

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20570182

研究課題名(和文) 細胞内におけるシャペロニン機能の動的メカニズム

研究課題名(英文) Dynamic functions of chaperonins in the cell

研究代表者

久保田 広志 (KUBOTA HIROSHI)

秋田大学・工学資源学研究科・教授

研究者番号：80332724

研究成果の概要(和文)：CCT と HSP60 はヒトをはじめとする真核生物において必須の機能を担う分子シャペロンである。CCT は細胞質(サイトゾル)において、HSP60 はミトコンドリアにおいて、それぞれタンパク質のフォールディングを介助することにより、細胞の働きを助けている。本研究では、CCT のもつサブユニット特異的な基質結合の一旦をフォトクロスリンク法により明らかにするとともに、HSP60 のもつ ATP 依存的な複合体形成のメカニズムを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：CCT and HSP60 are molecular chaperones required for eukaryotic cells including human cells. CCT and HSP60 assist in the folding of proteins in eukaryotic cytosol and mitochondria, respectively. Here, we report that individual CCT subunits play distinctive roles in substrate protein recognition and that HSP60 has an unique ATP-dependent assembly system to produce functional complex.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2008年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 2009年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 2010年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,700,000 | 1,110,000 | 4,810,000 |

研究分野：分子細胞生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：分子シャペロン、CCT、フォールディング、基質特異性、サブユニット、タンパク質相互作用、シャペロニン、HSP60

1. 研究開始当初の背景

細胞内で生合成される蛋白質は、アミノ酸の鎖であるポリペプチドとして翻訳されるが、正しい立体構造を獲得しなければ、その機能を発揮することができない。しかしながら、細胞内のタンパク質濃度は非常に高いため、生合成直後のポリペプチド鎖は、他のタンパク質との不必要な相互作用を高頻度に起こしてしまう。その結果、新生ポリペプチド鎖

は、常に変性や凝集の危険にさらされている。このため、分子シャペロンと呼ばれる一連の蛋白質が、翻訳後のペプチド鎖が正しく折り畳まれて機能型の分子構造を形成するまでの過程を介助する。

細胞質シャペロニン CCT は、HSP60 ファミリーに属する分子シャペロンであり、このような働きを担う重要な蛋白質である。特に、ヒトを初めとする全ての真核細胞においてアクチンやチューブリンのフォールディ

ングに必須の分子である (図 1)。CCT は 8 種類ものサブユニットを介した非常に複雑で巧みなシャペロン機能を備えていると考えられ、世界的にも注目されているが、その詳細な作用機構は明らかになっていない。特に、細胞内において CCT が担う機能の詳細は不明なままである。

また、ミトコンドリアには HSP60 というシャペロニンが存在するが、これについても、大腸菌ホモログである GroEL に比べて、研究が大きく遅れており、分子シャペロンとしての詳細な分子メカニズムはよくわかっていない。

2. 研究の目的

最近申請者は、CCT の機能解析に関し、新たに 2 つの大きな発展を得た。

(1) 完全に再構築されたインビトロ翻訳系である PURE SYSTEM に CCT を加える新たなフォールディング評価系を確立して解析を行うことにより、CCT にはフォールディング途中の基質タンパク質中に存在する疎水的 β シート上の疎水性アミノ酸残基を認識し、その凝集を阻止する能力があることを明らかにした (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2006)。

(2) CCT の各サブユニットをほ乳類細胞内の CCT をノックダウンした時、ポリグルタミンのような元々凝集しやすい蛋白質の凝集がさらに促進されることを見出した。この時、蛍光相関分光法 (FCS 法) により、細胞内 CCT 量の低下は、可溶性の小さな凝集体の顕著な増加をもたらすことが解った。さらに、CCT 全サブユニットの強制発現により、ポリグルタミンの凝集と細胞毒性を抑制できることも解った (Nature Cell Biology, 2006)。

CCT の持つ分子シャペロンとしての機能は、異なる性質を持った α から η までの 8 種のサブユニットの各々によって規定されていると考えられる。そこで、8 種類ある CCT サブユニット各々の機能と複合体形成の動的制御のメカニズムを、CCT 複合体の細胞内機能と共に解析することで、この巧妙な分子シャペロンの細胞内における役割を明らかにすることを目的とした。

さらに、HSP60 においては、インビトロの系により複合体を再構築して、その機能の詳細を解析することとした。

3. 研究の方法

完全な無細胞翻訳系である PURE SYSTEM に、フォトクロスリンカー-BPA を結合したアンバーサプレッサー-tRNA を加えることにより、新生ポリペプチドの任意のアミノ酸部位にフォトクロスリンカーを導入できる系を

構築する。そこに、CCT を加えた上で翻訳を行わせた後、各 CCT サブユニットに対する抗体を入れて免疫沈降する。これを、ウエスタンブロット解析することにより、どのサブユニットがどの程度クロスリンクされるのかを解析した。

HSP60 の機能をインビトロで解析するため、ヒト HSP60 とそのコシャペロン HSP10 を大腸菌リコンビナントの系で発現精製した。これを用いて、インビトロで再構築する条件を検討した。

4. 研究成果

PURE SYSTEM に、フォトクロスリンカーを入れた系を用いて、まず、新生ポリペプチドと CCT とがクロスリンクされることを確認した。さらに、これを免疫沈降して、各 CCT サブユニットに対する抗体でウエスタンブロット解析したところ、クロスリンクされる割合が、フォトクロスリンカーを入れる位置等によって、サブユニット間で変化することがわかった。この結果は、各サブユニット間での役割の違いを反映したものと考えられる。

HSP60 については、大腸菌リコンビナントの系を用いて精製し、ATPase 活性のある HSP60-HSP10 複合体をインビトロで再構築することに成功した。HSP60 は ATP 依存性にシングルリングからダブルリングへの移行が起こること、ATP 存在下で HSP60 に HSP10 を加えるとフットボール形の複合体が安定的に形成されること、HSP60 に対する HSP10 の結合が ATP に依存して有意に強くなることがわかった。これらの性質は、大腸菌における HSP60 のホモログである GroEL と異なっており、ミトコンドリアが真核細胞に共生した後、HSP60 が独自に進化させたものと考えられ、ヒトをはじめとした真核生物のタンパク質成熟機構に合わせて進化させたものである可能性が高い。

以上の結果は、CCT と HSP60 という 2 種のシャペロニンが、それぞれ細胞内コンパートメントごとに独自の機能を進化させたことを示している。

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 13 件)

1. Kubota, H., Kitamura, A. and Nagata, K. (2011) Analyzing the aggregation of polyglutamine-expansion proteins and its modulation by molecular chaperones (review). *Methods* 53, 267-274. 査読あり

2. Kubota, H., Yamamoto, S., Itoh, E., Abe, Y., Nakamura, A., Izumi, Y., Okada, H., Iida, M., Nanjo, H., Itoh, H. and Yamamoto, Y. (2010) Increased expression of co-chaperone HOP with HSP90 and HSC70 and complex formation in human colonic carcinoma. **Cell Stress Chaperones** 15, 1003-1011. 査読あり
3. Yamamoto, S., Nakano, S., Owari, K., Fuziwara, K., Ogawa, N., Otaka, M., Tamaki, K., Watanabe, S., Komatsuda, A., Wakui, H., Sawada, K.I., Kubota, H. and Itoh, H. (2010) Gentamicin inhibits HSP70-assisted protein folding by interfering with substrate recognition. **FEBS Lett.** 584, 645-651. 査読あり
4. Hoseki, J., Sasakawa, H., Yamaguchi, Y., Maeda, M., Kubota, H., Kato, K. and Nagata, K. (2010) Solution structure and dynamics of mouse ARMET. **FEBS Lett.** 584, 1536-1542. 査読あり
5. Kitamura, A. and Kubota, H. (2010) Amyloid oligomers: dynamics and toxicity in the cytosol and nucleus (review). **FEBS J.** 277, 1369-1379. 査読あり
6. Kubota, H., Kitamura, A., Itoh H., Kinjo, M. and Nagata, K. (2010) Fluorescently labeled proteins as a tool for analyzing the dynamics of protein quality control in living cells. **Int. J. Soc. Mater. Eng. Resour.** 17, 1-4. 査読あり
7. Ishida, Y., Yamamoto, A., Kitamura, A., Lamande, S.R., Yoshimori, T., Bateman, J.F., Kubota, H. and Nagata, K. (2009) Autophagic elimination of misfolded procollagen aggregates in the endoplasmic reticulum as a means of cell protection. **Mol. Biol. Cell** 20, 2744-2754. 査読あり
8. Ikeda, M., Naitoh, M., Kubota, H., Ishiko, T., Yoshikawa, K., Yamawaki, S., Kurokawa, M., Utani, A., Nakamura, T., Nagata K. and Suzuki, S. (2009) Elastic fiber assembly is disrupted by excessive accumulation of chondroitin sulfate in the human dermal fibrotic disease, keloid. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 390, 1221-1228. 査読あり
9. Kampinga, H.H., Hageman, J., Vos, M.J., Kubota, H., Tanguay, R.M., Bruford, E.A., Cheetham, M.E., Chen, B., Hightower, L.E. (2009) Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins (review). **Cell Stress Chaperones** 14, 105-111. 査読あり
10. Kubota, H. (2009) Quality control against misfolded proteins in the cytosol: a network for

cell survival (review). **J. Biochem.** 146, 609-616. 査読あり

11. Hirayama, S., Yamazaki, Y., Kitamura, A., Oda, Y., Morito, D., Okawa, K., Kimura, H., Cyr, D.M., Kubota, H., and Nagata, K. (2008) MKKS is a centrosome-shuttling protein degraded by disease-causing mutations via CHIP-mediated ubiquitination. **Mol. Biol. Cell** 19, 899-911. 査読あり

12. Ishida, R., Takaoka, Y., Yamamoto, S., Miyazaki, T., Otaka, M., Watanabe, S., Komatsuda, A., Wakui, H., Sawada, K., Kubota, H., Itoh, H. (2008) Cisplatin differently affects amino terminal and carboxyl terminal domains of HSP90. **FEBS Lett.** 582, 3879-3883. 査読あり

13. Kakugawa, T., Yokota, S., Mukae, H., Kubota, H., Sakamoto, N., Mizunoe, S., Matsuoka, Y., Kadota, J., Fujii, N., Nagata, K., Kohno, S. (2008) High serum concentrations of autoantibodies to HSP47 in nonspecific interstitial pneumonia compared with idiopathic pulmonary fibrosis. **BMC Pulm. Med.** 8, 23. 査読あり

[学会発表] (計 32 件)

1. 伊藤禎宣、座古保、ソルヤード・カリン、寺田尚史、田代絵梨佳、北村朗、久保田広志、武藤秀樹、金城政孝、有賀寛芳、前田瑞夫：ポリグルタミンタンパク質凝集における分子シャペロンプレフォルディンの役割。第 10 回日本蛋白質科学会年会、(ポスター発表) 札幌市、2010.6.16-18

2. 久保田広志：蛍光で見る蛋白質品質管理のダイナミクス。平成 22 年度日本分析化学会東北支部若手交流会、(口頭発表) 秋田市、2010.7.2-3

3. 田名邊雅子、宮崎敏夫、石田竜一、高橋弘樹、久保田広志、伊藤英晃：免疫抑制剤 Mizoribine による HSP60 阻害機構の解明。第 5 回臨床ストレス応答学会、(口頭発表) 徳島市、2010.11.19-20

4. 田代絵梨佳、武藤秀樹、座古保、ソルヤード・カリン、宮沢誠、北浦廣剛、北村朗、久保田広志、前田瑞夫、金城政孝、有賀寛芳：分子シャペロン Prefoldin は変異ハンチンチンのオリゴマーおよび凝集形成を阻害して細胞死を減少させる。第 33 回日本分子生物学会年会-第 83 回日本生化学会大会-合同大会、(口頭発表およびポスター発表) 神戸市、2010.12.7-10

5. 北村朗, 稲田のりこ, 久保田広志, 松本弦, 永田和宏, 金城政孝: 筋萎縮性側索硬化症を引き起こす原因タンパク質の脱凝集過程と細胞毒性の関係性. 第33回日本分子生物学会年会-第83回日本生化学会大会-合同大会、(ポスター発表) 神戸市、2010.12.7-10
6. 田代絵梨佳, 武藤秀樹, 座古保, 宮澤誠, 北浦廣剛, 北村朗, 久保田広志, 前田瑞夫, 金城政孝, 有賀寛芳: 分子シャペロン Prefoldin はポリグルタミンの凝集と細胞毒性を減少させる. 第33回日本神経科学大会-第53回日本神経化学会大会-第20回日本神経回路学会大会-合同大会、(ポスター発表) 神戸市、2010.9.2-4
7. Erika Tashiro, Hideki Muto, Tamotsu Zako, Makoto Miyazawa, Hirotake Kitaura, Akira Kitamura, Hiroshi Kubota, Mizuo Maeda, Masataka Kinjo, Hiroyoshi Ariga: Molecular chaperone prefoldin blocks the formation of mutant Huntingtin oligomer and inclusion body, resulting in reduction of its Cytotoxicity. 40th Annual Meeting of the Society for Neuroscience (Neuroscience 2010), (ポスター発表) San Diego, 2010.11.13-17
8. Hiroshi Kubota, Soh Yamamoto, Yuzo Yamamoto and Hideaki Itoh: Formation of HOP-containing chaperone complexes and the effect of 17-AAG, an HSP90 inhibitor, on colon cancer cells. The 3rd International Symposium on Protein Community, (ポスター発表) 奈良市、2010.9.13-16
9. Ryuichi Ishida, Toshihiko Oka, Hiroki Takahashi, Hiroshi Kubota and Hideaki Itoh. ATP-dependent transition of Hsp60 from single to double rings in the presence of cochaperonin Hsp10. The 3rd International Symposium on Protein Community, (ポスター発表) 奈良市、2010.9.13-16
10. Soh Yamamoto, Ganesh Prasad Subedi, Shinya Hanashima, Tadashi Satoh, Yoshiki Yamaguchi, Hiroshi Kubota and Hideaki Itoh Co-chaperone HOP (HSP70/HSP90 organizing protein) has ATPase activity and changes its conformation in the presence of ATP. The 3rd International Symposium on Protein Community, (ポスター発表) 奈良市、2010.9.13-16
11. Akira Kitamura, Masataka Kinjo, Hiroshi Kubota and Kazuhiro Nagata: Dynamics of Aggregation and disaggregation of neurodegenerative disease-causative proteins: International Conference 'Protein folding and neurodegenerative disease' (口頭発表) 京都市、2009.4.6
12. 石田竜一、伊豆原史子、関根和宏、大高慶、久保田広志、伊藤英晃「ミトコンドリア移行シグナル付加 Hsp60 の生理機能解析」第9回日本蛋白質科学会年会 (ポスター発表) 熊本市 2009.5.20-22
13. Hiroshi Kubota, Akira Kitamura, Noriko Inada, Gen Matsumoto, Richard Morimoto, Masataka Kinjo, Kazuhiro Nagata. Aggregation and disaggregation of ALS-linked mutant SOD1 via soluble oligomers in living cells. 第61回日本細胞生物学会大会シンポジウム「タンパク質社会と品質管理」(口頭発表) 名古屋市 2009.6.3
14. Yoshihito Ishida, Akitsugu Yamamoto, Akira Kitamura, Shireen R. Lamandé, Tamotsu Yoshimori, John F. Bateman, Hiroshi Kubota, and Kazuhiro Nagata. Autophagy eliminates misfolded procollagen aggregates in the endoplasmic reticulum for cell survival. Joint meeting of 8th Pan-Pacific Connective Tissue Societies Symposium (PPCTSS), 41st Annual Meeting of the Japanese Society of Connective Tissue Research (JSCTR), and 56th Annual Meeting of the Japan Matrix Club. (ポスター発表) 横須賀市 2009.7.4-7
15. Asami Oguro-Ando, Hiroshi Kubota, Yoriko Atomi, Shoichi Ishiura, Kazuhiro Nagata. Gravity-responsive transcriptional regulation of collagen-specific molecular chaperone HSP47. 日本宇宙生物科学会第23回大会 (口頭発表) つくば市 2009.10.2
16. Hiroshi Kubota, Soh Yamamoto, Yuzo Yamamoto and Hideaki Itoh. Increased expression of HOP and chaperone complex formation in human colonic carcinoma. The 4th International Congress on Stress Responses in Biology and Medicine. Workshop 'Stress Responses in Disease' (口頭発表およびポスター発表) 札幌市 2009.10.6-9 (Abstracts, p169)
17. Soh Yamamoto, Shunsuke Nakano, Hiroshi Kubota and Hideaki Itoh. The antibiotic gentamicin (GM) was specifically bound to HSP70 C-domain and inhibited HSP40/HSC70 chaperone activity. The 4th International Congress on Stress Responses in Biology and Medicine. (ポスター発表) 札幌市 2009.10.6-9
18. Ryuichi Ishida, Yuka Takaoka, Soh Yamamoto, Toshio Miyazaki, Michiro Otaka,

Sumio Watanabe, Atushi Komatsuda, Hideki Wakui, Ken-ichi Sawada, Hiroshi Kubota and Hideaki Itoh. Cisplatin differently affects amino terminal and carboxyl terminal domains of HSP90. The 4th International Congress on Stress Responses in Biology and Medicine. (ポスター発表) 札幌市 2009.10.6-9

19. Hiroshi Kubota, Akira Kitamura, Hideaki Itoh, Masataka Kinjo, and Kazuhiro Nagata. Fluorescently labeled proteins as a tool for analyzing the dynamics of protein quality control in living cells. The Sixth Conference on Materials Engineering for Resources. Keynote session 'New Materials for Life Science-I' (口頭発表) 秋田市 2009.10.22 (Abstracts, p12)

20. 北村朗, 稲田のりこ, 久保田広志, 松本弦, Richard I. Morimoto, 金城政孝, 永田和宏「SOD1 脱凝集過程におけるタンパク質分解経路と細胞毒性の関係について」第 32 回日本分子生物学会年会 (口頭発表およびポスター発表) 横浜市 2009.12.9-12

21. 田代絵梨佳, 武藤秀樹, 座古誠, 宮澤誠, 北浦廣剛, 北村朗, 久保田広志, 前田瑞夫, 金城正孝, 有賀芳寛「MM-1 および Prefoldin がポリグルタミン凝集に与える影響」第 32 回日本分子生物学会年会 (ポスター発表) 横浜市 2009.12.9-12

22. Yoshihito Ishida, Akitsugu Yamamoto, Akira Kitamura, Tamotsu Yoshimori, John F. Bateman, Hiroshi Kubota and Kazuhiro Nagata : Misfolded collagens accumulated in the ER by the absence of HSP47 are disposed via autophagy-lysosome. Cold Spring Harbor Meeting "Molecular Chaperones and stress Response", Cold Spring Harbor (USA), 2008.4.30-5.4

23. 石田義人, 山本章嗣, 北村朗, Shireen R Lamande, 吉森保, John F Bateman, 久保田広志, 永田和宏 : 小胞体に蓄積するミスフォルドコラーゲンの構造依存的な分解経路の仕分け. 第 3 回臨床ストレス応答学会大会, 秋田市, 2008.11.14-15

24. 内藤素子, 久保田広志, 石河利弘, 吉川勝宇, 山脇聖子, 鈴木茂彦, 永田和宏 : 大腸菌多機能プロテアーゼ/シャペロン HtrA/DegP のヒトホモログの一つ HteA1 の発現はケロイドの病期と予後に相関する. 第 3 回臨床ストレス応答学会大会, 秋田市, 2008.11.14-15

25. 大瀧貴子, 山本 聡, 藤原一彦, 小熊恵二, 佐藤昇志, 大高道郎, 久保田広志, 伊藤

英晃 : GGA はヘリコバクターピロリ菌 dnaK (HSP70) のシャペロン活性を選択的に抑制する. 第 3 回臨床ストレス応答学会大会, 秋田市, 2008.11.14-15

26. 伊藤江里, 山本聡, 宮崎敏夫, 小松敦, 涌井秀樹, 澤田賢一, 大高道郎, 久保田広志, 伊藤英晃 : Gentamicin 誘導腎毒性に対する HSP70 の抵抗性. 第 3 回臨床ストレス応答学会大会, 秋田市, 2008.11.14-15

27. 関根和宏, 石田竜一, 野口晋, 山本聡, 大高慶, 伊豆原史子, 涌井秀樹, 澤田賢一, 大高道郎, 久保田広志, 伊藤英晃 : 哺乳類 Hsp60 の生化学的性質の解析. 第 3 回臨床ストレス応答学会大会, 秋田市, 2008.11.14-15

28. 山本聡, 藤原一彦, 涌井秀樹, 山本雄造, 大高道郎, 久保田広志, 伊藤英晃 : HOP ATPase 活性の分子シャペロン複合体に及ぼす影響. 第 3 回臨床ストレス応答学会大会, 秋田市, 2008.11.14-15

29. 尾張健介, 山本聡, 涌井秀樹, 澤田賢一, 小林良二, 久保田広志, 伊藤英晃 : コシャペロン HOP と AnnexinA2 の相互作用解析. 第 3 回臨床ストレス応答学会大会, 秋田市, 2008.11.14-15

30. 北村朗, 久保田広志, 稲田のりこ, 松本弦, Richard I. Morimoto, 金城政孝, 永田和宏 : 分光イメージング法を用いた変異型 SOD1 の凝集体形成と凝集体中間構造の解析—凝集中間体と細胞毒性の関係について—: 第 3 1 回日本分子生物学会年会・第 8 1 回日本生化学会大会-合同大会 (一般口頭発表およびポスター発表), 神戸市, 2008.12.9-12

31. 石田義人, 久保田広志, 北村朗, 山本章嗣, John Bateman, 吉森保, 永田和宏 : 小胞体に蓄積した変異コラーゲンの分解 : オートファジーと ERAD の使い分け. 第 3 1 回日本分子生物学会年会・第 8 1 回日本生化学会大会合同大会 (一般口頭発表およびポスター発表), 神戸市, 2008.12.9-12

32. 久保田広志 : タンパク質品質管理機構の研究 : 平成 20 年度京都大学再生医科学研究所共同研究会 (口頭発表), 京都市, 2009.3.27

〔図書〕 (計 1 件)

1. 久保田広志. (2008) シャペロニン, 蛋白質品質管理, CCT. 蛋白質核酸酵素 53 「キーワード: 蛋白質の一生」遠藤斗志也, 小椋光, 永田和宏, 森和俊, 田口英樹, 吉田賢右編 pp. 942, 967, 1031.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

研究代表者

久保田 広志 (KUBOTA HIROSHI)

秋田大学・工学資源学研究科・教授

研究者番号：80332724