

## 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5月23日現在

機関番号：12608

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22870010

研究課題名（和文）大腸菌シャペロンによるタンパク質凝集抑制効果の大規模解析

研究課題名（英文）Global analysis of aggregation-inhibition effects of molecular chaperones

研究代表者

丹羽 達也 (NIWA TATSUYA)

東京工業大学・大学院生命理工学研究科・助教

研究者番号：50588530

研究成果の概要（和文）：約800種類のフォールディング（立体構造形成）しにくい大腸菌細胞質タンパク質に対して、大腸菌の細胞質で働く主要な3種の分子シャペロン（タンパク質のフォールディングを助ける機能を持つタンパク質）を作用させてその効果を網羅的に調べた結果、約800個のうちほとんどが2種類のシャペロンのどちらかによって凝集を形成しなると、及び3種のシャペロンを同時に作用させるとほぼ全てのタンパク質が凝集を形成せず、水に溶けるようになることが明らかとなりました。

研究成果の概要（英文）：Comprehensive analysis of aggregation-inhibition effects of three major molecular chaperones working in *Escherichia coli* was conducted for ~800 aggregation-prone cytosolic proteins. The results revealed that many of the ~800 aggregation-prone proteins were solubilized by either one of the two chaperones and most of the proteins that were not solubilized by either one of the three were solubilized by the combination of the three chaperone.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,260,000	378,000	1,638,000
2011年度	1,080,000	324,000	1,404,000
総計	2,340,000	702,000	3,042,000

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：タンパク質のフォールディング、タンパク質凝集、分子シャペロン

## 1. 研究開始当初の背景

タンパク質はあらゆる生命の活動を担う生体分子であり、20種類のアミノ酸が様々な並び方で繋がった「ひも」状の物質です。この「ひも」がそれぞれの種類に固有な「かたち（立体構造）」を形成することによって、機能を発揮します。分子シャペロンはこの折れたたみを助けるタンパク質であり、生命活動の維持になくてはならない存在です。シャ

ペロンがないと折れたたみができず、タンパク質としての機能を失った「凝集体」と呼ばれる状態になってしまうことが多々あります。

## 2. 研究の目的

私たちは過去の研究において、大腸菌の全タンパク質（約4,000種類）のうち約800種

類が凝集を形成しやすいことを明らかにしました。これらのタンパク質は細胞内ではシャペロンの助けを得ることで固有の「かたち」を取ると考えられますが、実際にどのタンパク質がどのシャペロンの助けを必要とするかは明らかとなっておりません。そこで本研究では大腸菌で働く主要な3種のシャペロンについて、約800個の凝集性タンパク質の凝集形成を解消する効果がどの程度あるかを網羅的に調べ、細胞内でのフォールディングを再現することを試みました。

### 3. 研究の方法

シャペロンの凝集抑制効果を調べるための実験手法として、過去の研究で用いたPUREシステムという試験管内タンパク質合成手法を利用しました。通常の試験管内タンパク質合成手法は反応液中に様々なシャペロンを含むため、個別のシャペロンの効果を調べるのに適していませんが、PUREシステムは反応液にシャペロンタンパク質を一切含まないため、効果を調べたいシャペロンを加えることで個々のシャペロンの効果を正確に調べることができます。本研究ではシャペロニン (GroEL) など3種のシャペロンを研究対象として用いました。これら3種のシャペロンを約800種の凝集性の強いタンパク質に対して別々に作用させ、凝集形成がどの程度減少するかを網羅的に調べました (図1)。

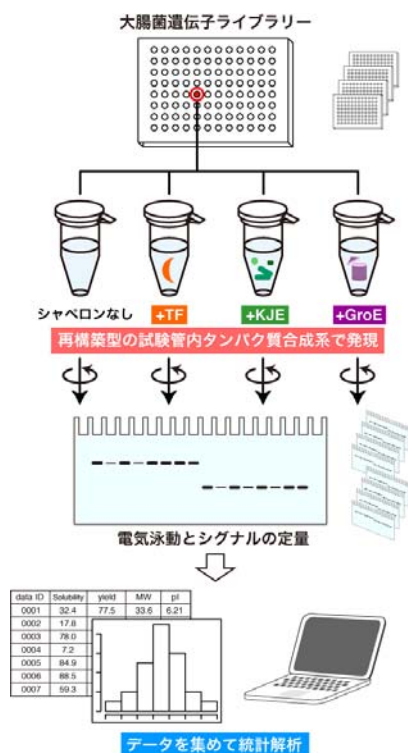


図1 実験方法の模式図

### 4. 研究成果

シャペロニンか DnaK (Hsp70) と呼ばれるシャペロンがあると全体の約7割のタンパク質が水に溶けやすくなることがわかりました (図2)。この2種が作用するタンパク質群はその多くが重複していましたが、2種のシャペロンがどのようなタンパク質に作用しやすいかについて詳細な解析を行った結果、分子量や立体構造の特徴などの性質について差がみられました。

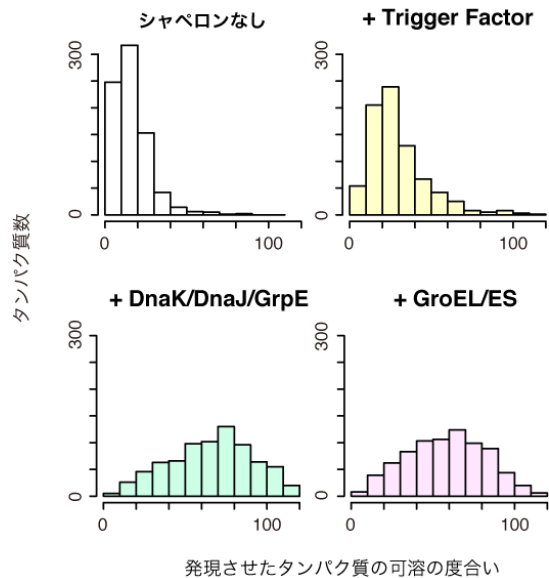


図2 3種のシャペロン単独添加での凝集抑制効果のヒストグラム

さらに、どのシャペロンを加えても水に溶けやすくならなかったタンパク質に対して、複数のシャペロンを加えたところ、ほとんどのタンパク質が水に溶けやすくなりました (図3 次頁)。この結果はこれらのシャペロンが協同してタンパク質の凝集抑制効果を発揮していることを反映しており、細胞内でのフォールディングを試験管内で再現したと言えます。

この実験で得られたデータセット (約800個×3種のシャペロンの効果) は、シャペロンの作用機構の詳細な解析や、タンパク質一般に広く通用する凝集になりやすいタンパク質の可溶化手法の確立に向けた研究に役立つことが期待されます。タンパク質の可溶化法の一般則が見いだされれば、抗体医薬などの創薬やタンパク質の工業的利用などの分野に非常に有用な知見となります。

本研究で得られたデータセットはパブリックデータベースとして一般に公開されて

おり、大学、企業を問わずタンパク質を用いた基礎研究・応用研究に広く利用されることが期待されます。

データベースの名称：eSOL データベース  
<http://tp-esol.genes.nig.ac.jp/>  
(Google 検索で「eSOL、データベース」で検索可能です)

eSOL データベースは国立遺伝学研究所の菅原秀明教授らによって作成、運営されています。

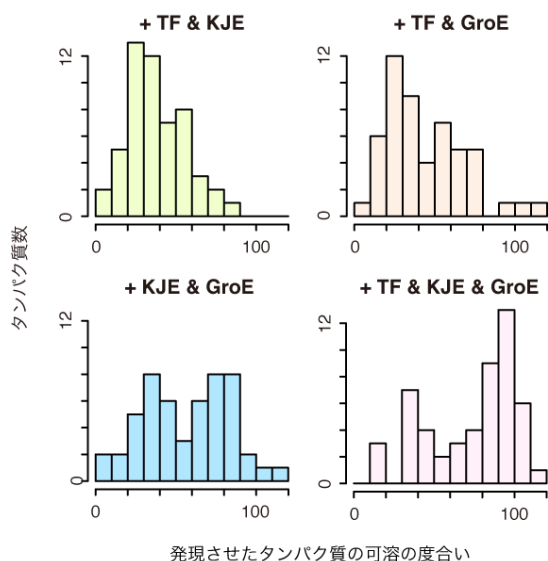


図3 複数種類のシャペロンを用いた際の凝集抑制効果のヒストグラム

## 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3件)

① Tatsuya Niwa, Takashi Kanamori, Takuya Ueda, Hideki Taguchi

Global analysis of chaperone effects using a reconstituted cell-free translation system

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 査読有 Early Edition, (2012)

② Kazuhiro Takemoto, Tatsuya Niwa, Hideki Taguchi

Difference in the distribution pattern of substrate enzymes in the metabolic network of *Escherichia coli*, according to chaperonin requirement.

*BMC Systems Biology* 査読有  
5:98 (2011)

③ Yoshihiro Sasaki, Wakiko Asayama, Tatsuya Niwa, Shin-ichi Sawada, Takuya Ueda, Hideki Taguchi, Kazunari Akiyoshi

Amphiphilic Polysaccharide Nanogels as Artificial Chaperones in Cell-Free Protein Synthesis.

*Macromolecular Bioscience* 査読有  
11(6):814-20 (2011)

[学会発表] (計2件)

① 丹羽達也、上田卓也、田口英樹、無細胞蛋白質合成系を利用した蛋白質凝集の網羅的解析、公開シンポジウム「蛋白質の機能を解き明かす多彩なアプローチ」(招待講演)、2011年10月17日、横浜市立大学 鶴見キャンパス

② 丹羽達也、上田卓也、田口英樹、再構築型生体外蛋白質合成系を用いた分子シャペロンによる凝集抑制効果の網羅解析、第10回日本蛋白質科学会年会、2010年6月17日 札幌コンベンションセンター

[その他]

本研究の成果が国立遺伝学研究所の菅原秀明教授らによってパブリックデータベースとして公開されました。

データベースの名称：eSOL データベース  
<http://tp-esol.genes.nig.ac.jp/>  
(Google 検索で「eSOL、データベース」で検索可能)

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

丹羽 達也 (NIWA TATSUYA)  
東京工業大学・大学院生命理工学研究科・  
助教  
研究者番号：50588530

(2)研究分担者 ( )

研究者番号：

(3)連携研究者 ( )

研究者番号：

(4)研究協力者

田口 英樹 (TAGUCHI HIDEKI)  
東京工業大学・大学院生命理工学研究科・  
教授  
研究者番号：40272710