

平成 21 年 6 月 8 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18770094
 研究課題名（和文） タンパク質の高次構造形成に重要な分子システムの研究 - Hsp110 の分子機構の解明
 研究課題名（英文） Studies on the molecular mechanism of Hsp110, a key component in the protein folding machinery
 研究代表者
 庄村 康人 (SHOMURA YASUHITO)
 兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・助教
 研究者番号：50423900

研究成果の概要：

タンパク質は多数のアミノ酸が繋がってできた直鎖状の高分子であり、正しく折りたたまれることによって機能を獲得する。本研究では、タンパク質の折りたたみを介助する因子として最近同定された Hsp110 の分子機構の解明を試みた。その結果、Hsp110 は、折りたたみに利用される Hsp70 による ATP の加水分解反応を促進する因子の一つであることが明らかとなり、その立体構造の決定によって作用機序のモデルが得られた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,800,000	0	1,800,000
2007 年度	900,000	0	900,000
2008 年度	400,000	120,000	520,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	120,000	3,220,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：構造生物化学

キーワード：Hsp110, 分子シャペロン, X線結晶構造解析, フォールディング, Sse1p

1. 研究開始当初の背景

生体内でのタンパク質の高次構造形成、品質管理の過程に関してはまだ不明な点が多い。アミノ酸配列の情報のみに従って個々のタンパク質が固有のフォールディングを自発的に形成するという単純なモデルはもはや過去のものであり、細胞内では巧妙な機構によって正しい高次構造形成が促進される。また、一度正しい立体構造を形成したタンパク質も生体内におい

て様々な形態をとり、これらが正しく機能するためには他のタンパク質による制御や品質管理が重要であることが分かってきた。さらに近年、タンパク質の不完全な高次構造形成やそれにとまなう凝集によって引き起こされる、“フォールディング病”の実態が明らかになりつつあり、この問題は生物学や医学の中でも最も注目されている分野の一つであるといえる。

最も主要な分子シャペロン（タンパク質

のフォールディングを促進したり不可逆的な変性を抑制するタンパク質の総称)の一つであるHsp70は複数の補因子と共に機能することが知られているが、これまでに知られている真核生物のHsp70システムは原核生物のものに比べて格段に効率が悪く、真核生物の細胞抽出液を加えることによりその効率は大きく改善される。このことは、真核生物にはまだ同定されていないHsp70システムの構成要素が存在することを示唆していた。

Hsp110は酵母からヒトまであらゆる真核生物の細胞質(一説には熱ショックにより核内に移行する)に存在し、Hsp70とHsp90に次いで発現量の多いストレスタンパク質(heat shock protein)で(例えばCHO細胞では総タンパク質のおよそ0.7%を占め、組織中では特に脳で発現量が多い)、小胞体に存在するパラログであるGrp170とともに新規の分子シャペロンとして注目されてきていた。構造的にはHsp70と類似したドメインから構成されている為はその類縁タンパク質とされているが、Hsp70には見られない幾つかの長い挿入配列を持ち、試験管内で変性したモデル基質タンパク質の高次構造形成を促進できないなど多くの点でHsp70とは異なる。その代わりに、Hsp110の過剰発現によってHeLa細胞やラット細胞が熱耐性を獲得することから、細胞内タンパク質の熱ストレスによる凝集や不可逆的な変性を抑制し、これらが正しい高次構造形成の可能な状態を保持するという機能が提唱されていた。また、生体内ではHsp110は単独ではなく、他のストレスタンパク質、例えばHsp70、sHsp (small heat shock protein)、Hsp90などと相互作用しながら協同的に機能することが分かっていた。その中でも特に、Hsp110はHsp70システムと密接に関与することが他の研究グループから報告されており、真核生物のHsp70システムを補完する因子としても期待されていた。

2. 研究の目的

本研究課題は、その分子シャペロンの一つであるHsp110の分子機構を構造生物学的手

法によって解明することを目的とした。本研究課題の科学研究費交付期間内に、Hsp110の全長構造、および基質との複合体構造を決定し、その構造情報に基づいて分子機構のモデルを考案し、機能解析によってそのモデルの妥当性を評価することを目指した。未だに機能未知であるHsp70の補因子は多く、これらの性質や生体内での役割を解明することによって、Hsp70自身の機能に関する理解が深まる事が期待されている。

3. 研究の方法

出芽酵母(*S. cerevisiae*)由来のHsp110を大腸菌の発現系により合成し、FPLCを用いて精製した。精製の効率を向上する目的で、全てのタンパク質はHis-tag融合タンパク質として大量発現させた。調製したタンパク質について、結晶化条件の初期検索を行った。得られた結晶を用いて、研究室内の回転陽極X線発生装置によって、あるいは放射光施設にてX線回折実験を行い、構造解析に適した結晶であるか判断し、必要であればさらに結晶化条件を最適化した。また、十分な回折が得られず、最初に用いたコンストラクトが不適當であると判断された場合は、安定な構造をとらず生体内の機能には不必要とされているC末端領域を削除し、このサンプルを用いて結晶化を行った。また、より良質な結晶の調製を目指すために*S. cerevisiae*以外の由来のHsp110のクローニングを行い、同様に結晶化実験とX線回折実験を行った。Hsp110は、Hsp70と相同性の高いATP結合ドメインを有しており、ATP結合が機能に与える影響を調べると共に結晶の質を向上させる効果を期待して、ATPを添加した試料の結晶化も平行して行った。また、同様にHsp110はHsp70と同様に基質(変性タンパク質)結合ドメインも持っているが、これまでにどのような基質と結合するかは明らかにされていなかった。そこで、ランダムペプチドスクリーニング及びファージディスプレイの2種類の手法によってHsp110の認識配列の検索を試みた。Hsp110には多くの挿入残基があり、共通ドメイン自体もアミノ酸配列上は保存性が低いことから、これらをモデルとした分子置換法による構造決定は難

しいと考えられた。実際に、実験的に位相を決定する必要性が生じたため、セレノメチオン誘導体タンパク質の結晶を作成し、この結晶を用いてデータ収集を行った。このようにして決定された位相情報と反射強度データから電子密度図を計算し、分子モデルの構築、精密化を専用の計算機で行った。

4. 研究成果

出芽酵母 *S. cerevisiae* 由来の細胞質 Hsp110 orthologue をクローニングし、His-tag 融合タンパク質として大腸菌の系で発現させ、高純度に精製することに成功した。さらに、両タンパク質について結晶化条件の検索を行った結果、複数の条件で結晶が得られた。これらの条件の最適化を行い、実験室の回転陽極型 X 線発生装置を用いて予備的な X 線回折実験を行ったところ、最高で分解能 8 Å 程度の回折が得られた。この結晶を用いて放射光施設 SPring-8 で X 線回折実験を行ったところ、分解能の向上はほとんど見られなかった。回折点自身は明瞭であったため、指数付けとデータ処理を行ったところ、空間群および格子定数は $R\bar{3}2$, $a, b = 155.4, c = 311.6$ Å で、7.5 Å 分解能までの R 値は 0.082 (0.423) であった。新規の結晶化条件の検索や既存の条件の最適化、結晶の凍結法の最適化、結晶の脱水操作、さらに ATP やその誘導体の添加によって分解能の向上を試みたが、著しい結晶性の改善は見られなかった。そこで、アミノ酸配列の同一性が約 80% 程度である、*S. pombe* 由来の Hsp110 のクローニングを行い、同様に精製、結晶化実験を行った。その結果、再現性良く結晶が得られる条件を決定することができ、得られた結晶の結晶性は、*S. cerevisiae* 由来のものとは大きく異なった。実験室の回転陽極型 X 線発生装置を用いた回折実験では最高で 4 Å 分解能の回折点を確認したが、異方性が高く、方向によっては 8 Å までしか回折点が見られなかった。この結晶について、さらに凍結条件の最適化を行い、放射光施設 SPring-8 で X 線回折実験を行ったところ、4 Å 分解能の回折点データの収集に成功した。データ処理の結果、空間群及び格子定数は $R2_12_1$, $a = 80.1, b = 157.9, c = 348.9$ Å で、4 Å 分解能までの R

値は 0.081 (0.327) であった。このデータを用いて、丁度その頃に報告された、*S. cerevisiae* 由来の Hsp110 の ATP 結合型 C 末端欠損体をモデルとした分子置換法によって初期位相が得られたが、Native データの分解能が低いことなどから、モデリングが可能な電子密度図は得られなかった。そこで、セレノメチオン置換タンパク質を大腸菌の系を用いて調製し、同様に結晶化を行ったところ、回折実験に使用できる結晶が得られた。放射光施設 SPring-8 にて回折データ収集を行い、4.4 Å の回折データを得ることに成功した。これらのデータと既知の構造の情報を用いて位相付けを行い、モデリング、構造精密化を進めたところ、720 アミノ酸残基中、660 残基分のモデルを構築し、精密化終了後の結晶学的 R 値は 0.382 ($R_{free} = 0.431$) であった。基質結合部位にはヌクレオチドの電子密度は見られず、ATP 結合ドメインは結合型に比べて約 1 度開いた構造をとっており、さらに全体構造にも隙間がより多く見られ、ゆるやかなパッキングをしていることが確認された (図 1a,b)。ATP 誘導体結合型の結晶構造と比較して全体構造に比較的大きな差異が見られ、今回のヌクレオチド非結合型の構造解析の結果は Hsp110 がヌクレオチドの結合によりその機能が制御されていることを示唆している。さらに、Hsp110 は結晶中で二量体を形成しており、ゲルろ過クロマトグラフィーと動的光散乱による解析の結果を考慮すると、これは溶液中での状態を反映していると考えられる。

また、構造解析と平行して行った機能解析によって、これまでに報告されている Hsp70 との共同的な細胞質内タンパク質の機能について、Hsp110 が Hsp70 のヌクレオチド交換因子として働いていることを示した。Hsp110 の C 末領域が Hsp70 の ATP 加水分解ドメインに結合することによって、ヌクレオチドの交換を促進しているものと考えられる。さらに、一般的な Hsp70 に加えて、リボソーム結合型の Hsp70 とも物理的に相互作用し、共同的に機能することも示した。これらの結果により、これまでに同定されている Hsp70 システムのタンパク質群に加えて Hsp110 も重要なその構成要素であることが明らかになった。ファ

ージディスプレイやランダムペプチドによる認識配列の検索においては、Hsp110 と特に親和性の高いアミノ酸配列は見つかっていない。今後は、Hsp110 の基質認識機構や Hsp70 以外のタンパク質との相互作用を解析することによって、より具体的な生体内での機能解明が期待される。



図 1a . ATP 非結合型 Hsp110 結晶構造

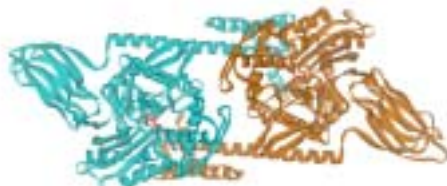


図 1b . ATP 結合型 Hsp110 結晶構造

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)

1. Dragovic Z., Shomura Y., Tzvetkov N., Hartl F.U., Bracher A.* (2006) Fes1p acts as a nucleotide exchange factor for the ribosome-associated molecular chaperone Ssb1p. *Biol. Chem.* 387,1593-1600

2. Dragovic, Z., Broadley, S. A., Shomura, Y., Bracher, A. & Hartl, F. U. (2006). Molecular chaperones of the Hsp110 family act as nucleotide exchange factors of Hsp70s. *EMBO J.* 25, 2519-28.

[学会発表](計 1 件)

Shomura Y., Bracher A., Hartl F.U. and Higuchi Y. XXI Congress of the International Union of Crystallography Congress and General Assembly, poster presentation "Crystal structure of the full-length Hsp110 molecular chaperone from *Schizosaccharomyces pombe* in the nucleotide-free state" (2009 Aug. 26-27, Osaka)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

庄村 康人

兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・助教
研究者番号：50423900

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし