

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24370064

研究課題名(和文) グループ2型シャペロニンにおけるサブユニット間協調作用機構の解明

研究課題名(英文) Studies on the subunit cooperative mechanism in the reaction cycle of group 2 chaperonin

研究代表者

養王田 正文 (YOHDA, MASAFUMI)

東京農工大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：50250105

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円

研究成果の概要(和文)：細胞質におけるタンパク質品質管理において重要なグループ2型シャペロニンの反応機構の解明を目指して研究を行った。ストップ・フロー法及びX線一分子追跡法を用いた解析により、構造変化過程を明らかにした。まず、ATP結合により各サブユニットが構造変化し、サブユニット間の協調作用によるClosed型に構造転移する、さらにATP加水分解に伴う回転運動によりタンパク質のフォールディングを行う。最後に逆に回転することによるopen型に構造転移し、フォールドしたタンパク質が放出される。また、野生型リングと変異型リングで構成されるアシメトリック体の構築に成功し、2つのリングが独立して機能することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Group 2 chaperonin (CPN) plays important roles in proteostasis in cytosol of eukaryotes or archaea. The aim of this study is to reveal the detailed protein folding mechanism of CPN. By kinetic analyses using stopped-flow fluorometry and diffracted X-ray tracking, we could dissect the conformational change process of CPN. ATP binding to each subunit causes conformational change and cooperation of subunits in the ring induces transition from open to closed conformation. Then, the ring twisted counterclockwise in ATP hydrolysis manner to induce folding of the protein in the cavity. Subsequently, the ring reverts to the original state by a clockwise twist to release the folded protein. Finally, we have succeeded to construct asymmetric CPN, CPN-ASP, in which one ring is composed of wild type subunits and the other one of mutant subunits. By characterizing CPN-ASP, we have shown that the inter-ring communication is dispensable in the reaction cycle of CPN.

研究分野：生化学、生物工学、構造生物学

キーワード：フォールディング シャペロン 構造変化機構 古細菌

1. 研究開始当初の背景

細胞内のタンパク質の構造形成や分解は分子シャペロンにより制御されている。シャペロニンは分子シャペロンの代表的存在であり、これまで多くの研究が行われている。シャペロニンは1型と2型に大別され、グループ1型は真正細菌やオルガネラに、グループ2型は真核生物や古細菌の細胞質に存在する。シャペロニンは分子量約 60kDa のサブユニットから構成された2重リング構造を特徴としており、リング内に変性タンパク質を取り込み、ATP 依存的にタンパク質のフォールディングを行う。グループ1型シャペロニンは大腸菌の GroEL を用いて詳細な研究が進められている。GroES の7量体がリングの穴の蓋として機能し、その開閉に伴う構造変化がフォールディングに重要であることが分かっている。一方、グループ2型シャペロニンは GroES のようなコシャペロニンを必要とせず、Apical ドメインに存在する Helical Protrusion と呼ばれる領域が Built-in Lid として機能していることが明らかになっており、ATP 依存的な蓋の開閉による構造変化によりタンパク質フォールディングが行われることが分かっている。しかし、グループ1型と比べて詳細な構造変化・フォールディング機構の解明は遅れている。最近になって、グループ2型シャペロニンの Open 状態での構造が解明された()。この結果から、グループ2型シャペロニンの構造変化は1型とは大きく異なること、さらに Closed 構造になる段階でリングのねじれがあることが確認された。我々は、高いタンパク質フォールディング活性を有する超好熱性古細菌 *Thermococcus* strain KS-1 由来2型シャペロニンをを用いてタンパク質フォールディング機構の解明を進めており、世界的にも高く評価されている() (図1)。

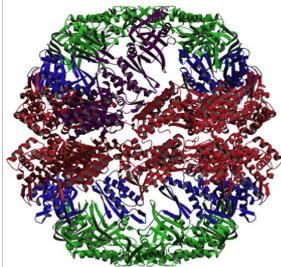


図1 *Thermococcus* strain KS-1 由来2型シャペロニンの結晶構造

2. 研究の目的

1型シャペロニンではリング内及びリング間の協調作用が反応サイクルにおいて重要であることが知られている。我々は、X線分子追跡法(DXT)によりシャペロニンのリングの開閉運動を1分子レベルで観察することに成功した。その結果、ATPの結合により各

サブユニットが動き、構造から予測されたリングのねじれ運動が起きることを証明した。さらに、このねじれ運動によりシャペロニンの空洞内に閉じ込められたタンパク質がフォールドすることを示唆する結果も得た。以前、我々は、連結型シャペロニンをを用いてリング内の協調作用機構を解析する実験を行い、ATP結合・加水分解による各サブユニットが構造変化し部分的に閉じた状態になり、その後 Helical Protrusion 間の相互作用に伴う全体の構造変化で完全に閉じた構造になることで、空洞内のタンパク質フォールディングが促進されることを示した()。これらの結果から、DXTで観察されたねじれ運動にはATPの加水分解の他、Helical Protrusion 領域を介したリング内サブユニット協調作用が重要であることが示唆されている。また、1型シャペロニンでは2つのリング間の協調作用が重要であることが分かっており、シングルリング変異体との比較などで証明されている。グループ2型でも同様なリング間の協調作用が提唱されているが、シングルリング変異体が構築されていないことから、リング間協調作用機構は明らかになっていない。本研究では、特にリング内及びリング間のサブユニット協調作用機構に注目して、2型シャペロニンの構造変化及びタンパク質フォールディングの分子機構解明を目的としている。

3. 研究の方法

(1) 速度論的解析による構造変化素過程の解明

以前の研究から、2型シャペロニンのATP依存的構造転移には少なくとも2段階のプロセスがあり、2段階目にリング内サブユニット協調作用が重要であることが分かっていた。一方、DXTによる解析でリングがねじれ運動をすることも証明している。ATP依存的構造転移とリングのねじれ運動の関係を明らかにするために、Caged ATPを用いたDXTと蛍光ストップ・フローによる速度論的解析を行い、ATPの結合・加水分解に伴う回転運動の速度論的解析を行い、構造変化の素過程を明らかにする。

(2) 連結リング体によるリング内協調作用機構の解明

野生型と変異体のサブユニットを連結して発現することにより、野生型と変異体を含む2型シャペロニンを構築し、その構造変化を解析することによりリング内のサブユニットの協調作用機構を明らかにする。これまでの研究で、リング内に変異体が存在してもシャペロニンとしての機能を示すことが分かっているので、蛍光ストップ・フロー及びDXTによる解析で違いを明らかにする。

(3) アシンメトリック体を用いたリング間協調作用の解析

1型シャペロニンではシングルリング変異体などを用いた研究からリング間の協調作用の重要性が知られている。一方、2型シャペロニンではシングルリング変異体の作製例がなく、リング間の協調作用機構の解明は進んでいない。本研究ではこの問題を解決するため、野生型サブユニットのリングと変異体サブユニットのリングから構成されるアシンメトリックリング体(CPN^{ASR})を構築、機能解析を行うことで、2型シャペロニンのリング間における協調作用の解析を行う。CPN^{ASR}構築では、リング内へのサブユニット混在を回避する為、2つの変異2型シャペロニンを作製した。循環置換型連結体(CPN^{CPC})および8連結体(CPN₈)である。CPN^{CPC}は循環置換変異体を連結したCPNで、立体障害を利用することでリング内混在を回避できる(図2)。

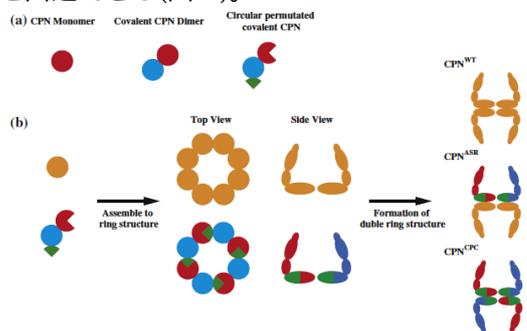


図2 循環置換型連結体を用いたアシンメトリック体の構築

CPN₈は8個のサブユニットを連結したCPNであり、単独でリングを形成することが出来る。変異体で構築したCPN^{CPC}またはCPN₈と野生型サブユニットを大腸菌で同時発現し、それぞれに付加したタグを用いて精製することで、CPN^{ASR}を構築して機能解析を行う。

4. 研究成果

(1) 速度論的解析による構造変化素過程の解明

Caged ATPを用いたDXTの実験でも、レーザー照射によるATPの放出によりねじれ運動が開始することが確認された。また、上から見て反時計周りのねじれ運動が先に確認された。これは、構造から予想されるOpen型からClosed型への構造転移におけるねじれ運動と一致している。レーザー照射からねじれ運動が開始するまで1.5-2秒のLag Timeがあった。蛍光ストップ・フローではATPの結合から直ちにOpen型からClosed型への構造転移が起きることを示しており、ねじれ運動が蛍光ストップ・フローで観察される構造転移とは異なるものであることが

分かった。また、ATPase活性が抑制されるK⁺非存在下でも蛍光ストップ・フローでの構造変化は確認される。しかし、K⁺非存在下ではねじれ運動は観測されなかった。以上の結果から、2型シャペロニンは、ATPの結合によりClosed構造に構造転移し、その後にATP加水分解によりねじれ運動することが分かった。タンパク質フォールディングにはATP加水分解が必要であることから、2型シャペロニンはねじれ運動により捕獲した変性タンパク質の構造形成を促進していることが明らかになった。これまでの実験結果を含め、図3のような2型シャペロニン反応機構モデルを構築した。

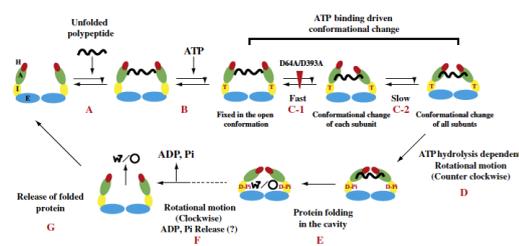


図3 グループ2型シャペロニンの反応機構モデル

(2) 連結リング体によるリング内協調作用機構の解明

ATPase活性欠損変異体を含むヘテロリング体を構築して蛍光ストップ・フロー及びDXTによる解析を行った。蛍光ストップ・フローでは変異体を含むヘテロリング体では構造変化速度の低下が確認された。一方、DXTによる解析では、ヘテロリング体でも、フォールディング活性に対応してねじれ運動も確認された。しかし、予想と異なり、運動速度の違いは確認されなかった。金ナノ粒子の固定化方法などの影響も予想されるので、運動速度の比較を行うには、解析方法の改良が必要だと思われる。

(3) アシンメトリックリング体を用いたリング間協調作用の解析

まず、CPN^{CPC}が単独でシャペロニン特有の2重リング構造を形成した。ATPase活性欠損サブユニットのからCPN^{CPC}サブユニットの頂点ドメイン先端にStrep-Tagを付加したCPN^{CPC}-ΔATPase-strepとCPN^{WT}サブユニットのC末端にHis-Tagを付加したCPN-Hisサブユニットを共発現し、2種類のアフィニティークロマトグラフィで精製することで目的のCPN^{ASR}を獲得した。CPNの高次構造はゲル濾過HPLCおよび透過型電子顕微鏡により観察した。構築したCPN^{ASR}の機能・構造変化解析より、リング間での協調作用解析を行った。CPN^{ASR}はCPN-Hisオリゴマー比較し

て約 50%の ATP 加水分解活性を有した。また、GFP を基質としたリフォールディング活性も示し、ATP 依存的にプロテアーゼ耐性の獲得も見られた(図4)。さらに構造変化の詳細を DXT により解析したところ、ねじれ運動も確認された。ATP 結合能欠損体を用いて構築した CPN^{ASR} でも同様な結果を得ている。

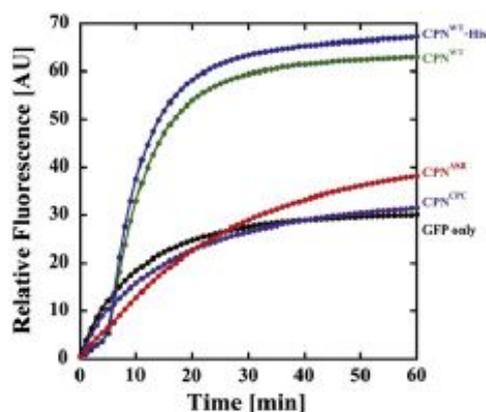


図4 循環置換型連結体及びアシンメトリック体のタンパク質フォールディング活性

この結果から、2型シャペロニンではリング間の協調作用が必須ではなく、2つのリングが独立して機能することを示唆している。CPN₈ はプロテアーゼによる分解を受けやすいという問題があり、CPN^{ASR} の構築には成功していない。

<引用文献>

Booth CR, Meyer AS, Cong Y, Topf M, Sali A, Ludtke SJ, Chiu W, Frydman J. Mechanism of lid closure in the eukaryotic chaperonin TRiC/CCT. *Nat Struct Mol Biol.* (2008) 15:746-53.

Iizuka R, Yoshida T, Shomura Y, Miki K, Maruyama T, Odaka M, Yohda M. ATP binding is critical for the conformational change from an open to closed state in archaeal group II chaperonin. *J Biol Chem.* (2003) 278:44959-65.

Iizuka R, So S, Inobe T, Yoshida T, Zako T, Kuwajima K, Yohda M. Role of the helical protrusion in the conformational change and molecular chaperone activity of the archaeal group II chaperonin. *J Biol Chem.* (2004) 279:18834-9.

Iizuka R, Yoshida T, Ishii N, Zako T, Takahashi K, Maki K, Inobe T, Kuwajima K, Yohda M. Characterization of archaeal group II chaperonin-ADP-metal fluoride complexes: implications that group II chaperonins operate as a "two-stroke engine". *J Biol Chem.* (2005) 280:40375-83.

Kanzaki T, Iizuka R, Takahashi K, Maki

K, Masuda R, Sahlan M, Yébenes H, Valpuesta JM, Oka T, Furutani M, Ishii N, Kuwajima K, Yohda M. Sequential action of ATP-dependent subunit conformational change and interaction between helical protrusions in the closure of the built-in lid of group II chaperonins. *J Biol Chem.* (2008) 283:34773-84.

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6件)

Yamamoto YY, Abe Y, Moriya K, Arita M, Noguchi K, Ishii N, Sekiguchi H, Sasaki YC, Yohda M. Inter-ring communication is dispensable in the reaction cycle of group II chaperonins. *J Mol Biol.* (2014) 426:2667-78. 査読有り

doi: 10.1016/j.jmb.2014.05.013.

Nakagawa A, Moriya K, Arita M, Yamamoto Y, Kitamura K, Ishiguro N, Kanzaki T, Oka T, Makabe K, Kuwajima K, Yohda M. Dissection of the ATP-dependent conformational change cycle of a group II chaperonin. *J Mol Biol.* (2014) 426:447-59. 査読有り doi: 10.1016/j.jmb.2013.09.034.

Sekiguchi H, Nakagawa A, Moriya K, Makabe K, Ichiyanagi K, Nozawa S, Sato T, Adachi S, Kuwajima K, Yohda M, Sasaki YC. ATP dependent rotational motion of group II chaperonin observed by X-ray single molecule tracking. *PLoS One.* (2013) 8:e64176. 査読有り

doi: 10.1371/journal.pone.0064176.

Ishida M, Tomomari T, Kanzaki T, Abe T, Oka T, Yohda M. Biochemical characterization and cooperation with co-chaperones of heat shock protein 90 from *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biosci Bioeng.* (2013) 116:444-8. 査読有り

doi: 10.1016/j.jbiosc.2013.04.020.

Hanazono Y, Takeda K, Oka T, Abe T, Tomonari T, Akiyama N, Aikawa Y, Yohda M, Miki K. Nonequivalence observed for the 16-meric structure of a small heat shock protein, SpHsp16.0, from *Schizosaccharomyces pombe*. *Structure.* (2013) 21:220-8. 査読有り

doi: 10.1016/j.str.2012.11.015.

Hanazono Y, Takeda K, Yohda M, Miki K. Structural studies on the oligomeric transition of a small heat shock protein, StHsp14.0. *J Mol Biol.* (2012) 422:100-8. 査読有り doi: 10.1016/j.jmb.2012.05.017.

[学会発表](計39件)

Yohda M, Sekiguchi H, Nakagawa A, Yamamoto Y, Oka T, Kuwajima K, Sasaki

YC. Dissection of the ATP-dependent conformational change cycle of a group II chaperonin. Japan-Italy Joint Symposium. 2014年11月06日、東大寺ミュージアム、奈良

Yohda M, Sekiguchi H, Nakagawa A, Yamamoto Y, Oka T, Kuwajima K, Sasaki YC. Dissection of the ATP-dependent conformational change cycle of a group II chaperonin. MOLECULAR CHAPERONES & STRESS RESPONSES 2014年04月30日 Cold Spring Harbor Laboratory, USA

養王田正文、阿部哲也、守屋和騎、岡俊彦、花園祐矢、竹田一旗、三木邦夫、スモールヒートショックプロテインの構造と反応機構、第86回日本生化学会大会、2013年09月13日、パシフィコ横浜、横浜

山本陽平、阿部由寛、守谷和騎、阿部哲也、関口博史、佐々木裕次、養王田正文、グループII型シャペロニンアシンメトリック複合体の構築とリング間強調作用機構解析、第86回日本生化学会大会、2013年09月11日、パシフィコ横浜、横浜

小川直樹、土田佳那子、山本陽平、佐々木裕次、石川晃、養王田正文、電子線1分子計測法(DET)を用いたグループII型シャペロニンの構造変化の検出、第86回日本生化学会大会、2013年09月11日、パシフィコ横浜、横浜

Yohda M, Sekiguchi H, Nakagawa A, Moriya K, Oka T, Makabe K, Kuwajima K, Sasaki YC. Conformational change cycle group II chaperonin revealed by kinetic study and diffracted X-ray tracking. 第13回日本蛋白質科学会年会、2013年06月12日、とりぎん文化会館、鳥取

養王田正文、中川あゆみ、守谷和騎、北村亨太郎、神前太郎、有田真優乃、岡俊彦、真壁幸樹、桑島邦博 グループII型シャペロニン構造変化サイクルの解析、第85回日本生化学会大会、2012年12月16日、福岡国際会議場、福岡

有田真優乃、守谷和騎、真壁幸樹、桑島邦博、佐々木裕次、関口博史、養王田正文、超好熱性古細菌由来II型シャペロニンのリング内サブユニット間協調作用機構に関する研究、第85回日本生化学会大会2012年12月16日、福岡国際会議場、福岡

藤井 冴 郁、The Tai Phan、Sahlan Muhamad、座古保、前田瑞夫、養王田正文、グループII型シャペロニンとプレフォルディングの協調作用の解明、第85回日本生化学会大会2012年12月16日、福岡国際会議場、福岡

Sekiguchi H, Nakagawa A, Moriya K, Arita M, Yamamoto Y, Ichianagi K, Yohda

M, Yagi M, Sakaki YC. X線1分子追跡法によるII型シャペロニン協同性評価、日本生物物理学会 第50回年会、2012年9月23日、名古屋大学東山キャンパス、名古屋

他29件

6.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

特になし

6. 研究組織

(1)研究代表者

養王田 正文 (YOHDA Masafumi)
東京農工大学・大学院工学研究院・教授
研究者番号：50250105

(2)研究分担者

関口 博史 (SEKIGUCHI, Hiroshi)
公益財団法人高輝度光科学研究センター・
利用研究促進部門・研究員
研究者番号：00401563

(3)連携研究者

なし