

機関番号：34304

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21770107

研究課題名（和文） 大腸菌 Hsp90 (HtpG) のリボソーム形成における
シャペロン機能の解明

研究課題名（英文） Functional analysis of E. coli Hsp90 (HtpG) to ribosome biogenesis

研究代表者

元島 史尋 (MOTOJIMA FUMIHIRO)

京都産業大学・総合生命科学部・助教

研究者番号：70372464

研究成果の概要（和文）：我々は 45°C 最少培地にて生育した大腸菌において His-tag 付き HtpG 発現させたとき、50S リボソームタンパク質である L2 と HtpG が複合体を形成していることを発見した。L2 は HtpG の ATP 加水分解活性を 12 倍に上昇させた。また HtpG はリボソームサブユニット画分に現れたことから、HtpG は L2 だけではなく、様々なリボソームタンパク質に結合してリボソーム生合成に働いていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：We found that a 50S ribosomal protein L2 was purified as a complex with His-tagged HtpG from *Escherichia coli* cultured in minimum medium at 45°C. L2 specifically activated ATPase of HtpG more than ten-fold. HtpG was also found in fractions of 30S and 50S ribosome subunits *in vivo*. These results suggested that HtpG associates with various ribosomal proteins including L2 as a client protein and contributes for ribosome biogenesis.

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	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：変性とフォールディング、分子シャペロン

1. 研究開始当初の背景

細胞内では分子シャペロンと呼ばれる蛋白質が、熱などにより変性した蛋白質のフォールディングを援助して細胞機能を維持している。他の分子シャペロンとは異なり、Hsp90 はフォールディング最終段階にある特定のタンパク質に結合し、そのリガンド結合などを援助するという特異なシャペロン機能を持っている。

Hsp90 の基質タンパク質の多くは、キナーゼ、ホルモンレセプター、がん抑制タンパク質であり、Hsp90 の阻害剤は抗がん作用を発揮することから注目が集められている。近年 Hsp90 の X 線結晶構造から、Hsp90 は ATP 加水分解を伴って大きく構造変化することがわかった。しかしその構造変化がシャペロン機能にどう寄与しているのか全くわかっていない。

バクテリアの HtpG は Hsp90 ファミリーに

属しており、真核生物のサイトゾルの Hsp90、小胞体の Grp94、ミトコンドリアの TRAP1 と相同性が高いことが知られている。Hsp90 がさまざまなコシャペロンと結合するのに対し、Grp94, TRAP1, HtpG ではコシャペロンは見つかっていないことから、HtpG は TRAP1, Grp94 の機能と類似していることが予想される。真核生物の Hsp90, Grp94 が生育に必須であるのに対し、バクテリアの HtpG は必須ではない。このためか発見以後 20 年経つても基質タンパク質すら同定されていない。大腸菌 HtpG は結晶構造解析などが進んでいることから、基質タンパク質を同定することで解明が飛躍的に進むと考えた。そこで私は大腸菌 HtpG を研究対象としてコシャペロンに関わらないプリミティブなシャペロン機能を生化学的および構造学的に解明することを最終目標として研究を開始した。

2. 研究の目的

本研究は HtpG が 70S リボソーム形成を促進するメカニズムを生化学的および構造学的に解明することを目標としている。HtpG と基質タンパク質複合体の構造解析が成功すれば、生化学的解析の結果を融合させることで HtpG の構造変化とシャペロン機能の相関関係を解明できると期待している。HtpG のシャペロン機能は Hsp90 ファミリー全体に共通の機能を反映していると考えられ、Hsp90 研究にとって大変有益な情報になると確信している。

3. 研究の方法

HtpG と L2 との結合様式、および HtpG の活性化機構を生化学的解析と構造学的解析の 2 つによって詳細に調べる。HtpG, L2 の変異体およびドメイン変異体を用いて結合を解析することで HtpG と L2 の結合部位および結合様式についての情報が得られる。HtpG の ATP 加水分解活性の上昇は結合の指標となるだけでなく、解離定数も同定できるため解析に有効である。さらにリボソーム形成における HtpG の機能を *in vitro* で測定を可能にするために、何らかの方法を用いて L2 が存在しない 50S リボソーム中間体を効率的に用意する実験系を確立する必要がある。

構造解析は X 線結晶構造解析に加え、電子顕微鏡解析、X 線小角散乱 (SAXS) を用いる予定である。これらはカリフォルニア大学 David Agard 博士との共同研究で行っている。

4. 研究成果

HtpG に結合するタンパク質を様々な培養条件においてスクリーニングしたところ、リボソームタンパク質 L2 が発見された(図 1)。

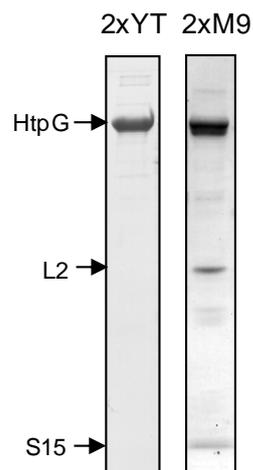


図 1. HtpG に結合するタンパク質のスクリーニング

一般的に分子シャペロンはその基質である変性蛋白質を結合すると ATP 加水分解活性が上昇するという特性を持っている。真核生物の Hsp90 にも見られる現象である。そこで L2 が HtpG の ATPase 活性を上昇させるか確かめたところ、HtpG は L2 特異的に ATPase が上昇することもわかった (図 2)。

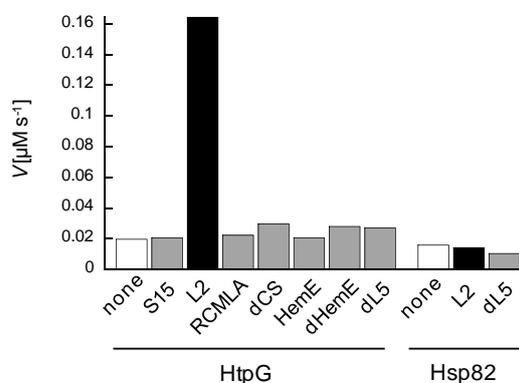


図 2. L2 は HtpG の ATP 加水分解活性を特異的に上昇させる

HtpG が L2 によって ATP 加水分解活性が上昇することを利用して HtpG と L2 のアフィニティー (解離定数) を計算したところ、 $0.3 \mu\text{M}$ と求められた (図 3)。

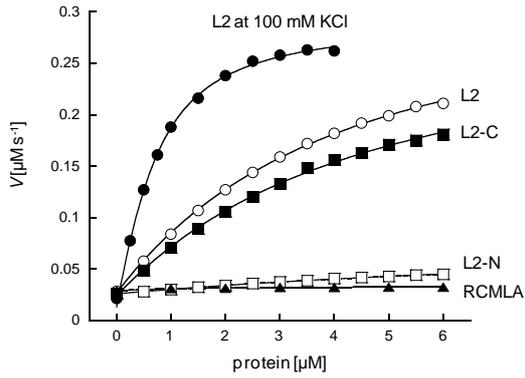


図 3. HtpG と L2 のアフィニティーの見積

HtpG は L2 を特異的に認識するが、L2 のどんな特徴を認識しているかはっきりしない。そこで変性蛋白質と結合することが知られている他の分子シャペロン (DnaKJE および GroELS) と L2 との結合を確かめたところ、これらの分子シャペロンも ATP 加水分解活性が上昇した (図 4, HtpG と DnaKJE のみ表示)。しかし高塩濃度ではいずれの分子シャペロンの ATP 加水分解活性も上昇しなかったことから、L2 は生理塩濃度 (約 150 mM KCl) では変性状態であり、HtpG は変性した L2 にのみ結合できることが確認された。

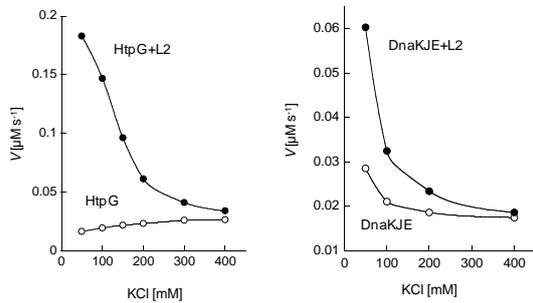


図 4. L2 による ATP 加水分解活性の活性化と塩濃度との関係

以上の研究結果は 2010 年 *Biochem. Biophys. Res. Commun.* に掲載された。

さらに我々は原核生物の HtpG (Hsp90) と DnaK (Hsp70) の間に協同的な機能があると予想した。真核生物では Hsp90 と Hsp70 がコシャペロンを介して結合し、協同的にフォールディングを援助することが知られている。大腸菌 HtpG と DnaK の存在下での ATP 加水分解を測定したところ、L2 存在下に限り HtpG と DnaK は互いに活性化することを見いだした (図 5)。したがって HtpG は DnaK-L2 複合体に結合することが可能であることが示唆された。

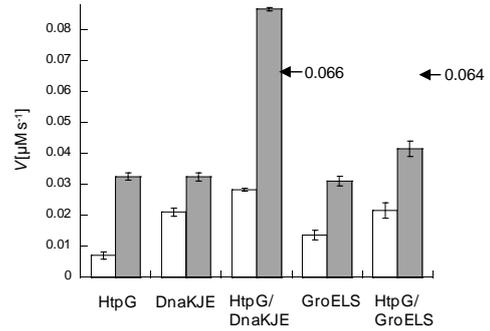


図 5. 他の分子シャペロン ATPase 活性の上昇

HtpG がリボソーム形成に関わる多くの因子がリボソームサブユニットに結合することが知られている。実際に HtpG は 30S, 50S リボソームサブユニットのフラクションに現れたことから、HtpG はリボソームサブユニットの形成に関わっていることが示唆された (図 6)。

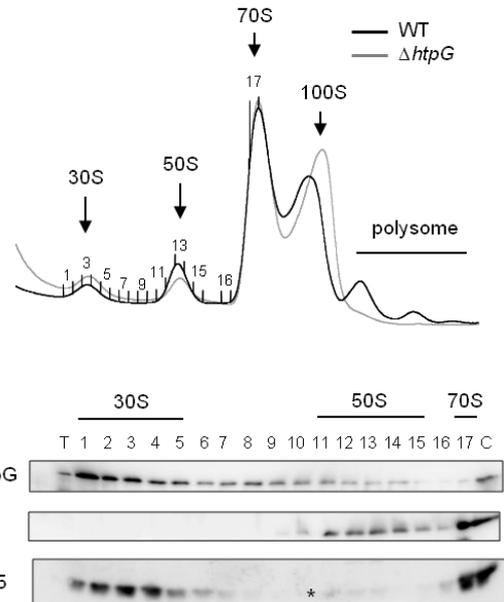


図 6. リボソーム画分に存在する HtpG の検出 (ウェスタンブロット)

今後は HtpG がリボソーム形成に具体的などのような働きをするのかを解明する予定である。この研究により、Hsp90 が変性タンパク質に対しどのように働いて援助を行うのか、そのメカニズムが明らかになると考えている。

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1件)

① Motojima-Miyazaki Y, Yoshida M, Motojima F., Ribosomal protein L2 associates with *E. coli* HtpG and activates its ATPase activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 400(2), 241-245 (2010).

(査読有)

[学会発表] (計2件)

①元島 (宮崎) 優子、元島 史尋、吉田 賢右 *E. coli* HtpG specifically associates with ribosomal protein L2 and DnaK to form a ternary complex.

日本生化学会、2010年12月9日、神戸ポートアイランド

②元島 (宮崎) 優子、元島 史尋、吉田 賢右

リボソームタンパク質 L2 は大腸菌 Hsp90 (HtpG) の基質タンパク質である

日本生化学会、2009年10月22日、神戸ポートアイランド

6. 研究組織

(1)研究代表者

元島 史尋 (MOTOJIMA FUMIHIRO)

京都産業大学・総合生命科学部・助教

研究者番号：70372464