

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2006～2008  
 課題番号：18770120  
 研究課題名 (和文) リング構造を持つ分子シャペロン ClpB による凝集タンパク質の再生  
 研究課題名 (英文) Reactivation of aggregated proteins by the ring-shaped molecular chaperone ClpB  
 研究代表者  
 渡辺 洋平 (WATANABE YO-HEI)  
 甲南大学・理工学部・講師  
 研究者番号：40411839

## 研究成果の概要：

分子シャペロン ClpB は、他の分子シャペロン DnaK とその補助因子と協力して、変性、凝集したタンパク質を活性のある状態にまで再生することができる。ClpB の結晶構造をもとに変異体解析を行い、ClpB がどのように凝集タンパク質を再生するのかを調べた。

ClpB は N ドメイン、AAA1、ミドルドメイン、AAA2、の 4 つのドメインからなり、リング状の 6 量体を形成して働く。ClpB は、凝集したタンパク質をほぐす際、そのリングの中央の孔にタンパク質を通す (糸通し) といわれている。まずこの糸通し活性を、脱凝集活性とは区別して検出できる実験系を構築した。また、4 つのドメインのうち N ドメインは  $\alpha$  ヘリックスに富んだ球状のドメインであるが、ClpB による変性タンパク質の結合を助けるとともに、それ自身大きく構造変化することによって、脱凝集過程を促進することを見出した。ミドルドメインは棒状のコイルドコイル構造をしており、これがさらに 2 つの羽のような構造 (wing-1, wing-2) に分かれている。今回、ミドルドメインの wing-1, wing-2 はそれぞれ脱凝集過程に必須の役割を持っていることを示唆する結果を得た。さらに、Wing-2 の動きを蛍光エネルギー移動法 (FRET) で検出することに成功した。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	2,900,000	0	2,900,000
2007 年度	500,000	0	500,000
2008 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,900,000	150,000	4,050,000

研究分野：生物学

科研ひの分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：酵素の作用機作と調節

## 1. 研究開始当初の背景

分子シャペロンはおもに、立体構造の崩れたタンパク質を認識、結合し、凝集体の形成を抑制することで、そのタンパク質の立体構造の形成を助ける。しかし、その多くは一度凝集してしまったタンパク質を再生すること

はできない。ところが私たちは、それまで機能未知であった熱ショックタンパク質 ClpB が、分子シャペロン DnaK とその補助因子 (DnaJ、GrpE) と協力して、凝集したタンパク質をほぐし (脱凝集)、その活性を回復させることを見いだした。この脱凝集反応はストレス条件

下での細胞の生存に重要な反応であると同時に、既存の分子シャペロンの反応モデルでは説明できない新奇な反応である。

また私たちは、アメリカの研究グループとの共同研究により、ClpBの原子レベルの立体構造を決定することができた。このことで「脱凝集反応の分子機構」をClpBの立体構造情報に照らしながら、解析する準備が整った。

アメリカの Lindquist らのグループは ClpBの酵母ホモログであるHsp104が酵母のプリオン様タンパク質である Sup35の繊維状の凝集体を脱凝集することを報告した (*Science* (2004) 304, 1793-1797)。

また、ドイツのBukauらのグループは、大腸菌のClpBの変異体タンパク質を用いた研究を進め、ClpBが凝集体をほぐすとき、タンパク質がClpBリングの孔を通り抜けることを報告した (*Cell* (2004) 119, 653-665)。

## 2. 研究の目的

分子シャペロン ClpB は、他の分子シャペロン DnaK とその補助因子と協力して、変性、凝集したタンパク質を活性のある状態にまで再生することができる。結晶構造解析によると、ClpBのサブユニット1つは、 $\alpha$ -ヘリックスに富んだ球状のNドメイン、2つのATP結合ドメイン(N末端側からAAA1、AAA2)とその間に挟まれた長い棒状のコイルドコイル構造からなるミドルドメインという4つの独立性の高いドメインからなる(図1)。このサブユニットがさらにリング状の六量体を形成して機能する(図2)。この構造的特徴から、ClpBは、ATPの加水分解サイクルともなって、大きく構造変化しながら脱凝集反応を進めると考えられる。本研究では、脱凝集反応時にClpBの各ドメインが、またClpBリング全体がどのような構造変化を起こすのかを明らかにし、凝集タンパク質の再生の分子機構に迫る。

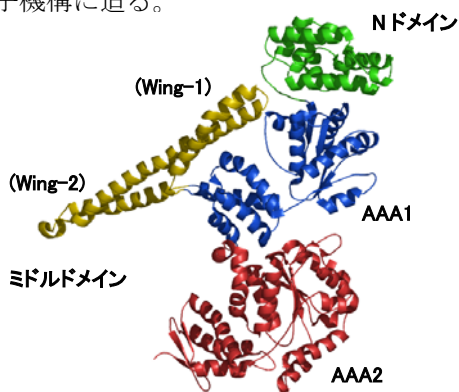


図1) ClpB単量体の立体構造 (PDB accession: 1QVR)

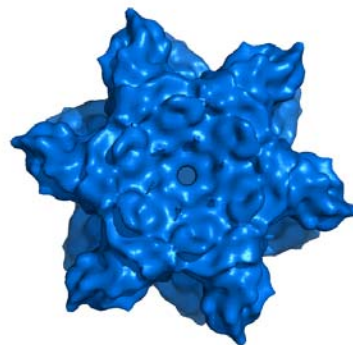


図2) ClpB6量体の電子顕微鏡3次元再構成像 (EMDB accession: EMD-1244)

## 3. 研究の方法

本研究では、ClpBが構造変化する際一過的に現れる反応中間体の形、性質を調べ、その反応機構に迫る。

まず、ClpBの結晶構造情報をもとに、特定の部位にシステイン残基を変異導入し、ジスルフィド結合を形成させることで、ClpBの様々な反応中間体を捕捉する。

得られた反応中間体の生化学的性質、すなわち、i) ClpBの機能単位である六量体を形成するか、ii) ATPの親和性、加水分解活性が2つのATP結合部位でそれぞれどのように変化しているか、iii) 変性タンパク質との親和性がどのように変化するかなどを、調べる。

さらに、得られた反応中間体を反応サイクルの中で、動的に検出する。具体的には、ある反応中間体で大きく構造変化するような部位に蛍光色素を導入し、蛍光変化や蛍光エネルギー移動 (FRET) から構造変化をリアルタイムで検出する。

## 4. 研究成果

ClpBはリング状の6量体を形成して働くが、凝集したタンパク質をほぐす際、そのリングの中央の孔にタンパク質を通す(糸通し)といわれている。一方、ClpBによく似た構造を持つClpAは、14量体の筒状の構造をしたClpPと結合し、基質タンパク質をその筒構造内部に送り込んで分解する。ドイツのBukauらのグループは、大腸菌のClpBにClpAの持つClpP結合配列を変異導入して、ClpPに結合できるClpB変異体(BAP)を作製した。BAPはClpBと同様に、DnaKシステムとともに働いて凝集体を脱凝集するが、ClpP存在下ではClpPと結合し、凝集体をClpPの筒構造内部に送り込んで分解する。さらに、DnaKシステムがなくても、BAPとClpPのみで、変性モデルタンパク質であるカゼインをATP依存

的に分解することができる。このことは、BAPを用いれば、脱凝集反応のうち ClpB の糸通し活性だけを DnaK 非依存的に、基質タンパク質の分解という形で検出できることを示している。本研究で用いている好熱菌の ClpB にこの系を応用するため、好熱菌の ClpA がもつ ClpP 結合配列を好熱菌の ClpB に移植した、好熱菌版の BAP (TBAP) を作製した。また、好熱菌の ClpP 遺伝子をクローニングして大量発現系を構築し、ClpP タンパク質の精製標品を得た。好熱菌の BAP と ClpP は、大腸菌のものと同様、変性モデルタンパク質であるカゼインを ATP 依存的に分解することができ、糸通し活性の検出系として有効に機能した (図 3)。

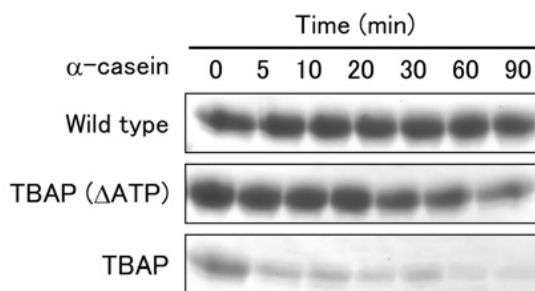


図 3) TBAP と好熱菌 ClpP による ATP 依存的なカゼインの分解の様子。

結晶構造解析や電子顕微鏡観察から、ClpB の N ドメインは、他のドメインに対する相対的配向が大きく変化する、可動性の高いドメインであると考えられている。今回、ClpB にシステイン残基を変異導入し、ジスルフィド結合によって N ドメインの動きを制限する変異体を作製した。作製した変異体は、N ドメインを AAA1 に固定し、6 量体リングに対して内側に向かせたもの 2 種類と外側に向かせたもの 1 種類、さらに隣り合うサブユニットの N ドメイン同士をジスルフィド結合させたもの 1 種類の合計 4 種類。これらの変異体について、ジスルフィド結合を形成させた酸化状態と解離させた還元状態とで 6 量体形成能、脱凝集活性、ATP 加水分解活性、変性タンパク質との親和性を調べ、野生型 ClpB および N ドメインを欠損した ClpB  $\Delta$ N と比較した。その結果、いずれの N ドメイン固定変異体も 6 量体を形成することができた。また、N ドメインは、ドメインの向きに関わらず、ClpB への変性タンパク質の結合を促進するが、脱凝集活性の促進には、さらに N ドメインの動きが重要であることがわかった。

ClpB のミドルドメインは、4 本の  $\alpha$  ヘリッ

クスからなる棒状のコイルドコイル構造からなり、ちょうど 2 つの羽 (wing-1、wing-2) を持つプロペラのような形をしている (図 1)。これまでの研究で、ミドルドメインは AAA1 へのヌクレオチドの結合によりその向きを変えること、またこの変化により 6 量体が安定化され、AAA2 での ATP 加水分解が促進されることが示されている。このミドルドメインの構造変化のうち、wing2 の構造変化について、蛍光エネルギー移動法を用いて、詳細に解析する系の構築を試みた。構造変化の検出は可能となったが、詳細な解析を行うためには更なる系の改善が必要である。

また、ミドルドメインの 2 つの羽構造について、コイルドコイル構造の安定化に寄与している疎水残基をアラニンに置換した変異体を作製し、生化学的解析を行った。Wing-1、wing-2 いずれの場合も、置換する疎水残基の数が増えるに従って、脱凝集活性が低下し、6 量体構造を安定に維持できなくなった。その際、Wing-1、wing-2 いずれの変異体の中にも、6 量体構造を維持しながら、脱凝集活性だけが失われているものがあった。このことは Wing-1、wing-2 両方の構造的安定性が ClpB の脱凝集活性に必要であることを示している。一方、ATP 加水分解活性に関しては、Wing-1、wing-2 それぞれの変異体で、異なる傾向が見られた。これは、wing-1、wing-2 がそれぞれ固有の役割を担っていることを示唆する。さらに、wing-2 に関しては、その働きに重要なアミノ酸残基を特定することができた。また、wing-1、wing-2 の各種変異体を ClpB の糸通し活性検出系と組み合わせて解析したところ、これら 2 つの羽構造は糸通し過程以外の脱凝集過程に働くということが明らかになった。

ClpB とともに働く分子シャペロン DnaK とその補助因子 DnaJ について、DafA とよばれる温度依存性の調節因子が知られている。DafA による活性調節の様子を詳細に解析したところ、DafA は従来考えられていたよりも幅広い温度範囲で DnaK と DnaJ の活性を制御していることが明らかになった。

##### 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 0 件)

[学会発表] (計 5 件)

① 渡辺洋平、西浦昌哉、高野美佐、吉田賢

右、分子シャペロン ClpB の機能と構造変化、第 6 回日本蛋白質科学会年会ワークショップ「AAA+タンパク質の高次構造と作用ダイナミクス」、2006 年

- ② 水野さやか、吉田賢右、渡辺洋平、分子シャペロン ClpB の N 末端ドメインの動きと働き、第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会合同大会、2007 年
- ③ 中崎洋介、寿野良二、吉田賢右、渡辺洋平、好熱菌の ClpP 結合型 ClpB 変異体、第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会、2008 年
- ④ 水谷正、根本正平、吉田賢右、渡辺洋平、好熱菌 DnaK-DnaJ 複合体の安定性とシャペロン活性、第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会、2008 年
- ⑤ 水野さやか、中崎洋介、吉田賢右、渡辺洋平、分子シャペロン ClpB の N 末端ドメインの動きはいかんして脱凝集過程を促進するか、第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会、2008 年

## 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・講師

研究者番号：40411839

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：