

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：34506

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440085

研究課題名(和文) AAA+シャペロンがリング構造を利用して凝集タンパク質をほぐす仕組み

研究課題名(英文) Disaggregation mechanism of a ring shaped AAA+ chaperon

研究代表者

渡辺 洋平 (Watanabe, Yo-hei)

甲南大学・理工学部・准教授

研究者番号：40411839

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：凝集タンパク質を再生する分子シャペロンClpBは、リング状の6量体で働く。6量体中の隣接するサブユニットを、ジスルフィド結合でつなぐことで、変異サブユニットが交互に並んだヘテロ6量体を作製した。これを用いた解析で、ClpB6量体ではATPの結合はランダムに、加水分解は協同的に起こることを示した。

分子シャペロンDnaKはClpBとともに働くが、その親和性は低い。両者の協力の仕組みを解明するため、これらをペプチドリンカーを介して融合させた。この融合体のDnaK部分に変異を導入しその影響を解析したところ、DnaKは基質を強く結合するClosed型のときにClpBを活性化することが分かった。

研究成果の概要(英文)：ClpB is a ring shaped hexameric chaperone that can rescue heat-aggregated proteins. We prepared various ordered heterohexamers of ClpB, in which two subunits having different mutations were cross-linked to each other and arranged alternately. Using these heterohexamers, we cleared that each subunit of ClpB randomly binds ATP, and cooperatively hydrolyzes them. Although DnaK chaperone cooperates with the ClpB, detailed analysis of this cooperation is difficult due to their low affinity. We constructed the DnaK-ClpB fusion protein and its mutants. By the analysis of these fusion proteins, we found that the DnaK can activate the ClpB ATPase activity only when the DnaK is in the closed form that can stably bind substrate proteins.

研究分野：タンパク質科学

キーワード：分子シャペロン 脱凝集 ClpB AAA+ 協同性

1. 研究開始当初の背景

分子シャペロン ClpB と DnaK およびその補助因子は、協力して、変性・凝集したタンパク質をほぐし(脱凝集)それを再生することができる。

ClpB は、AAA+(ATPase Associated with diverse cellular Activities)タンパク質ファミリーに属しており、リング状の6量体を形成して働くが、そのサブユニット1つは、Nドメイン、AAA1、Mドメイン、AAA2の4つのドメインからなる。AAA1、AAA2は、それぞれ、ATPを結合・加水分解できる。ClpBは、これらのドメインにおけるATP加水分解サイクルに応じて、立体構造を大きく変化させ、凝集タンパク質をリング中央の孔に通すことで脱凝集すると考えられている。また、本研究開始当初、MドメインがClpBの活性を制御していることが明らかになりつつあった。ただ、いずれの分子機構も、その詳細は分かっていなかった。

一方、DnaKはATPを結合・加水分解するNBDと、変性状態のタンパク質を結合するSBDからなり、NBDが、そのヌクレオチド状態に応じて、SBDと変性タンパク質の結合・解離速度や、親和性を制御している。DnaKは、変性タンパク質を、繰り返し結合・解離することで、そのタンパク質の立体構造形成を補助するが、単独ではほとんど脱凝集活性を示さない。脱凝集反応におけるDnaKの役割は長らく不明であったが、本研究の開始直前に、DnaKのNBDとClpBのMドメインが直接相互作用することが明らかになり、DnaKが凝集体のリクルートとClpBの活性制御を担うというモデルが提唱されるようになった。

2. 研究の目的

これまで私たちは、ClpBのATP加水分解サイクルと構造変化に注目して脱凝集機構の解明を進め、一定の成果を収めてきた。その一方で、脱凝集機構の真の理解には、個々のサブユニットだけでなく6量体リング全体や、補助因子を含めた構造変化も考えなければならない。本研究では、これまでの研究を進展させ、ATP加水分解サイクルと各ドメインの構造変化が、6量体リングの中でどのように協調するのかを明らかにし、脱凝集機構の本質に迫る。

3. 研究の方法

ClpB 6量体はホモオリゴマーであるため、遺伝子上でClpBにある変異を導入すると、全てのサブユニットに同じ変異が導入される。このような変異体では、ある特定のサブユニットでの変異が、別のサブユニットや6量体全体にどのような影響を及ぼすかは解析できず、6量体内の協同性を調べるのは難しい。そこで、隣り合うサブユニット間で近接するアミノ酸残基の対を選び、これらをシステインに置換した変異ClpBをそれぞれ調

製した。これらの変異体を混合・酸化し、サブユニット間でジスルフィド結合を形成させ、6量体リング内での並びを制御する。このように、並びを制御したサブユニットにATPの結合や加水分解、特定のドメインの構造変化などを阻害した変異を導入し、隣接するサブユニットや、6量体全体への影響を解析した。

また、DnaKとClpBの相互作用部位が明らかになったが、その親和性は非常に低く、そのままでは生化学的解析は難しい。そこで、DnaKとClpBを遺伝子上でリンカー配列を介して融合させた。この融合タンパク質のDnaK部分に、様々な変異を導入し、ClpBの活性制御や脱凝集反応にどのような影響を及ぼすかを解析した。

4. 研究成果

ClpBのシステイン変異体を様々な組み合わせ、リング内で隣り合うサブユニットを、ジスルフィド結合で、高効率に固定する組み合わせを見出した(図1)。

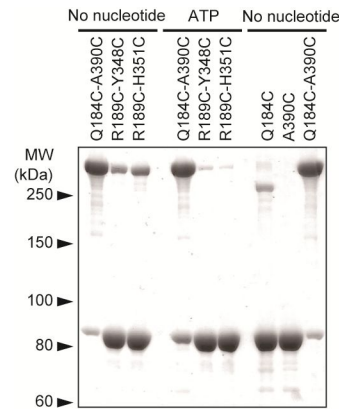


図1)ジスルフィド結合による隣接サブユニットの固定の例。サブユニット界面にシステインを導入したClpBを、特定の組み合わせで混合・酸化し、還元剤非存在下でSDS-PAGEにかけた。Q184C変異体とA390C変異体は、効率よく特異的なジスルフィド結合を形成した。

これを利用して、AAA1、AAA2各ドメインのATP結合能、あるいは加水分解活性を失わせたサブユニットを6量体リング中に交互に並び入れたヘテロ6量体を多数作製し、生化学的解析を行った。その結果、あるサブユニットへのATPの結合を阻害しても、他のサブユニットへのATPの結合にはほとんど影響しないことを見出した。一方で、AAA1、AAA2どちらかのリングで、ATPの結合数が3個以下になると、もう一方のAAAリングでのATP加水分解が阻害された。また、AAA1、AAA2それぞれのリングでのATPの加水分解は協同的に起こっており、加水分解を阻害した変異サブユニットの挿入がリング全体の活性を失わせることも見出した(図2)。さらに、ClpBに

よる脱凝集には、AAA1、AAA2 の、少なくともいずれか一方のリングでの協同的な ATP 加水分解が必要であることを明らかにした。

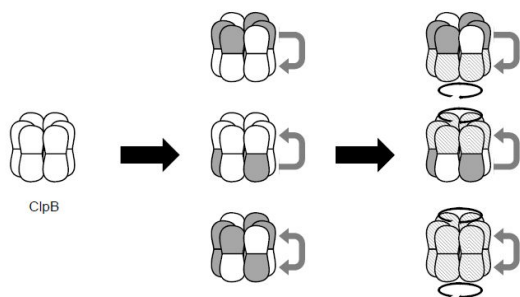


図2 ClpBのATP加水分解サイクルのモデル。白はヌクレオチドを結合していないAAAモジュール、灰色はATPを結合したAAAモジュールを表す。斜線部分では協同的なATPの加水分解が起こる。ClpBの12個のATP結合部位にはランダムにATPが結合し、一方のリングに4つ以上のATPが結合すると、もう一方のリングでの協同的なATPの加水分解が可能になる。

また、Mドメインの構造を特定の状態に固定する変異体と、Mドメインの構造変化を蛍光変化により検出できる変異体を組み合わせたヘテロ6量体を作製した。この解析により、Mドメインの構造変化自身に協同性があることも見出した。

DnaKとClpBを遺伝子上で融合させ、融合タンパク質を作製した。この融合タンパク質中では、DnaKによるClpBの活性化が起こっていることを見出した。さらにこのDnaK部分に、ATPの結合によって生じる構造変化やATPの加水分解を阻害する変異を導入し、その影響を解析した。また、DnaKのヌクレオチド状態を制御する補助因子であるGrpEの影響も解析した。すると、DnaKはATPを結合し、変性タンパク質との親和性が低下したOpen構造の状態では、ClpBを活性化できないことが明らかになった。これは、DnaKが凝集体を強く結合しているときのみClpBを活性化することを示しており、無差別なタンパク質のアンフォールディングや、ATPの無駄使いといったClpBの負の影響を、非常に効果的に抑制できる仕組みであると考えられた。

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2件)

Yamasaki Takashi, Oohata Yukiko, Nakamura Toshiki, Watanabe Yo-hei
Analysis of the Cooperative ATPase Cycle of the AAA+ Chaperone ClpB from *Thermus thermophilus* by Using Ordered

Heterohexamers with an Alternating Subunit Arrangement
J Biol Chem., 290, 9789-9800 (2015)
査読あり
DOI:10.1074/jbc.M114.617696

Nakazaki Yosuke, Watanabe Yo-hei
ClpB chaperone passively threads soluble denatured proteins through its central
Genes to Cells, 19, 891-900 (2014)
査読あり
DOI:10.1111/gtc.12188.

〔学会発表〕(計14件)

渡辺 洋平, 内橋 貴之, 安藤 敏夫, 飯野 亮太, 林 清夏, 中崎 洋介, 鍵井 桂
凝集体をほどくAAA+シャペロンClpBの作動原理
第39回日本分子生物学会年会
2016年11月30日~2016年12月02日
パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

林 清夏, 鍵井 桂, 中崎 洋介, 渡辺 洋平
基質を掴んだDnaKによるClpBの活性化と効率な脱凝集
第39回日本分子生物学会年会
2016年11月30日~2016年12月02日
パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

渡辺洋平, 山崎孝史, 野島達也, 小田彰克
タンパク質凝集体の表面から突出したポリペプチド鎖は分子シャペロンによる脱凝集効率に影響を与える
第54回日本生物物理学会年会
2016年11月25日~2016年11月27日
つくば国際会議場(茨城県・つくば市)

杉田沙織, 渡邊久美子, 橋本佳奈, 渡辺洋平
ClpB6量体に見られるミドルドメインを介したサブユニット間相互作用
第89回日本生化学会大会
2016年09月25日~2016年09月27日
仙台国際センター/東北大学川内北キャンパス(宮城県・仙台市)

石崎貴裕, 山崎孝史, 大畑薫子, 渡辺洋平
分子シャペロンClpB6量体におけるミドルドメインの協同的な構造変化の検証
第89回日本生化学会大会
2016年09月25日~2016年09月27日
仙台国際センター/東北大学川内北キャンパス(宮城県・仙台市)

Yo-hei Watanabe, Takayuki Uchihashi, Toshio Ando, Ryota Iino, Takashi Yamasaki, Yosuke Nakazaki
Cooperative ATPase cycle and dynamics of ClpB/Hsp104 disaggregase oligomer

「新生鎖の生物学」国際会議
2016年09月01日～2016年09月03日
富士レークホテル(山梨県・富士河口湖町)

渡辺洋平, 内橋貴之, 安藤敏夫, 飯野亮太,
山崎孝史, 中崎洋介, 林清夏
ClpB-DnaK 脱凝集シャペロンに見られる、自
己集合・自己組織化による機能獲得
第38回日本分子生物学会年会・第88回日本
生化学会大会 合同大会
2015年12月01日～2015年12月04日
神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)

内橋貴之, 渡辺洋平, 飯野亮太, 安藤敏夫
高速AFMで明らかにする分子シャペロンClpB
の柔らかさと機能
第53回日本生物物理学会年会
2015年09月13日～2015年09月15日
金沢大学 角間キャンパス 自然科学本館(石
川県・金沢市)

林清夏, 鍵井桂, 中崎洋介, 渡辺洋平
DnaK-ClpB 融合タンパク質の脱凝集活性
第15回日本蛋白質科学会年会
2015年06月24日～2015年06月26日
あわぎんホール(徳島県・徳島市)

山崎孝史, 小田彰克, 野島達也, 吉田賢右,
渡辺洋平
凝集体表面の状態と分子シャペロン
ClpB-DnaK システムによる脱凝集効率との関
連
第15回日本蛋白質科学会年会
2015年06月24日～2015年06月26日
あわぎんホール(徳島県・徳島市)

中崎洋介, 渡辺洋平
ClpBによるATP加水分解非依存的な変性タン
パク質の糸通し
第87回日本生化学会大会
2014年10月15日～2014年10月18日
国立京都国際会館(京都府・京都市)

山崎孝史, 小田彰克, 野島達也, 吉田賢右,
渡辺洋平
凝集体表面の状態と分子シャペロンによる
脱凝集効率との関係
第87回日本生化学会大会
2014年10月15日～2014年10月18日
国立京都国際会館(京都府・京都市)

内橋貴之, 飯野亮太, 渡辺洋平, 野地博行,
安藤敏夫
高速原子間力顕微鏡によるリング状 ATPase
の協同的構造変化の観察
第52回日本生物物理学会年会
2014年09月25日～2014年09月27日
札幌コンベンションセンター(北海道・札
幌市)

山崎 孝史, 大畑 薫子, 中村 俊樹, 渡辺
洋平
分子シャペロン ClpB の ATP の結合とその加
水分解におけるサブユニット間の協同性
第14回日本蛋白質科学会年会
2014年06月25日～2014年06月27日
ワークピア横浜 / 横浜産貿ホール マリネ
リア(神奈川県・横浜市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡辺 洋平(WATANABE, Yo-hei)
甲南大学・理工学部・准教授
研究者番号: 40411839