

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24710245

研究課題名(和文)小胞体ストレス応答センサータンパク質PERKの活性化機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the activation mechanism of an unfolded protein response sensor protein PERK

研究代表者

中村 顕(NAKAMURA, AKIRA)

東京大学・農学生命科学研究科・特任助教

研究者番号：40432356

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：小胞体ストレス応答に関わるセンサータンパク質の一つであるPERKの活性化機構を明らかにするため、PERK小胞体内腔ドメインおよびPERKの活性制御因子である分子シャペロンBiPのX線結晶構造解析を目的とした実験を行なった。それぞれのタンパク質は大腸菌を用いて大量発現させ、高純度にまで精製することに成功した。さらに両者の複合体形成を確認したが、現在までに結晶構造解析が可能な良質な結晶を得ることはできていない。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the activation mechanism of an unfolded protein response (ER stress response) sensor protein, PERK, the luminal domain of human PERK and human BiP, which is the regulator of PERK also known as an Hsp70 molecular chaperone, were expressed in Escherichia coli cells and purified with high purity. The interaction of these two proteins were examined by GST pull-down assays. The crystallization trials for the target proteins have not succeeded to date.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：活性発現の分子機構 タンパク質 X線結晶構造解析

1. 研究開始当初の背景

タンパク質の正常な折れたたみや異常なタンパク質の分解除去といった品質管理は細胞機能の正常な維持において非常に重要な機構である。真核生物における分泌タンパク質のフォールディングは細胞内小器官の一つである小胞体において主に行われるが、小胞体中に過剰量のタンパク質が蓄積した場合は小胞体ストレス応答 (ER stress response または unfolded protein response: UPR) と呼ばれる生理反応により細胞内での恒常性維持がはかられている。

ヒトの小胞体ストレスを感知するセンサーとして IRE1 (inositol requiring 1)、PERK (PKR-like ER kinase)、ATF6 (activating transcription factor 6) という小胞体膜上に局在する三種類のタンパク質が知られている。これらは全て一回膜貫通型の膜タンパク質であり、非ストレス時には小胞体内腔側ドメインに Hsp70 分子シャペロンファミリーに属する BiP (GRP78) タンパク質が結合することで待機状態にあるが、小胞体ストレス時には BiP が解離することによってセンサータンパク質が活性化し、下流へとシグナル伝達されて、翻訳抑制・フォールディング促進・タンパク質分解・アポトーシス誘導などの UPR 反応が引き起こされる (図1 参照)。

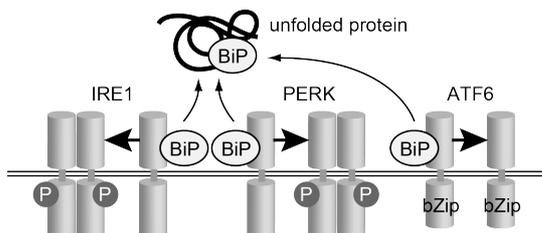


図1. 小胞体ストレス応答における三種類のセンサータンパク質.

『IRE1』は小胞体ストレス下で二量体化し、自己リン酸化により活性化される。活性化 IRE1 は転写因子 XBP1 (X-box binding protein 1) の活性化を促し、小胞体分子シャペロンや ERAD (ER-associated degradation) 関連遺伝子の転写を誘導する。『PERK』は IRE1 同様に小胞体ストレス下で二量体を形成して自己リン酸化により活性化される。リン酸化 PERK は翻訳開始因子である eIF2 α (eukaryotic initiation factor 2 α subunit) を直接リン酸化することで、翻訳開始レベルを低下させる。また同時に転写因子 ATF4 の活性化を誘導することで、アポトーシス関連転写因子遺伝子群を活性化する。『ATF6』は小胞体ストレス下で、ゴルジ体へ移動し RIP (regulated intramembrane proteolysis) により b-ZIP ドメインが遊離する。b-Zip ドメインにより UPR 標的遺伝子を活性化する。

2. 研究の目的

本研究では、ヒト由来の UPR センサータン

パク質 PERK (hPERK) およびその制御因子 BiP (hBiP) を標的とし、主に構造生物学的手法を用いて PERK-eIF2 α -ATF4 経路の UPR 機能発現に関わる分子機構の解明を目的とする。

PERK は中央の膜貫通領域を挟んで、N 末端側小胞体内腔ドメインと C 末端側細胞質ドメインに分けることができる。非ストレス環境下で PERK は、その小胞体内腔ドメイン (luminal domain; LD) において BiP と相互作用し、不活性化状態が保たれているが、小胞体中に未フォールドタンパク質が蓄積すると分子シャペロンである BiP は優先的にそれらの異常タンパク質と結合するため、PERK からは離脱すると考えられている。その結果、PERK は LD どうして結合して二量体化あるいは多量体化されるようになり、リン酸化活性を有する細胞質ドメイン (kinase domain; KD) による自己リン酸化により活性化され、下流の eIF2 α のリン酸化を引き起こす。

この経路中で安定に存在すると予想される PERK-BiP 複合体 (待機状態複合体) は互いに比較的強く結合していると考えられるため、相互作用解析をすすめるのに好ましい試料であると考えられる。本研究では、この PERK-BiP 複合体の X 線結晶構造解析を行い、非ストレス時の制御状態に関する構造情報を得るとともに、変異体解析により相互作用機序を分子レベルで解明することに主眼をおく。UPR センサータンパク質としては、これまでに IRE1 の小胞体内腔ドメイン、PERK と IRE1 の細胞質ドメインの結晶構造が明らかとなっているが、PERK 小胞体内腔ドメインについての構造情報は未だ報告されていないため、本研究による成果の有益性が認められる。また、Hsp70 ファミリーに属する分子シャペロンと基質タンパク質との相互作用に関する知見が得られる点において、UPR 研究分野だけでなく分子シャペロンによるタンパク質機能発現機構の解明という点からも本研究は有意義であると言える。

3. 研究の方法

(1) 大量発現方法の検討

hBiP との相互作用が予想される hPERK の N 末端側小胞体内腔ドメイン (hPERK-LD) は Glutathione S-transferase (GST) との融合タンパク質として、hBiP は両末端のシグナル配列を削除して His タグとの融合タンパク質として、大腸菌での大量発現を行なった。宿主大腸菌としては、大腸菌においてヒト由来のタンパク質を発現させる際に問題となるレアコドン利用に対応した菌株である Rosetta(DE3) および Rosetta-gami2(DE3) を用いた。目的タンパク質を得るための発現条件最適化のため、発現誘導条件を検討した。

(2) 高圧巻き戻し法による可溶化

大腸菌において封入体が形成され、細胞破碎後に不溶性画分として回収されるタンパ

ク質に対して高圧処理することで、タンパク質が巻き戻される例が知られている。不溶性画分に回収された hPERK-LD について、200 MPa での高圧処理を施すことでタンパク質の巻き戻しによる可溶化を試みた。

(3) タンパク質の精製および相互作用解析

GST-hPERK-LD タンパク質は上記の高圧巻き戻し法により、His-hBiP タンパク質は Ni アフィニティ樹脂を用いたカラムクロマトグラフィーにより精製した。調製した GST-hPERK-LD および hBiP タンパク質について、GST プルダウン法による相互作用解析を行なった。予め Glutathione Sepharose 樹脂を充填したカラムに GST-hPERK-LD、GST、緩衝液のそれぞれを供し、緩衝液によってカラムを洗浄して非特異的吸着試料を溶出させた後に hBiP を供した。その後、再度緩衝液でカラムを洗浄してから樹脂の一部を回収し、SDS 電気泳動によって相互作用の有無を確認した。

(4) 発現、精製方法の再検討

不溶性発現の割合が多い hPERK-LD について、発現コンストラクトの改変を行なった。融合タンパク質の種類を変更した他、C 末端を短くすることも試みた。

4. 研究成果

(1) 大量発現方法の検討

構築済みの発現プラスミドを用いて大腸菌 Rosetta(DE3)を形質転換し、0.5 mM IPTG 添加の後、25°C で一晩培養したところ GST-hPERK-LD および His-hBiP の大量発現が確認された。超音波破碎を行なった後の遠心分離により、GST-hPERK-LD は不溶性画分、His-hBiP は可溶性画分に回収された。そこで hPERK-LD について、発現誘導条件を最適化するため、添加する IPTG 濃度および培養温度、宿主大腸菌等について検討した。hPERK-LD は酸化的環境である小胞体内腔に位置するため、ジスルフィド結合の存在が予想される。そこで、大腸菌細胞質中でのジスルフィド結合形成を促進させるため、*trxB* および *gor* 遺伝子に変異のある Rosetta-gami2(DE3)菌株を用いたが、不溶性発現は改善されなかった。また、標的タンパク質の発現を緩やかにするため、IPTG 終濃度を 0.1 mM、培養温度を 15°C としたが、可溶性画分への回収率は上がらなかった。この他、フォールディングを助ける分子シャペロンの発現を促すための発現誘導時におけるエタノール添加、hPERK-LD と hBiP の共発現も行なったが効果は認められなかった。

(2) 高圧巻き戻し法による可溶化

上記のように不溶性発現となるタンパク質に対して、高圧処理の有効性が報告されているため、GST-hPERK-LD 高圧巻き戻しを試

みた。GST-hPERK-LD を大量発現させた大腸菌から洗浄操作によって封入体のみを回収し、可溶性を高める効果のあるアルギニン、還元剤である TCEP、あるいは hBiP の有無による条件下で、200 MPa の高圧処理を施した。その結果、アルギニンと TCEP を共に含む条件下で GST-hPERK-LD の有意な可溶化が認められた。また、このとき hBiP の有無は GST-hPERK-LD の可溶化に影響を与えなかった(図2参照)。巻き戻しにより可溶化した GST-hPERK-LD は PBS (phosphate buffered saline) に対して透析して、以下の実験に用いた。

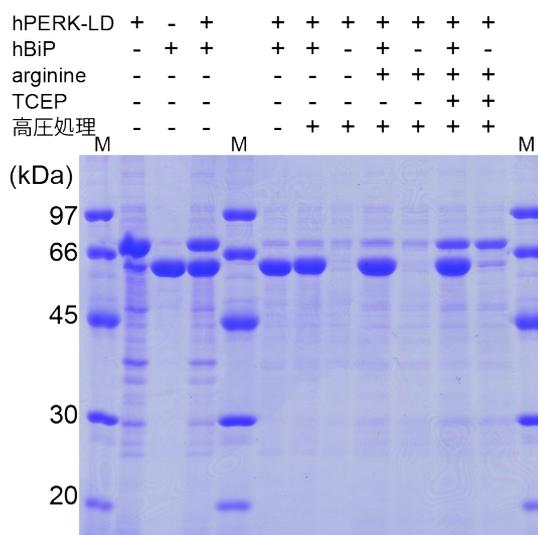


図2. hPERK-LD の高圧巻き戻し. 高圧処理後の遠心上清を SDS-PAGE により分析した. M: 分子量マーカー.

(3) タンパク質の精製および相互作用解析

His-hBiP タンパク質は Ni-NTA 樹脂を用いたアフィニティクロマトグラフィーにより精製した。この試料と高圧処理によって得た GST-hPERK-LD とを用いて、GST プルダウン法による相互作用解析を行なった。予め高圧巻き戻し GST-hPERK-LD が Glutathione Sepharose 樹脂と結合することを確認した。プルダウンアッセイでは bait として GST-hPERK-LD、GST、PBS、prey として bait の 10 倍量(モル比)の His-BiP を用いた。その結果、GST や PBS を用いた対照実験結果と比較して、GST-hPERK-LD と His-BiP との間の相互作用が示唆される結果が得られた。この結果を受けて、調製した hPERK-LD と BiP との混合溶液で結晶化条件のスクリーニングを行なったが、現在のところ結晶は得られていない。

(4) 発現、精製方法の再検討

hPERK-LD については、不溶性画分から高圧巻き戻しによる可溶化の過程で、正しいフォールドを持つタンパク質の割合が低いことが危惧されたため、可溶性発現するような

条件を再度検討した。

pET-48 を用いた thioredoxin (Trx) との融合タンパク質での発現コンストラクト、hPERK-LD の C 末端側を短くした発現コンストラクトを新たに構築した。宿主大腸菌としては Rosetta-gami2(DE3) を選択した。この条件でタンパク質を大量発現させたところ、hPERK-LC の C 末端を短くした発現コンストラクトでは改善が認められなかったが、Trx 融合タンパク質での発現コンストラクトでは、発現誘導時の培養温度を 25°C あるいは 15°C とした場合に、Trx-hPERK-LD を可溶性発現させることに成功した。Trx-hPERK-LD を Ni-NTA カラムに吸着させた後、プロテアーゼ処理によって Trx タグと hPERK-LD に分離し、陰イオン交換カラムクロマトグラフィー、ゲルろ過カラムクロマトグラフィーによって精製した (図 3 参照)。hPERK-LD について、巻き戻し過程を経ない精製系が確立できたことで、今後の変異体解析等を効率的に行うことができるようになった。現時点では、hPERK-LD を高濃度に濃縮した場合に、凝集し沈殿が生成するという問題があるため、結晶化には成功していない。安定性を向上させる緩衝液条件の検討および、hPERK-LD の構造維持と hBiP との複合体形成に不必要な領域を削減するような発現コンストラクトの変更をすすめている。

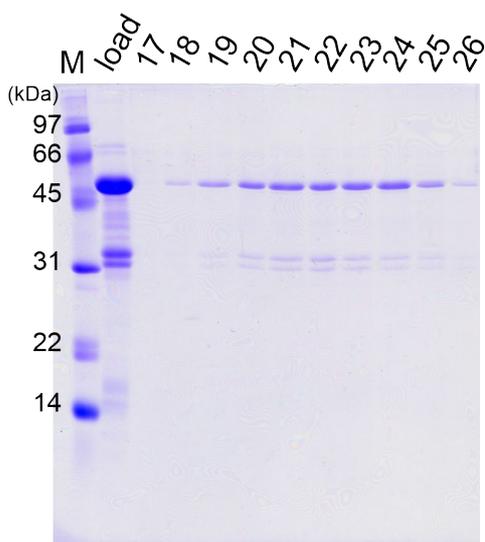


図 3 . hPERK-LD のゲルろ過カラムクロマトグラフィー結果 . load: ゲルろ過カラムに供した試料、17-26: 分画番号、M: 分子量マーカー .

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 5 件、すべて査読有)

Qin, H.-M., Miyakawa, T., Jia, M.-Z.,

Nakamura, A., Ohtsuka, J., Xue, Y.-L., Kawashima, T., Kasahara, T., Hibi, M., Ogawa, J., and Tanokura, M. "Crystal Structure of a novel N-substituted L-amino acid dioxygenase from *Burkholderia ambifaria* AMMD." *8*(5), e63996 (2013).

Nishitani, Y., Aono, R., Nakamura, A., Sato, T., Atomi, H., Imanaka, T., and Miki K. "Structure analysis of archaeal AMP phosphorylase reveals two unique modes of dimerization." *J. Mol. Biol.* **425**(15), 2709–2721 (2013).

Qin, H.-M., Miyakawa, T., Nakamura, A., Xue, Y.-L., Kawashima, T., Kasahara, T., Hibi, M., Ogawa, J., and Tanokura, M. "Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of a novel N-substituted branched-chain L-amino-acid dioxygenase from *Burkholderia ambifaria* AMMD." *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **68**(Pt 9), 1067–1069 (2012).

Okai, M., Ohtsuka, J., Asano, A., Guo, L., Miyakawa, T., Miyazono, K., Nakamura, A., Okada, A., Zheng, H., Kimura, K., Nagata, K., and Tanokura, M. "High pressure refolding, purification, and crystallization of flavin reductase from *Sulfolobus tokodaii* strain 7." *Protein Expr. Purif.* **84**(2), 214–218 (2012).

Nakamura, A., Fujihashi, M., Aono, R., Sato, T., Nishiba, Y., Yoshida, S., Yano, A., Atomi, H., Imanaka, T., and Miki, K. "Dynamic, ligand-dependent conformational change triggers reaction of ribose-1,5-bisphosphate isomerase from *Thermococcus kodakarensis* KOD1." *J. Biol. Chem.* **287**(25), 20784–20796 (2012).

[学会発表](計 10 件)

中村 颯, 大塚 淳, 廣田 憲之, 和田 仁, 田之倉 優 "磁気力場を利用したタンパク質結晶の高品質化と結晶成長のリアルタイム観察", 日本農芸化学会 2014 年度会, 2014.3.28, 明治大学, 神奈川 .

中村 颯, 大塚 淳, 廣田 憲之, 和田 仁, 田之倉 優 "磁気力場利用による高品質タンパク質結晶の取得とリアルタイム観察", 日本分子生物学会 第 36 回年会, 2013.12.3, 神戸ポートアイランド, 兵庫 .

廣田 憲之, 和田 仁, 清原 元輔, 田之倉 優, 鈴木 榮一郎, 喜田 昭子, 岡田 秀彦, 大出 孝博, 中村 颯, 大塚 淳, 柏木 立己, 沼本 修孝 "高磁気力を利用した高効率・高品位タンパク質結晶生成システムの開発", 日本磁気科学会 第 8 回年会, 2013.11.22, 東北大学, 宮城 .

中村 颯, 大塚 淳, 廣田 憲之, 和田 仁, 田之倉 優 "磁気力場利用によるタンバ

ク質結晶化のその場観察と高品質結晶の取得”, 日本結晶学会 平成 25 年度年会, 2013.10.12, 熊本大学, 熊本 .

Nakamura, A., Ohtsuka, J., and Tanokura, M. “Protein crystallization and observation of crystal growth in a magnetic field.” 4th *International Symposium on Diffraction Structural Biology (ISDSB2013)*, 2013.5.28, Nagoya, Japan.

中村 顕, 浅野 敦子, 宮川 拓也, 澤野 頼子, 佐久間 洋, 溝井 順哉, 篠崎 和子, 田之倉 優 “シロイヌナズナ由来乾燥・高温ストレス応答転写因子 DREB2A の結晶構造解析”, 日本農芸化学会 2013 年度大会, 2013.3.25, 東北大学, 宮城 .

Qin, H.-M., Miyakawa, T., Nakamura, A., Kawashima, T., Hibi, M., Ogawa, J., and Tanokura, M. “Crystal structure of a novel branched-chain amino acid dioxygenase from *Burkholderia ambifaria* AMMD.” *American Crystallographic Association, Inc. Annual Meeting*, 2012.7.29, Boston, USA.

Nakamura, A., Ohtsuka, J., Miyazono, K., Yamamura, A., Kubota, K., Hirose, R., Kashiwagi, T., Suzuki, E., Hirota, N., Wada, H., Ataka, M., Sawano, Y., and Tanokura, M. “Protein Crystallization in a high gradient magnetic field.” 5th *International Workshop on Materials Analysis and Processing in Magnetic Fields (MAP5)*, 2012.5.15, Autrans, France.

〔図書〕(計 1 件)

中村 顕, 田之倉 優、株式会社エヌ・ティー・エス「超伝導現象と高温超伝導体」(第 2 編 材料と応用 第 7 章 計測診断機器への応用 第 2 節 超伝導磁石の強力磁場を用いたタンパク質結晶の高品質化機器の開発)、2013 年、542 ページ (361-369 ページ)。

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称：磁気力場発生装置
発明者：岡田 秀彦, 廣田 憲之, 和田 仁, 松本 真治, 清原 元輔, 大出 孝博, 清原 耕輔, 田之倉 優, 中村 顕, 大塚 淳
権利者：独立行政法人物質・材料研究機構, 株式会社清原光学, 国立大学法人東京大学
産業財産権の種類：特許
番号：特願 2012-109943
出願年月日：2012 年 5 月 11 日
国内

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

中村 顕 (NAKAMURA, Akira)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・特任助教
研究者番号：4 0 4 3 2 3 5 6

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし