数は以下の式でフィッティングして求めた。

$$\Delta P = P_{\max} \times \frac{[CPN]}{KD + [CPN]}$$

( $P_{\max}$  は  $\Delta P$  の漸近値, [CPN] は加えた CPN の濃度)

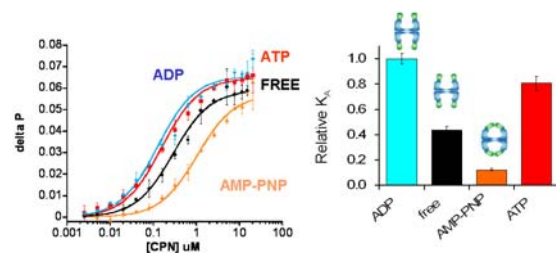


図4 蛍光偏光測定法によるシャペロニンとプレフォルデインの相互作用測定

その結果、プレフォルデインはヌクレオチドフリーの状態 (OPEN 構造) のシャペロニンに強く結合し、AMP-PNP 状態 (CLOSE 構造) には最も弱く結合することが分かった。興味深いことに、プレフォルデインは ADP 状態 (OPEN

構造)のシャペロニンに最も強く結合した。この結果は、ヌクレオチドフリーの状態とADP状態では、同じくOPEN構造をとってはいるが、局所構造は異なっていることを示唆する。さらにこれらの結果を元に、プレフォルディンはシャペロニンによるATP加水分解サイクルの中でも、ADP状態に強く結合して基質タンパク質を受け渡している新しいモデルを提案することできた(図5)。

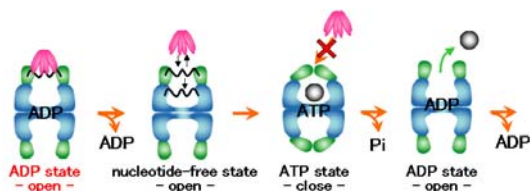


図5 プレフォルディンによるシャペロニンへの基質タンパク質受け渡しモデル

## 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8件)

Zako, T., Nagata, H., Terada, N., Sakono, M., Soga, K and Maeda, M. "Improvement of dispersion stability and characterization of upconversion nanophosphors covalently modified with PEG as a fluorescence bioimaging probe" J. Materials Sci. (2008) 43, 5325-30 査読有

Sakono, M., Zako, T., Ueda, H., Yohda, M. and Maeda, M. "Formation of highly toxic soluble amyloid beta oligomers by the molecular chaperone prefoldin" FEBS Journal in press 査読有

Suzuki M, Ueno T, Iizuka R, Miura T, Zako T, Akahori R, Miyake T, Shimamoto N, Aoki M, Tanii T, Ohdomari I, Funatsu T. "Effect of the C-terminal truncation on the functional cycle of chaperonin groel: Implication that the C-terminal region facilitates the transition from the folding-arrested to the folding-competent state." J. Biol. Chem., (2008) 283, 23931-39 査読有

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. (2008) 27, 461-8 査読有

Kurimoto, E., Nishi, Y., Yamaguchi, Y., Zako, T., Iizuka, R., Ide, N., Yohda, M. and Kato, K. "Dynamics of group II chaperonin and prefoldin probed by 13C NMR spectroscopy" Proteins (2008) 70, 1257-63 査読有

Kurimoto, E., Nishi, Y., Yamaguchi, Y., Zako, T., Iizuka, R., Ide, N., Yohda, M. and Kato, K. "Dynamics of group II chaperonin and prefoldin probed by 13C NMR spectroscopy" Proteins (2008) 70, 1257-1263 査読有

Miyake, T, Tanii, T., Kato, K., Zako, T., Funatsu, T. and Ohdomari I. "Selectivity improvement in protein nanopatterning with a hydroxy-terminated self-assembled monolayer template" Nanotechnology (2007) 18, 305304 査読有

Horiuchi, H., Iwami, N., Tachibana, F., Ohtaki, A., Iizuka, R., Zako, T., Oda, M., Yohda, M. and Tani, T. "Complex formation of CdSe/ZnS/TOP0 nanocrystal vs. molecular chaperone in aqueous solution by hydrophobic interaction" J. Luminescence (2007) 127, 192-197 査読有

[学会発表] (計9件)

Mikael Lindgren, Tamotsu Zako, Mizuo Maeda, Per Hammarström and K. Peter R. Nilsson "Detection and diagnostics of amyloidic proteins using luminescent conjugated polymers" Joint Meeting of the Japanese Biochemical Society and the Molecular Biology Society of Japan, Kobe, Dec 11, 2008

Tamotsu Zako, Hiroyasu Nagata, Naofumi Terada, Arata Utsumi, Masafumi Sakono, Hiroshi Ueda, Masafumi Yohda, Kohei Soga and Mizuo Maeda "Development of PEGylated upconversion nanophosphors as a fluorescence bioimaging probe and its application for tumor cell imaging" YABEC2008, Tokyo, Nov. 30 2008

座古保、迫野昌文、内海現太、養王田正文、前田瑞夫

「Small heat shock protein (sHsp)はストレス条件下においてアミロイドβと複合化し無毒のアミロイド様繊維を生成する」 第3回臨床ストレス応答学会、秋田 2008年 11月 15日

座古保、迫野昌文、内海現太、養王田正文、前田瑞夫

「分子シャペロンによる新規なアミロイド形成」化学工学会沖縄大会、沖縄 2008年 8月 8日

Tamotsu Zako, Yosuke Murase, Ryo Iizuka, Taro Kanzaki, Masafumi Shimizu, Masafumi Yohda and Mizuo Maeda “Prefoldin prudentially interacts with group II chaperonin in its ADP bound open conformation” 33<sup>rd</sup> FEBS congress and 11<sup>th</sup> IUBMB conference, Athens, Greece June30, 2008

Tamotsu Zako, Masafumi Sakono, Naomi Hashimoto, Masaki Ihara and Mizuo Maeda “Formation of Novel Non-toxic Insulin Amyloid Filaments by reducing agent” 8<sup>th</sup> World Biomaterial Congress Amsterdam, Netherlands, May29, 2008

Masafumi Sakono, Tamotsu Zako, Hiroshi Ueda, Masafumi Yohda and Mizuo Maeda “Formation of highly toxic soluble amyloid beta oligomers by the molecular chaperone prefoldin” Cold Spring Harbor Meeting Molecular Chaperons & Stress responses, New York, USA, May 5, 2008

Tamotsu Zako, Yosuke Murase, Andrei Zhukov, Robert Karlsson, Masafumi Shimizu, Ryo Iizuka, Mizuo Maeda, and Masafumi Yohda “Interaction of prefoldin with group II chaperonin in the presence of various nucleotides” 2<sup>nd</sup> World conference of Stress, Budapest, Hunagry, August25 2007

座古保、村瀬陽介、清水雅史、飯塚怜、前田瑞夫、養王田正文「プレフォルディン-シャペロニンの相互作用解析による基質受け渡し機構の解明」蛋白質科学会年会、仙台、2007年 5月 25日

〔図書〕(計1件)

Zako, T., Iizuka, R., Kanzaki, T., Maeda, M. and Yohda, M.  
“Chaperonin and prefoldin - Two molecular chaperones that work cooperatively in archaea and eukaryote” (Invited Review)

in Heat shock proteins :New Research (Edited by Emma Moreland and Camille Vincent), Nova Science Publishers, Inc., New York, USA , (2008) pp. 393-416

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

座古保 (ZAKO TAMOTSU)

独立行政法人理化学研究所・前田バイオ工  
学研究室・専任研究員

研究者番号：50399440

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：