

平成 21 年 6 月 9 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19370038

研究課題名（和文） グループ 2 型シャペロニン機能発現の分子機構

研究課題名（英文） Molecular mechanism of protein folding by group II chaperonin

研究代表者

養王田 正文（YOHDA MASAFUMI）

東京農工大学・大学院共生科学技術研究院・教授

研究者番号：50250105

研究成果の概要：

超好熱性古細菌 *Thermococcus* strain KS-1 由来グループ 2 型シャペロニンは、ATP により頂点ドメインに位置する helical protrusion を中心とした構造変化が引き起こされ、open 構造から closed 構造へと変化することで、補足した変性タンパク質をシャペロニン内部空洞に閉じ込め、folding を促進する。この ATP 依存的な構造変化はサブユニット間の協同した作用により引き起こされるが、その詳細は解明されていない。我々は、シャペロニンリング内の特定の位置に、「ATP 加水分解部位に変異を導入した変異体サブユニット」と「helical protrusion 欠損変異体サブユニット」をそれぞれ様々に導入したシャペロニンを作成し、これらのシャペロニンの folding 活性や ATP 依存的な構造変化を生化学的実験および X 線小角散乱実験などを用いて解析し、サブユニット間の協同性を解析した。本解析の結果、2 型シャペロニンの ATP 依存的な open 構造から closed 構造への変化では、最初に ATP 結合・加水分解により各サブユニットの helical protrusion を中心とした局所的な構造変化が起こり、その後、隣接した helical protrusion 間の相互作用が起こることで closed 構造を形成するようになることを明らかにした。また、常温での機能解析を可能にするため、低温適応変異体を構築した。この変異体の変異アミノ酸は構造変化の情報伝達に重要な役割を持つことが示唆されている。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	9,000,000	2,700,000	11,700,000
2008 年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
年度			
年度			
年度			
総計	13,700,000	4,110,000	17,810,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理

キーワード：シャペロン、シャペロニン、古細菌、ストレス、フォールディング

1. 研究開始当初の背景

細胞内におけるタンパク質の構造形成と品質管理は、分子シャペロンと呼ばれる一群のタンパク質により制御されてい

る。シャペロニンは、分子シャペロンの最も代表的なメンバーであり、2 層のリング状構造を形成し、非天然構造のタンパク質と結合し、ATP 依存的にそれらの

正常なフォールディングを促進する。シャペロニンは、アミノ酸配列の相同性などからグループ1型とグループ2型に大別される。原核生物やミトコンドリア、葉緑体に存在するシャペロニンは、大腸菌のシャペロニンである GroEL とその補因子 GroES に代表されるグループ1型に分類される。これまでの研究の結果、グループ1型の分子機構については詳細なモデルが提唱されており、GroES が重要な役割を担っていることが分かっている。一方、真核生物の細胞質や古細菌に見出されるグループ2型シャペロニンには、GroES に相当する補因子が存在せず、グループ1型には存在しない Helical protrusion 領域が GroES と類似の機能を担っている。しかし、グループ2型シャペロニンに関する研究は1型と比較して遅れており、詳細な分子機構は解明されていなかった。真核細胞由来2型シャペロニンは多数のサブユニットから構成されていると同時に精製も困難であることから、詳細な分子機構の解析は遅れている。一方、古細菌由来2型シャペロニンのほとんどが *in vitro* でのタンパク質フォールディング能を示さないという問題があった。我々は、超好熱性古細菌 *Thermococcus* strain KS-1 (*T. KS-1*) 由来2型シャペロニンが *in vitro* で高いフォールディング能を示すことを有効に利用し、その分子機構解明につながる重要な発見を行ってきた。国際的に見ても、2型シャペロニンの詳細な分子機構の解明では先頭を走っていると評価されている。我々の成果をまとめると以下のようなものになる。(1) *T. KS-1* 由来2型シャペロニンの X 線結晶構造の解明 (Shomura et al. *J. Mol. Biol.* (2004) 335, 1265)、(2) ATP の結合による Built-in Lid が閉じることの証明 (Iizuka et al. *J. Biol. Chem.* (2003) 278, 44959)、(3) Helical Protrusion が閉じることによるタンパク質がフォールディングすることの証明 (Iizuka et al. *J. Biol. Chem.* (2004) 279, 18834)、(4) フォールディングサイクルにおいて2つのリングが非対称的に機能している事実の証明 (Iizuka et al. *J. Biol. Chem.* (2005) 280, 40375)、(5) 補因子プレフォルディングとの協調作用機構の解明 (Okochi et al. *J. Biol. Chem.* (2004) 279, 31788, Zako et al. *FEBS Lett.* (2005) 579, 3718, Zako et al. *J. Mol. Biol.* (2007) 364, 110-120.)

我々の研究などの成果により、グループ2型シャペロニンが ATP の結合・加水分解に伴う構造変化によりタンパク質のフォールディングを行うことが明らかになっている。しかし、ATP 結合部位からの構

造変化情報の伝達機構やリングを形成している8つのサブユニットが協調して開閉するメカニズムなどは明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究では、上記のモデルを基盤に2型シャペロニンによるタンパク質フォールディング機構の詳細な分子機構の解明を目的としている。具体的には、以下の課題の解決を目的とした。

(1) リング内及びリング間の協調機能の解明

シャペロニンの機能を制御するリング内、リング間の協調機構のメカニズムを明らかにする。ATP の結合・加水分解や Built-in Lid の開閉に伴う構造変化の協同性を明らかにし、その詳細な分子機構を解明する。

(2) ATP の結合・加水分解に伴う Built-in Lid 開閉の分子機構

ATP 結合・加水分解部位と Built-in Lid は離れているので、ATP 結合・加水分解に伴う構造変化がどのようなメカニズムで Built-in Lid の開閉につながるのか、特にそれに関わるアミノ酸のネットワークを明らかにする。

(3) Built-in Lid の Close に伴う構造変化

X 線小角散乱による解析の結果、2型シャペロニンの構造変化は単純に Built-in Lid が開閉するだけでなく、それに続く大きな構造変化があることが予想されている。その構造変化が、Built-in Lid を構成する Helical Protrusion 間の相互作用に由来するものであるという仮定を検証する。

3. 研究の方法

リング内及びリング間の協調機能の解明を行うには、リング内の特定の部位に変異体を含むオリゴマーを作成することが必要である。しかし、変異体と野生型を同時に生産するだけでは、ランダムに組み込まれた複合体が作成されるだけである。そこで、リング内において隣接するサブユニットの N 末と C 末が近傍に存在することに着目し、サブユニットが結合した連結シャペロニンを作成し、リング内の特定サブユニットの位置に変異を導入した。シャペロニンサブユニットの C 末端配列をプロテアーゼ認識配列に置換した後、隣接するサブユニットの N 末端側と連結した発現系を作成し、タンパク質を発現および精製後に、プロテアーゼを用いてリンカー配列を切断することで、余分な結合を有さないシャペロニン

を作成した。この系を用いて、野生型サブユニットと3種類の変異体サブユニット(ATP加水分解能はあるものの構造変化が起こらない変異体:G65C, ATP加水分解能を欠失した変異体:ATPase, helical protrusionを欠失した変異体:helical)でそれぞれ構成される様々なヘテロオリゴマーを作成し、機能解析を行った。機能解析としては、ATP加水分解能、豚由来クエン酸合成酵素の凝集抑制機能、酸変性GFPのフォールディング機能、変性クエン酸合成酵素のフォールディング機能、X線小角散乱及びプロテアーゼ分解による構造変化の解析、蛍光プローブによる構造変化の解析などを行った。構造変化の詳細な分子機構を解明することを目的に、比較的低温での物理化学的解析が可能で、低温適応がシャペロニン変位体を作成した。具体的には、好熱性及び常温性の2型シャペロニンのアミノ酸配列を比較し、好熱性と常温性で特異的に異なっているアミノ酸を探し、*T. KS-1* シャペロニンにそのアミノ酸変異を導入した変異体を作成し、様々な温度におけるフォールディング活性及び構造変化機構の解析を行い、低温適応化を解析した。

4. 研究成果

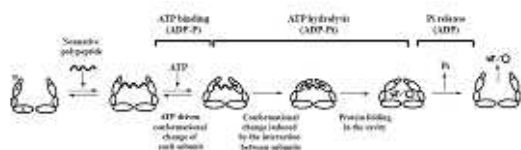
これまでの研究の結果、*T. KS-1* シャペロニンサブユニットの9残基目と隣接するサブユニットの526残基目を直接連結することにより作成した連結シャペロニンは、野生型と同様のオリゴマー構造を形成するものの、変性タンパク質を捕捉できず、シャペロニンとしての機能を失っていた。活性を失った原因は、連結部分の構造変化の自由度が失われたことであると考へ、野生型サブユニット全長(548アミノ酸残基)のC末端側とN末端側を4または6アミノ酸残基のリンカーを介して直接連結した、2連結および4連結シャペロニンを作成し、シャペロニンの活性の回復を試みた。しかし、リンカーを繋いだ状態では、シャペロニンの活性を野生型シャペロニンと同程度まで回復することは困難であった。そこで、プロテアーゼによりリンカー部位を切断することにした。長時間処理を行ってもシャペロニンが切断されず、シャペロニン空洞内部に入ることの出来る大きさのプロテアーゼとしてThrombinを選択した。全長サブユニット(548アミノ酸残基)のC末端配列をプロテアーゼ認識配列に置換して隣接するThrombinのN末端側と連結した発現系を作成し、タンパク質を発現および精製後に、プロテアー

ゼを用いてリンカー配列を切断することで、活性のあるシャペロニンを得ることに成功した。そこでこの系を用いて、ホモオリゴマーとしては変性タンパク質のフォールディング機能を失う3種類の変異体サブユニット(ATP結合・加水分解に伴う構造変化が起こらない変異体サブユニット(G65C)(C)、ATPase欠損変異体サブユニット(D64A/D393A:ΔATPase)(A)、変性タンパク質をシャペロニン空洞内部に閉じ込める役割をするhelical protrusionを欠損させた変異体サブユニット(Δ245-276:Δhelical)(H)を野生型サブユニットと様々な配列で並べた変異シャペロニンを構築し、その機能の解析を行った。

G65CまたはD64A/D393Aと野生型サブユニットを交互に含むシャペロニンは、野生型のシャペロニンとほぼ同程度のフォールディング活性を有していた。この結果は、ATPの結合・加水分解に伴うサブユニット間の協調機構はないことを示している。この結果は、ATPの結合や加水分解活性に関する協同性の効果が少ないという結果と整合している。フォールディング活性はリング内の変異体の数に対応している。また、興味深いことに、サブユニットの配列にも関係していた。4連結で2つの野生型と変異体が連結することで構築したシャペロニン(WWCCまたはWWAA)のフォールディング活性は、野生型と変異体が交互に結合させて構築したシャペロニン(WCまたはWA)と比較して活性が低かった。この結果は、変異体サブユニットの構造変化が隣接する野生型のサブユニットの効果によるものであることを示唆している。一方、Δhelical(H)の影響は顕著である。野生型とΔhelicalを交互に配置したWH、野生型3つにΔhelicalを1つ導入したシWWWHのいずれもがフォールディング活性を示さなかった。しかし、予想に反して、X線小角散乱、プロテアーゼ切断及び構造変化に伴う蛍光色素の蛍光強度の変化の解析から、これらの変異体シャペロニンはATP依存的に構造変化をすることが示唆された。しかし、クエン酸合成酵素の熱凝集に対する効果を調べる実験では、ATP存在下でもクエン酸合成酵素の熱凝集を抑制することができた。これらの結果から、以下のような構造変化モデルを提唱した。すなわち、最初にATP結合・加水分解により各サブユニットのhelical protrusionを中心とした局所的な構造変化が起こり、その後、隣接したhelical protrusion間の相互作用が起こることでclosed構造を形成する。最後の構

造変化がタンパク質のフォールディングに重要であり、ATP加水分解のエネルギーはclosed構造からopen構造への変化に必要なと考えられる。

図1 本研究で明らかになったグループ2型シャペロニンの反応機構



低温適応に関与するアミノ酸残基を推定するために、26種の好熱性生物種および17種の常温性生物種由来の型シャペロニンのアミノ酸配列の比較を行った。好熱性と常温性の生物種間で保存されている残基の違いに注目し、好熱性生物種が低温環境に適応するために選択したと思われる3つの残基(E187, K323, A523)を推定した。推定されたアミノ酸残基について、T. KS-1由来シャペロニン遺伝子に変異を導入し、3種のSingle mutant E187D, K323R, A523Kを作製した。これら変異体に関して、クエン酸合成酵素(CS)を用いた蛋白質フォールディング活性やアレスト活性の測定、およびX線小角散乱実験によるATP依存性な構造変化を解析し、野生型シャペロニンと比較した。熱変性させたCSの40°C, 50°C, 60°Cにおける酵素活性の回復を指標として、各変異体の蛋白質フォールディング活性を評価した。その結果、60°Cでは全ての変異体の活性が野生型に比べ低下した。一方、40°C, 50°Cにおいては、K323Rのみが野生型より高いフォールディング活性を示した。CSの熱凝集抑制効果を観察することにより、変異体のアレスト活性を測定した。その結果、50°Cにおいて、全ての変異体のアレスト活性が野生型に比べ上昇することが示された。特にK323Rでは、大幅な活性上昇が見られた。X線小角散乱曲線より、変異体のATP依存性な構造変化について解析した。散乱曲線の結果から、全ての変異体が40°C, 60°Cで野生型と同様に構造変化することが確認された。そこで、散乱曲線から慣性半径を算出して構造変化の度合いを調べたところ、60°Cにおいて、野生型の慣性半径は構造変化により7.3Å変化した。各変異体について慣性半径を求めると、60°Cでは全ての変異体が野生型と同様の値を示した。一方、40°Cにおいては、E187DとK323Rが野生型に比べ大きく構

造変化することが示唆された。アミノ酸一次配列情報の比較のみから低温適応化を試みた結果、低温で野生型に比べ活性が上昇するK323R変異体を得ることに成功した。低温におけるアレスト活性や構造変化能が野生型より上昇することが、K323Rのシャペロニンとしての活性を上昇させたと考えられる。また、本研究ではSingle mutantの結果をもとに3種のDouble mutant E187D/K323R, E187D/A523K, K323R/A523Kを作製して活性評価を行った。フォールディング活性に関して、40°Cにおいて野生型と同程度の活性が示された変異体があったものの、全体的には大きな活性の上昇は見られず、二残基の変異を導入することによる相乗効果は観察されなかった。E187DとK323Rの変異部位はATP構造変化の経路の途中にあり、ヒンジ領域に存在することから、このアミノ酸変化が低温での構造変化の促進の効果があることから、これらがATPの結合・加水分解に伴う構造変化に関与する重要なアミノ酸であることが明らかになった。

以上の結果は、これまで未解明であったグループ2型シャペロニンのタンパク質フォールディング機構の解明につながる重要な成果であり、国際的に高く評価されている。また、本研究を進める仮定で、プレフォールディングとの相互作用部位の特定などに関する重要な成果も得ることに成功した。

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13件)

原著論文

Sugino C, Hirose M, Tohda H, Yoshinari Y, Abe T, Giga-Hama Y, Iizuka R, Shimizu M, Kidokoro S, Ishii N, Yohda M. Characterization of a sHsp of *Schizosaccharomyces pombe*, SpHsp15.8, and the implication of its functional mechanism by comparison with another sHsp, SpHsp16.0. *Proteins*, 74: 6-17, 2009. (査読有)

Sahlan M, Kanzaki T, Yohda M. Construction and characterization of the hetero-oligomer of the group II chaperonin from the hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus* sp. strain KS-1. *Extremophiles*, 13: 437-445, 2009. (査読有)

Sakono M, Zako T, Ueda H, Yohda M, Maeda M. Formation of highly toxic soluble amyloid beta oligomers by the

molecular chaperone prefoldin. FEBS J, 275: 5982-5993, 2008. (査読有)

Saji H, Iizuka R, Yoshida T, Abe T, Kidokoro S, Ishii N, Yohda M. Role of the IXI/V motif in oligomer assembly and function of StHsp14.0, a small heat shock protein from the acidothermophilic archaeon, *Sulfolobus tokodaii* strain 7. Proteins, 71: 771-782, 2008. (査読有)

Okochi M, Kanie K, Kurimoto M, Yohda M, Honda H. Overexpression of prefoldin from the hyperthermophilic archaeum *Pyrococcus horikoshii* OT3 endowed *Escherichia coli* with organic solvent tolerance. Appl Microbiol Biotechnol, 79: 443-449, 2008. (査読有)

Ohtaki A, Nakano Y, Iizuka R, Arakawa T, Yamada K, Odaka M, Yohda M. Structure of aspartate racemase complexed with a dual substrate analogue, citric acid, and implications for the reaction mechanism. Proteins, 70: 1167-1174, 2008. (査読有)

Ohtaki A, Kida H, Miyata Y, Ide N, Yonezawa A, Arakawa T, Iizuka R, Noguchi K, Kita A, Odaka M, Miki K, Yohda M. Structure and molecular dynamics simulation of archaeal prefoldin: the molecular mechanism for binding and recognition of nonnative substrate proteins. J Mol Biol, 376: 1130-1141, 2008. (査読有)

Kurimoto E, Nishi Y, Yamaguchi Y, Zako T, Iizuka R, Ide N, Yohda M, Kato K. Dynamics of group II chaperonin and prefoldin probed by ¹³C NMR spectroscopy. Proteins, 70: 1257-1263, 2008. (査読有)

Kida H, Sugano Y, Iizuka R, Fujihashi M, Yohda M, Miki, K. Structural and molecular characterization of the prefoldin beta subunit from *Thermococcus* strain KS-1. J Mol Biol, 383: 465-474, 2008. (査読有)

Kanzaki T, Iizuka R, Takahashi K, Maki K, Masuda R, Sahlan M, Yebenes 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, 283:

34773-34784, 2008. (査読有)

Iizuka R, Sugano Y, Ide N, Ohtaki A, Yoshida T, Fujiwara S, Imanaka T, Yohda M. Functional characterization of recombinant prefoldin complexes from a hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus* sp. strain KS-1. J Mol Biol, 377: 972-983, 2008. (査読有)

Yoshida T, Iizuka R, Itami K, Yasunaga T, Sakuraba H, Ohshima T, Yohda M, Maruyama T. Comparative analysis of the protein folding activities of two chaperonin subunits of *Thermococcus* strain KS-1: the effects of beryllium fluoride. Extremophiles, 11: 225-235, 2007. (査読有)

Zako T, Murase Y, Iizuka R, Yoshida T, Kanzaki T, Ide N, Maeda M, Funatsu T, Yohda M. Localization of prefoldin interaction sites in the hyperthermophilic group II chaperonin and correlations between binding rate and protein transfer rate. J Mol Biol, 364: 110-120, 2007. (査読有)

【学会発表】(計 74 件) 国際

Yohda M, Sugano Y, Miyoshi E, Hanada M, Yonezawa A, Ohtaki A, Horiuchi H, Oda M, Tani T, Fujii I. "STRUCTURE, FUNCTION AND APPLICATION OF HYPERTHERMOPHILIC MOLECULAR CHAPERONES", The 3rd International Workshop on Approaches to Single-Cell Analysis, 2008/9, ETH, Zurich, Switzerland (Invited)

Sahlan M, Kanzaki T, Yohda M "Rebuilt and characterization of hetero-oligomeric group II chaperonin complexes of *Thermococcus* sp. strain KS-1", 33rd FEBS Congress and 11th IUBMB Conference, 2008/6, Athens, Greece

Kanzaki T, Masuda R, Iizuka R, Takahashi K, Maki K, Kuwajima K, Yohda M. "Studies on the contribution of helical protrusion to ATP-dependent conformational change of group II chaperonin using chaperonin complexes with helical protrusion deletions", 33rd FEBS Congress and 11th IUBMB Conference, 2008/6, Athens, Greece

Yohda M "Recent progress of the researches on molecular chaperones and protein folding diseases" The 2nd Gruber-Soedigdo Lecture 2008, 2008/6,

Institute of Bandung, Bandung, Indonesia (Invited)

Yohda M, Ohtaki A, Miyata Y, Kida H, Yonezawa A, Noguchi K, Miki, K. "RECOGNITION MECHANISM OF PYROCOCCUS PREFOLDIN REVEALED BY X-RAY CRYSTAL STRUCTURE ANALYSIS AND MOLECULAR DYNAMICS SIMULATION" MOLECULAR CHAPERONES & STRESS RESPONSES, 2008/5 Cold Spring Harbor, USA

Kanzaki T, Iizuka R, Takahashi K, Hugo Yebenes H, Masuda R, Maki K, Ishii N, Sahlan M, Valpuesta JM, Kuwajima K, Yohda M. "ATP-DEPENDENT CONFORMATIONAL CHANGE MECHANISM OF GROUP II CHAPERONINS ELUCIDATED USING CHAPERONIN COMPLEXES" MOLECULAR CHAPERONES & STRESS RESPONSES, 2008/5 Cold Spring Harbor, USA

Sakono M, Zako T, Ueda H, Yohda M, Maeda M. "FORMATION OF HIGHLY SOLUBLE AMYLOID BETA OLIGOMERS BY THE MOLECULAR CHAPERONE PREFOLDIN" MOLECULAR CHAPERONES & STRESS RESPONSES, 2008/5 Cold Spring Harbor, USA

Yohda M, Sugino C, Hirose M, Iizuka R, Shimizu M, Kidokoro S, Ishii N. "TWO SMALL HEAT SHOCK PROTEINS OF A FISSION YEAST FUNCTION IN DIFFERENT MANNER TO COPE WITH WIDE RANGE OF TEMPERATURES AND VARIOUS DENATURED PROTEINS" 3rd Cell Stress Society International Congress on Stress Responses in Biology and Medicine and 2nd World Conference of Stress, 2007/8 Budapest, Hungary

Zako T, Murase Y, Zhukov A, Karlsson R, Shimizu M, Iizuka R, Maeda M, Yohda M. "INTERACTION OF PREFOLDIN WITH GROUP II CHAPERONIN IN THE PRESENCE OF VARIOUS NUCLEOTIDES" 3rd Cell Stress Society International Congress on Stress Responses in Biology and Medicine and 2nd World Conference of Stress, 2007/8 Budapest, Hungary

Kanzaki T, Iizuka R, Takahashi K, Maki K, Ishii N, Sahlan M, Furutani M, Kuwajima K, Yohda M. "THE INTERACTION OF HELICAL PROTRUCTIONS IS IMPORTANT IN THE PROTEIN FOLDING CYCLE OF GROUP II CHAPERONINS" 3rd Cell Stress Society International Congress on Stress Responses in Biology and Medicine and 2nd World Conference of Stress, 2007/8 Budapest, Hungary

他 4件

国内

Yohda M, Kanzaki T, Masuda R, Sahlan 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" 第31回日本分子生物学会年会/第81回日本生化学会大会、2008年12月、神戸国際会議場、神戸 (Invited)

他 59件

〔図書〕(計 1件)

Robb FT, Iizuka R, Yohda M, (2007) Protein Folding Systems. pp. 209-223 Archaea - MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY ed. Cavicchioli R, ASM Press

6. 研究組織

(1)研究代表者

養王田 正文 (YOHDA MASAFUMI)
東京農工大学・大学院共生科学技術研究院・教授
研究者番号：50250105

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし