

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24年 4月 27日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21570113

研究課題名（和文）天然変性タンパク質の構造特性とその機能解明

研究課題名（英文）Structural and functional characteristics of natively unfolded protein

研究代表者

河田 康志（KAWATA YASUSHI）

鳥取大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：40177697

研究成果の概要（和文）：タンパク質の構造柔軟性がその機能とどのように関わるかを天然変性タンパク質である $\alpha$ シヌクレインタンパク質やシャペロン等を用いてタンパク質化学的、生化学的、生物物理化学的な側面から詳細な研究を行った。その結果、構造的柔軟性が引き起こす本来のタンパク質が持っている構造特性や構造変化がアミロイド線維凝集を引き起こす引き金となっていることが明らかになり、その機能と深い関係にあることが確かめられた。

研究成果の概要（英文）：In order to understand the relationship between flexibility and function of protein, we investigated intrinsically disordered protein, alpha-synuclein and molecular chaperone, chaperonin in detail from protein chemistry, biochemistry, and biophysical chemistry points of view. We found that the intrinsic flexibility, structural property, and structural changes of polypeptide triggered amyloid fibril formation and also were involved in the function closely.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：タンパク質

## 1. 研究開始当初の背景

遺伝子が規定している産物である酵素・タンパク質が細胞内で合成され、正しい場所で活性を発揮するためには、それぞれの特異的な立体構造をとることが必須であるとこれまででは考えられてきた。しかし、ヒトゲノム解析がなされた後、そのタンパク質産物の実態が分かりつつある現在、その立体構造を必ずしも形成せずに機能を果たすタンパク質も多く存在していることが分かってきた。これらのタンパク質は総称して天然変性タンパク質（Intrinsically Disordered Protein (IDP)）と呼ばれている。これらの

天然変性タンパク質（IDP）は遺伝子発現調節タンパク質やDNAと相互作用するものが多いが、脳神経細胞内に多量に存在しているものもある。その一つは $\alpha$ シヌクレインタンパク質である。この $\alpha$ シヌクレインタンパク質はIDPでありながら、アミロイド線維を形成し、パーキンソン病発症と密接に関連しているが、その本来の機能はまったく分かっていない。

また一方、タンパク質がいかに安定にその活性を正しく維持できるかは、タンパク質そのものの特性とそれらを取り巻く環境に深く関係している。大部分のタンパク質は特異

的な立体構造を形成するが、その途中で正しい立体構造ができない場合、アグリゲーションを形成したり、プロテアーゼに分解されたり、病気の引き金となるアミロイド線維を形成したりする。しかし、これらの現象は細胞内の様々な環境維持システムによって高度に制御されており、いわば、細胞内でタンパク質のクオリティーコントロールが厳格に働いている。この役割を担っているのが分子シャペロンである。細胞内でのタンパク質のコンフォメーション変化（揺らぎ）と凝集・不溶化、さらにそれらに起因する病気の間には密接に分子シャペロンの働きが関係している。従って、生体内で重要な働きをしているタンパク質の大きなコンフォメーション変化と病気との関連性を理解するためには分子シャペロンの機能解析も重要である。

## 2. 研究の目的

本研究では天然変性タンパク質の構造と本来の機能を明らかにするため、細胞内での構造変化に大きな働きをしている分子シャペロンの新規機能開発と共に、天然変性タンパク質の本来の機能的意義に焦点を当てて研究を行い、タンパク質の構造柔軟性と機能との関連を明らかにすることが目的である。

## 3. 研究の方法

シャペロン GroEL や細胞質内型であるグループ II 型シャペロンタンパク質を主に用いて、そのフレキシビリティ、すなわち天然変性領域の新たな機能を遺伝子変異手法、蛋白質工学的的手法、生物物理化学的手法などを駆使して、詳細に明らかにする。一方、アミロイド線維形成を起こす典型的な天然変性タンパク質として、パーキンソン病原因タンパク質である  $\alpha$  シヌクレインと我々が独自に発見した変性 GroES タンパク質を材料として用い、NMR や AFM を駆使しながら、原子レベル、アミノ酸レベルで構造特性や柔軟性について調べた。

## 4. 研究成果

(1) シャペロン GroEL の柔軟性とその機能特性との関連性

大腸菌由来のシャペロン GroEL のサブユニットは赤道ドメイン、中間ドメイン、頂上ドメインの3つからなり、頂上ドメインは中間ドメインと頂上ドメインをつなぐヒンジの働きによって柔軟性に富んでいる。このヒンジ部分の Gly192 をかさ高い Trp 残基に変異すると柔軟性に富んだ頂上ドメインの動きが固定され、コシャペロンである GroES を ATP 非存在下でも結合することが分かった。これはこのヒンジ部分が頂上ドメインの柔軟な動きを制限し GroEL の機能に影響を与えることを示している。

また、GroEL の C 末端領域に存在している天然変性ペプチド領域中にある KNDAAD 配列をタンデムに繰り返して導入した場合、3 回まではシャペロン機能はあまり変化しなかったが、4 回繰り返した場合、シャペロンのオリゴマー構造に変化が起り、機能低下が起こることが分かった。このことは、GroEL の C 末端の柔軟性と KNDAAD 配列が重要で、シャペロン機能に大きな影響を与えることを示している。

さらに、シャペロン GroEL の本来の N 末端と C 末端をリンカーで連結し、新たな N 末端と C 末端を導入することで、シャペロンの機能特性がどのように変化するかを調べた。GroEL の頂上ドメイン内に、新たな N 末端、C 末端を異なる位置に導入したところ、すべての変異体で ATPase 活性は野生型の 80-90% を保持することが分かった。しかし、GroES 存在下では ATPase 活性は野生型と異なり、あまり抑制効果が見られなかった。ロダネーゼを用いたリフォールディング活性も若干低下するものの活性は保持されていた。しかしながら、頂上ドメインの動きは、ストップフロー解析から新たな N 末端と C 末端の導入による柔軟性の向上によって、野生型と大きく異なっていることが明らかになった。

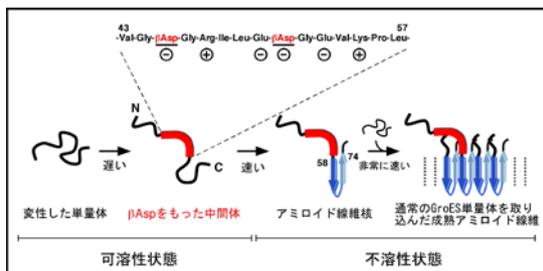
これら一連の実験結果はすべてシャペロン GroEL のポリペプチド鎖の柔軟性がその機能に大きく関わっており、有用であることを示している。

(2) 天然変性タンパク質  $\alpha$  シヌクレインの構造柔軟性とアミロイド線維形成

天然変性状態のタンパク質の代表である  $\alpha$  シヌクレインは、その構造が変化して次第にアミロイド線維を形成し、それが原因となってパーキンソン病を発症する。このタンパク質は溶液中で柔軟性に富んでおり、塩濃度を高くするとコンパクトなコンフォメーションをとり、アミロイド線維を形成することが分かった。そのアミロイド線維核部位ペプチドを蛋白質化学的に同定することに成功した。また、その中でも特に 94 番目の Phe 残基がアミロイド線維形成に重要であることが明らかになった。更にこのペプチドの特性を調べた結果、他のタンパク質のアミロイド線維形成伸張材料として役に立つことが発見した。さらに、このペプチドはアミロイド線維伸張ペプチドとして、脳神経変性病の診断材料として役に立つ可能性があることを示し、応用面においても興味深い結果であることを明らかにした。

(3) 変性させた GroES タンパク質のアミロイド線維形成中間体の同定とアミロイド線維形成機構の解明

タンパク質のポリペプチドに柔軟性をあえて持たせるために、変性剤である塩酸グアニジン中で完全に変性させ、ランダム構造をとらせた GroES タンパク質を天然変性タンパク質のモデルとして用いて研究を行った。この変性 GroES は典型的なアミロイド線維を形成することが分かっている。この GroES タンパク質の NMR 構造を明らかにするとともに、そのアミロイド線維形成反応の初期構造を同定することに成功した。GroES タンパク質は時間の経過とともにランダム構造からアミロイド線維核を形成し、その初期に、Asn-Gly 部位においてペプチド結合が主鎖から側鎖に転移が起ることを明らかにした。その部位の Asn 残基を Ala 残基に変異させると転移中間体が観測されず、アミロイド線維の形成が抑制されたことから裏付けられている。この Asn-Gly の構造転移が引き金となってアミロイド線維核形成を誘導していることは、天然変性タンパク質の特徴の一つとして大いに注目される。以下の図にその結果の概要をまとめた。

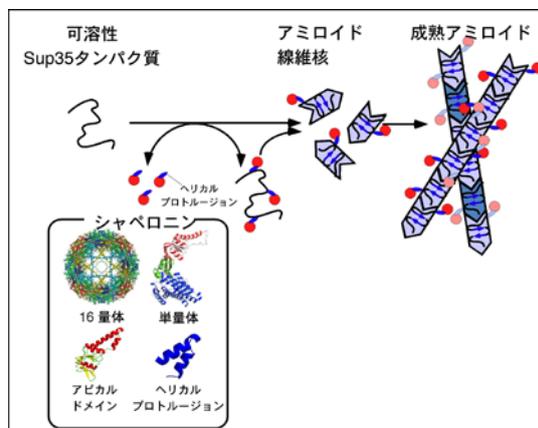


(4) *Thermoplasma acidophilum* 由来の単量体シャペロニンのアミロイド線維凝集抑制に対する効果

古細菌の一種である *Thermoplasma acidophilum* 由来のシャペロニンの単量体タンパク質は、マンガンやコバルト金属イオン存在下で、様々なヌクレオチド加水分解活性を有していることを発見した。特に、AMP 加水分解活性は初めての例である。通常のオリゴマー構造から単量体に解離することで柔軟性が増加したためであると考えられた。

また、*T. acidophilum* 由来のシャペロニンは細胞内で単量体として多く存在していることを明らかにしており、この意義を天然変性タンパク質の一つである Sup35 タンパク質のアミロイド線維形成と絡めて研究した。すなわち、この単量体シャペロニンの機能を Sup35 タンパク質のアミロイド線維形成抑制効果を指標にして蛋白質化学的に詳細に調べた。その結果、Sup35 タンパク質のアミロイド線維形成を抑制する働きがあることを発見した。単量体シャペロニンは3つのドメインからなっており、その中の頂上ドメインが Sup35 のアミロイド線維形成抑制効果に効いていること、さらにその中に存在するヘリ

カルプロトレーション部分に相当するペプチドだけでも効果があることを明らかにした。これらの結果は、シャペロニンのサブユニットとしての新たな機能を示しており、大いに注目すべき例である。以下の図にこの結果の概要をまとめた。



## 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12件)

① Suppression of Sup35 amyloid fibril formation by group II chaperonin from *Thermoplasma Acidophilum*

Kentarō Noi, Aya Kitamura, Hidenori Hirai, Kunihiro Hongo, Toshihiko Sakurai, Tomohiro Mizobata, and Yasushi Kawata

*American J. Mol. Biol.* in press (2012)

② Varied effects of *Pyrococcus furiosus* prefoldin and *P. furiosus* chaperonin on the refolding reactions of substrate proteins

Kunihiro Hongo, Hiroshi Itai, Tomohiro Mizobata, and Yasushi Kawata

*J. Biochem.* 151 (4), 383-390 (2012)

③ Probing the Functional Mechanism of *Escherichia coli* GroEL Using Circular Permutation

Tomohiro Mizobata, Tatsuya Uemura, Kazuhiro Isaji, Takuma Hirayama, Kunihiro Hongo, and Yasushi Kawata

*PLoS ONE*, 6 (10), e26462 (2011)

④ Covalent structural changes in unfolded GroES that lead to amyloid fibril formation detected by NMR: Insight into intrinsically disordered proteins

Hisanori Iwasa, Shunsuke Meshitsuka, Kunihiro Hongo, Tomohiro Mizobata, and Yasushi Kawata

*J. Biol. Chem.* 286 (24), 21796-21805 (2011)

⑤ Evaluation of A $\beta$  fibrillization inhibitory effect by a PEG-peptide conjugate based on an A $\beta$  peptide fragment with intramolecular FRET

Toshihiko Sakurai, Tomoki Iwasaki, Takashi Okuno, Yasushi Kawata, and Naoki Kise

*Chem. Commun.* **47** (16), 4709-4711 (2011)

⑥ Isolation of short peptide fragments from  $\square$ -synuclein fibril core identifies a residue important for fibril nucleation: A possible implication for diagnostic applications

Hisashi Yagi, Hideki Takeuchi, Shihō Ogawa, Naomi Ito, Isao Sakane, Kunihiro Hongo, Tomohiro Mizobata, Yuji Goto, and Yasushi Kawata

*Biochim. Biophys. Acta/Proteins and Proteomics* **1804** (10), 2077-2087 (2010)

⑦ A potentially versatile nucleotide hydrolysis activity of group II chaperonin monomers from *Thermoplasma acidophilum*

Kentaro Noi, Hidenori Hirai, Kunihiro Hongo, Tomohiro Mizobata, and Yasushi Kawata

*Biochemistry* **48** (40), 9405-9415 (2009)

⑧ Gly192 at hinge 2 site in the chaperonin GroEL plays a pivotal role in the dynamic apical domain movement that leads to GroES binding and efficient encapsulation of substrate proteins

Kodai Machida, Ryoko Fujiwara, Tatsuhide Tanaka, Isao Sakane, Kunihiro Hongo, Tomohiro Mizobata, and Yasushi Kawata

*Biochim. Biophys. Acta/Proteins and Proteomics* **1794** (9), 1344-1354 (2009)

[学会発表] (計58件)

① アントシアニンによる神経変性病原因タンパク質のアミロイド線維形成抑制に関する *in vitro* と *in vivo* 研究

河田康志, 鎌田光博, 渡辺保裕, 小林真菜, 吉田早穂, 田村哲也, 本郷邦広, 溝端知宏, 三浦典正, 中島健二, 小林沙織

第84回日本生化学会大会, 2011年9月24日, 京都

② シャペロニン GroEL の機能的構造変化の中心点 Hinge II 部位の Gly192 残基の変異体機能解析

荒木紀帆, 和田翼, 町田広大, 本郷邦広, 溝端知宏, 河田康志

第84回日本生化学会大会, 2011年9月23日, 京都

③ GroEL 円順列変異体 CP254 の構造・機能相関解析

岡田拓也, 植木裕士, 植村達也, 本郷邦

広, 河田康志, 溝端知宏

第84回日本生化学会大会, 2011年9月23日, 京都

④  $\alpha$ シヌクレイン蛋白質のアミロイド線維核部位に位置する Phe 94 の線維形成における役割

伊藤有未, 武内英樹, 本郷邦広, 溝端知宏, 河田康志

第11回日本蛋白質科学会年会, 2011年6月9日, 吹田

⑤ 天然変性蛋白質  $\alpha$ -synuclein のアミロイド線維伸張直接観察

八木寿梓, 武内英樹, 水野愛子, 河田康志, 後藤祐児

第11回日本蛋白質科学会年会, 2011年6月8日, 吹田

⑥ *T. acidophilum* シャペロニン本来の基質蛋白質の同定

石橋利嗣, 本郷邦広, 溝端知宏, 河田康志

第11回日本蛋白質科学会年会, 2011年6月7日, 吹田

⑦ Role of natively unstructured polypeptide: Molecular chaperone GroEL and alpha-synuclein (招待講演)

Yasushi Kawata

The 1st International Symposium on Intrinsically Disordered Proteins (Yokohama) (January 28, 2011)

⑧ Detection of the conformational change by NMR that leads to GroES amyloid fibril formation from a disordered state

Hisanori Iwasa, Shunsuke Meshitsuka, Kunihiro Hongo, Tomohiro Mizobata, and Yasushi Kawata

The 3<sup>rd</sup> International Symposium on Protein Community (Nara, Sep. 14, 2010)

⑨ Isolation of short peptide segments from  $\square$  lpha-synuclein fibril core identifies a residue important for fibril nucleation

Yasushi Kawata, Hisashi Yagi, Hideki Takeuchi, Kunihiro Hongo, Tomohiro Mizobata, and Yuji Goto

The 24th Protein Society Meeting (San Diego), (August 4, 2010)

⑩ Rearrangement reaction at Asn-Gly of GroES enhances a conformation that leads to amyloid fibril formation in early step

Hisanori Iwasa, Shunsuke Meshitsuka, Kunihiro Hongo, Tomohiro Mizobata, and Yasushi Kawata

The 24th Protein Society Meeting (San Diego), (August 2, 2010)

⑪ NMRによるGroESアミロイド線維中間体の形成メカニズムと植物性低分子化合物による阻害効果の評価

岩佐尚徳, 吉田早穂, 亀田啓, 飯塚舜介,

本郷邦広, 溝端知宏, 河田康志

BMB2010: 第33回日本分子生物学会年会,  
第83回日本生化学会大会, 2010年12月9  
日(神戸)

⑫ ポリフェノールによる神経変性病原因タ  
ンパク質のアミロイド線維の抑制と分解

河田康志, 小林真菜, 田村哲也, 岩佐尚徳,  
小林沙織

BMB2010: 第33回日本分子生物学会年会,  
第83回日本生化学会大会, 2010年12月7  
日(神戸)

⑬ GroES のアミロイド線維形成の初期過程  
には核部位直前のアミノ酸配列が関与する

岩佐尚徳, 飯塚舜介, 本郷邦広, 溝端知宏,  
河田康志

第10回日本蛋白質科学会年会, 2010年6  
月16日, 札幌

⑭ Gly192 at hinge 2 site in the chaperonin  
GroEL plays a pivotal role in the dynamic  
apical domain movement that leads to GroES  
binding and efficient encapsulation of  
substrate proteins

Yasushi Kawata, Kodai Machida, Ryoko  
Fujiwara, Tatsuhide Tanaka, Isao Sakane,  
Kunihiro Hongo, and Tomohiro Mizobata

The 23rd Protein Society Meeting  
(Boston), (July 26, 2009)

⑮ コンヤペロニン GroES のアミロイド線維  
形成と細胞毒性

吉田早穂, 岩佐尚徳, 本郷邦広, 溝端知宏,  
河田康志

第82回日本生化学会大会, 2009年10月  
22日, 神戸

⑯ 天然変性タンパク質のコンフォメーショ  
ン変化, アミロイド線維形成, 細胞毒性(招  
待講演)

河田康志

蛋白研究所セミナー「蛋白質立体構造を基  
盤とするプリオン現象の解明と制御」,

2009年7月14日, 大阪

⑰ 古細菌 *Thermoplasma acidophilum* 由来単  
量体シャペロニンの金属特異的新規機能の  
解析

野井健太郎, 平井秀憲, 本郷邦広, 溝端知  
宏, 河田康志

第50回日本生化学会中国四国支部例会,  
2009年5月15日, 鳥取

[産業財産権]

○出願状況(計1件)

名称: アミロイド線維伸張ペプチド

発明者: 河田康志, 溝端知宏, 本郷邦広, 武  
内英樹

権利者: 鳥取大学

種類: 特許

番号: 特願 2009-277681

出願年月日: 平成21年12月7日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.bio.tottori-u.ac.jp/~prot/main.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河田 康志 (KAWATA YASUSHI)

鳥取大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号: 41077697

(2) 連携研究者

溝端 知宏 (MIZOBATA TOMOHIRO)

鳥取大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号: 50263489