

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570220

研究課題名(和文) 高度に進化した2種のシャペロニンによる細胞機能制御

研究課題名(英文) Regulation of cellular functions by highly evolved two chaperonins

研究代表者

久保田 広志 (KUBOTA, HIROSHI)

秋田大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：80332724

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：シャペロニンは、タンパク質のフォールディングを介助する分子シャペロンの1グループである。本研究では、ヒトをはじめとする真核細胞において重要な機能を担っているCCT(細胞質に分布)とHSP60(ミトコンドリアに分布)という2種のシャペロニンについて研究を行った。CCTについては、ATPase活性の他に、GTPase活性をもつことを見出した。HSP60に関しては、様々な解析の結果から、シングルリングから、ダブルリングを介して、フットボール型複合体へと変化し、フットボール型複合体が重要な機能を担っているものと考えられた。これらの結果は、シャペロニンの機能を知る上で重要な知見である

研究成果の概要(英文)：Chaperonins are a group of molecular chaperone that assists in protein folding in the cell. In this project, we analyzed two eukaryotic chaperonins: cytosolic chaperonin CCT and mitochondrial chaperonin HSP60. In the study of CCT, we found that CCT possesses GTPase activity in addition to the ATPase activity. In the study of HSP60, we found that football-like complex plays an important role in the function of HSP60 after formation of the football-like complex from single-ring complex via double-ring complex. These results contain important findings to understand chaperonin functions.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：細胞生物学

キーワード：分子シャペロン フォールディング 複合体形成 ATPase CCT HSP60

1. 研究開始当初の背景

細胞内で作られるタンパク質は、アミノ酸の鎖であるポリペプチドとして翻訳されるが、正しい立体構造を獲得することで、その機能を発揮する。しかしながら、生合成直後のポリペプチド鎖は、他のタンパク質との不必要な相互作用を高頻度を起こしてしまうため、常に変性や凝集の危険にさらされている。変性や凝集を起こしたタンパク質は、細胞にとって強い毒性を示す。このため、分子シャペロンと呼ばれるタンパク質群が、ペプチド鎖を正しく折り畳んで、機能型の分子構造を形成する過程を介助する。

シャペロニンは、2重リング型の複合体を作って、中央の空洞の中でタンパク質の折りたたみを促進する分子シャペロンの1グループであり、細胞質には CCT が存在し、ミトコンドリアには HSP60 が分布している。一方、大腸菌などには GroEL と呼ばれるホモログが存在する。CCT は、ヒトを初めとする全ての真核細胞の細胞質においてアクチンやチューブリンのフォールディングに必須の分子である。CCT は8種類ものサブユニットを介した非常に複雑で巧みなシャペロン機能を備えていると考えられ、世界的にも注目されているが、CCT が担う機能の詳細については不明なままである。

これまでに我々は、CCT が基質タンパク質のシートを認識してその凝集を防ぐことを、完全無細胞翻訳系 PURE SYSTEM を用いたインビトロ系を用いて示すとともに、CCT には生きた細胞内でも同様の凝集抑制効果があることをポリグルタミンを基質とした実験系により明らかにしてきた。

一方、HSP60 は、ミトコンドリア内において、補助因子である HSP10 と結合することによってタンパク質折りたたみのための空洞をつくるタイプのシャペロンである。しかしながら、その機能の詳細はほとんど解っていないのが現状である。最近我々は、HSP60 をインビトロで再構成することに成功し、その機能解析系を確立し、その複合体形成について解析した。その結果、HSP60 は、大腸菌ホモログである GroEL とは異なり、その複合体の状態を ATP 依存的に一重リングから二重リングへと構造変化することがわかった。このとき、HSP60 は HSP10 の存在下でフットボール型複合体を安定的に形成することもわかった。これらのことは、ミトコンドリア HSP60 の性質が大腸菌 GroEL のそれとは異なった部分を持っていることを示唆していた。

2. 研究の目的

シャペロニンは、真核生物から、古細菌や真性細菌に至るまで、全ての生物に存在する重要な分子シャペロンであり、生物に普遍的機能を担っているものと考えられる。一方、シ

ャペロニンにおいては、同じ細胞の中でも、サイトゾルとミトコンドリアでは、異なる種類のシャペロニン (CCT と HSP60) が分布しており、それぞれに、少なくとも部分的に特異的な機能を獲得した可能性がある。また、CCT を代表とする II 型シャペロニンと HSP60 や GroEL を代表とする I 型シャペロニンでは、その構造も部分的に異なる。

そこで、本研究課題においては、これら2種のシャペロニンの機能を詳しく解析することで、これらのシャペロニンがそれぞれの環境において独自に進化させてきた役割とその分子メカニズムの解明をめざした。同時に、これら2つのシャペロニンに共通の機能を明らかにすることで、シャペロニンによるタンパク質フォールディングの共通原理についての理解を深める。具体的には、CCT に関しては、シャペロニンとしての理解を深めるため、そのヌクレオチド依存性に関して、解析を行った。さらに、HSP60 に関しては、その ATP 依存的な反応サイクルの詳細を、様々な解析手法を用いて、具体的かつ定量的に解析した。

3. 研究の方法

まず、CCT をブタ精巢から精製した。この際、これまでに知られていた精製方法に改良を加えて、より少ないステップ数で簡便に CCT を精製できるようにした。精製した CCT を2次元電気泳動法、ゲル濾過クロマトグラフィー法、電子顕微鏡観察法等で解析し、完全な構造を保っていることを確認した。この精製 CCT を用いて、ヌクレオチドを加えて反応させた後、HPLC 法やマラカイトグリーン法により、ヌクレオチドの分解活性を測定した。さらに、プロテアーゼ K を用いて、ヌクレオチド存在下での、CCT の酵素分解に対する抵抗性についても解析した。

また、ヒト HSP60 と HSP10 を大腸菌に発現させ、このタンパク質を大腸菌から精製した。これらを ATP の存在下と非存在下でそれぞれ集合させ、複合体の形態や機能について、様々な方法で解析した。具体的には、電子顕微鏡観察法による分子形態の観察、非変性ゲル電気泳動法による複合体サイズの解析、ゲル濾過法による複合体サイズの解析、X 線小角散乱法による溶液中での分子サイズおよび分子形態の定量的解析、蛍光相互相関分光法による分子間相互作用の定量的解析、限定的酵素消化法による分子表面性状の解析などによって複合体構造の解析を行うとともに、変性させた基質タンパク質を用いて、フォールディング活性の測定を行った。さらに深く研究を進めるため、一部の機能を抑制した変異体を用いた解析も行った。また、HSP60/HSP10 と同様の解析を、大腸菌のホモログである GroEL/GroES にも行い、HSP60/HSP10 との比較検討を行うことで、分子進化的な考察を加えた。

4. 研究成果

CCT の研究においては、より簡便な精製法を確立し、実験系の改良をすることができた。この CCT を用いて、ヌクレオチド分解活性を測定したところ、CCT には GTP を分解する GTPase 活性があることを見出した。この活性は、ATP を分解する ATPase 活性と比べて十分な強度であると考えられた。さらに、ヌクレオチド存在下での、CCT の酵素分解に対する抵抗性について解析したところ、GTP とマグネシウムイオンの存在下で、有意な酵素耐性を示した。この酵素耐性は、ATP とマグネシウムイオンの共存下における CCT の酵素耐性と同等であったことから、GTP は ATP と同様に CCT を酵素耐性のある形に構造変化させることがわかった。GTP を分解する活性は、古細菌のシャペロニンにも類似の強度で存在することが知られているので、GTPase 活性は II 型シャペロニンに共通の性質であると考えられる。したがって、CCT の GTPase 活性は、II 型シャペロニンとしての機能に何らかの意味をもっているものと推測される。CCT が分布する真核細胞には GTP が存在するので、ATP に加えて、GTP も、ヌクレオチド依存的フォールディング介助活性に寄与している可能性がある。

HSP60 の研究では、様々な構造解析の結果から、ATP と HSP10 の存在化で、シングルリングからダブルリングを介してフットボール型複合体を形成してゆく詳細な溶液中での反応過程を明らかにした。X 線小角散乱法により、ATP や HSP10 の存在下と非存在下において、解析を行ったところ、分子の大きさや形状を表すパラメーターが有意に変化し、溶液中で、シングルリングからダブルリングを介してフットボール型複合体へと変化したものと考えられた。また、蛍光相互相関分光法による解析では、ATP の存在の有無が HSP10 と HSP60 との結合に強く影響することもわかった。また、ヌクレオチドアナログが構造変化に与える影響は、HSP60 と GroEL の間で異なっていた。変異体を用いた解析等からも、ATP の結合によってフットボール型複合体の形成が誘導され、フットボール型複合体の形成時にフォールディング活性が高まることが強く示唆された。これらの知見は、HSP60 が GroEL と少なくとも部分的に異なる複合体形成能や活性制御機構を備えていることを示唆しており、HSP60 がミトコンドリア機能に特化したシャペロンとして働いている可能性を示したものである。

以上のことから、シャペロニンはその分布している生物種や細胞内の部位によって、部分的に異なる性質を進化させてきたものと考えられ、今回得られたデータは、生物におけるタンパク質の分子進化を考える上で重要な知見であると言える。

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 9 件)

- 1) Yamamoto, S., Subedi, G.P., Hanashima, S., Satoh, T., Otaka, M., Wakui, H., Sawada, K.I., Yokota, S.I., Yamaguchi, Y., Kubota, H., Itoh, H. (2014) ATPase activity and ATP-dependent conformational change in the co-chaperone HOP. *J. Biol. Chem.* 289, 9880-9886. 査読あり, DOI: 10.1074/jbc.M114.553255.
- 2) Kakugawa, T., Yokota, S.I., Ishimatsu, Y., Hayashi, T., Nakashima, S., Hara, S., Sakamoto, N., Kubota, H., Mine, M., Matsuoka, Y., Mukae, H., Nagata, K., and Kohno, S. (2014) Serum heat shock protein 47 levels are elevated in acute interstitial pneumonia. *BMC Pulm Med.* 14, 41 (8 pages). 査読あり, DOI: 10.1186/1471-2466-14-48.
- 3) Yoshikawa, K., Naitoh, M., Kubota, H., Ishiko, T., Aya, R., Yamawaki, S. and Suzuki, S. (2013) Multipotent stem cells are effectively collected from adult human cheek skin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 431, 104-110. 査読あり, DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.12.069.
- 4) Kakugawa, T., Yokota, S.I., Ishimatsu, Y., Hayashi, T., Nakashima, S., Hara, S., Sakamoto, N., Kubota, H., Mine, M., Matsuoka, Y., Mukae, H., Nagata, K., and Kohno, S. (2013) Serum heat shock protein 47 levels are elevated in acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis. *Cell Stress Chaperones* 18, 581-590. 査読あり, DOI: 10.1007/s12192-013-0411-5.
- 5) Tashiro, E., Zako, T., Muto, H., Ito, Y., Sörgjerd, K., Terada, N., Abe, A., Miyazawa, M., Kitamura, A., Kitaura, H., Kubota, H., Maeda, M., Momoi, T., Iguchi-Arigo, S.M., Kinjo, M., and Ariga, H. (2013) Prefoldin protects neuronal cells from polyglutamine toxicity by preventing aggregation formation. *J. Biol. Chem.* 288, 19958-19972. 査読あり, DOI: 10.1074/jbc.M113.477984.
- 6) Kakugawa, T., Yokota, S., Ishimatsu, Y., Hayashi, T., Nakashima, S., Hara, S.,

- Sakamoto, N., Kubota, H., Mine, M., Y., Matsuoka, Y., Mukae, H., Nagata, K., and Kohno, S. (2013) Serum heat shock protein 47 levels in patients with drug-induced lung disease. *Respir. Res.*, 14, 133 (10 pages). 査読あり, DOI: 10.1186/1465-9921-14-133.
- 7) Hisatomi, K., Mukae, H., Sakamoto, N., Ishimatsu, Y., Kakugawa, T., Hara, S., Fujita, H., Nakamichi, S., Oku, H., Urata, Y., Kubota, H., Nagata, K. and Kohno, S. (2012) Pirfenidone inhibits TGF- β 1-induced over-expression of collagen type I and heat shock protein 47 in A549 cells. *BMC Pulm. Med.* 12, 24 (9 pages). 査読有り, DOI: 10.1186/1471-2466-12-24.
- 8) Noguchi, S., Toyoshima, K., Yamamoto, S., Miyazaki, T., Otaka, M., Watanabe, S., Imai, K., Senoo, H., Kobayashi, R., Jikei, M., Kawata, Y., Kubota, H. and Itoh, H. (2011) Cytosolic chaperonin CCT possesses GTPase activity. *Am. J. Mol. Biol.* 1, 123-130. 査読あり, DOI: 10.4236/ajmb.2011.13013.
- 9) Oguro, A., Kubota, H., Shimizu, M., Ishiura, S. and Atomi, Y. (2011) Protective role of the ubiquitin binding protein Tollip against the toxicity of polyglutamine-expansion proteins. *Neurosci. Lett.* 503, 234-239. 査読あり, DOI: 10.1016/j.neulet.2011.08.043.
- [学会発表](計 8 件)
- 1) 田村拓、山田大介、久保田広志
筋萎縮性側索硬化症原因タンパク質 SOD 変異体のリソソーム依存的分解
第 8 回臨床ストレス応答学会(松本市)
2013 年 11 月 15-16 日
- 2) Daisuke Yamada, Taku Tamura, Hiroshi Kubota. Lysosome-dependent degradation of ALS-linked mutant SOD1. International Mini-symposium Protein Folding and Disease. (秋田市)
2013 年 10 月 29-30 日
- 3) Taku Tamura, Akihiko Yatabe, Koji Ichinohe, Yuko Shimizu, Akira Kitamura, Masataka Kinjo, Hiroshi Kubota. Actin and myosin participate in the quality control of SOD1 aggregates. International Mini-symposium Protein Folding and Disease. (秋田市)
2013 年 10 月 29-30 日
- 4) 田村拓、矢田部暁彦、一戸康治、清水佑子、北村朗、金城政孝、久保田広志
アクチン・ミオシン系は筋萎縮性側索硬化症原因タンパク質 SOD1 変異体の凝集制御および分解に關与する
第 65 回日本細胞生物学会大会(名古屋市)
2013 年 6 月 19-21 日
- 5) Yamamoto, S., Yokota, S., Wakui, H., Kubota, H., Itoh, H, and Fujii, N. Aminoglycoside antibiotics suppress the Heat Shock Protein 70 function. 28th International Congress of Chemotherapy and Infection. (横浜市)
2013 年 6 月 5-8 日
- 6) 田村拓、矢田部暁彦、一戸康治、清水佑子、北村朗、金城政孝、久保田広志
筋萎縮性側索硬化症原因タンパク質 SOD1 変異体の凝集制御および分解おけるアクチンフィラメントの役割
第 35 回日本分子生物学会年会(福岡市)
2012 年 12 月 11-14 日
- 7) Motoko Naitoh, Toshihiro Ishiko, Satoko Yamawaki, Taku Tamura, Rino Aya, Katsuhiko Yoshikawa, Hiroshi Kubota and Shigehiko Suzuki. Serine Protease-Family Protein HtrA1 is Specifically Up-regulated in Keloid Lesions. 第 4 回世界創傷治療学会連合会議(WUWHS 2012)(横浜市)
2012 年 9 月 2-6 日
- 8) 石田竜一、久保田広志、高橋弘樹、岡俊、北村朗、金城政孝、伊藤英晃
シャペロニン Hsp60 の ATP、Hsp10 依存的なダブルリング化について
第 11 回日本蛋白質科学会年会(大阪市)
2011 年 6 月 7-9 日
6. 研究組織
- (1)研究代表者
久保田 広志(KUBOTA, Hiroshi)
秋田大学・工学資源学研究所・教授
研究者番号: 80332727
- (2)研究分担者
なし
- (3)連携研究者
永田 和宏(NAGATA, Kazuhiro)
京都産業大学・総合生命科学部・教授
研究者番号: 50127114
- 金城 政孝(KINJO, Masataka)
北海道大学・先端生命科学研究院・教授

研究者番号：70177971

北村 朗 (KITAMURA, Akira)
北海道大学・先端生命科学研究院・助教
研究者番号：10580152