

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06504

研究課題名(和文)半特異的認識を介したシャペロンネットワークの構造基盤

研究課題名(英文)Structural basis for chaperone network mediated by semi-specific recognitions

研究代表者

齋尾 智英 (SAIO, Tomohide)

徳島大学・先端酵素学研究所・教授

研究者番号：80740802

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：生体内では、複数のシャペロンが互いに弱い相互作用によってシャペロン複合体を形成し、新生タンパク質の折りたたみや輸送に置いて協働的に機能している。このようなシャペロンの協働性によって、シャペロンは多種の基質タンパク質の成熟を補助し、凝集体の形成を抑制しているが、その詳細なメカニズムは不明である。本研究では、シャペロン間の認識メカニズム、およびシャペロン複合体としての機能発現のメカニズムに着目し、弱く動的なタンパク質複合体の立体構造解析に優れる溶液核磁気共鳴(NMR)法を駆使し、シャペロン複合体について立体構造解析からシャペロンの多彩な機能のメカニズムを解明することに取り組んだ。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タンパク質フォールディングは生命維持に欠かせない根幹的なプロセスであり、その制御不全によって産生するタンパク質凝集体は細胞毒性を持ち、神経変性疾患の原因としても注目されている。そのため、シャペロンによるタンパク質フォールディングの補助、および変性タンパク質やタンパク質凝集体の除去についてのメカニズムの理解は、神経変性疾患などの治療法・予防法の開発基盤としても期待されている。本研究で明らかにされた、シャペロン間の認識メカニズム、および協働的機能のメカニズムは、細胞内タンパク質恒常性維持メカニズムについての理解を深め、ひいては神経変性疾患の治療法開発における新たな知見を与えるものである。

研究成果の概要(英文)：In the cell, multiple chaperones form chaperone complexes through weak interactions with each other and function cooperatively in the folding and transport of newly synthesized proteins. Through the weak interactions, chaperones assist in the maturation of various substrate proteins and inhibit aggregate formation, but the detailed mechanism is unknown. In this study, we focused on the recognition mechanism between chaperones and aim to understand how they exert various functions as a chaperone complex. More specifically, we exploited solution nuclear magnetic resonance (NMR) and biophysical methods and performed structural and interaction analyses for weak and dynamic chaperone complexes. Our study unveiled the mechanisms of the cooperative functions for the chaperone complexes responsible for protein degradation.

研究分野：構造生物学

キーワード：シャペロン複合体 NMR 立体構造解析 常磁性金属

1. 研究開始当初の背景

多くの生命現象が弱く流動的な分子間相互作用によって支配されているが、有効な解析ツールの欠如によって、その大部分は謎に包まれている。その代表例が、分子シャペロンによる制御である。分子シャペロンは、新生タンパク質のフォールディングを制御するのみならず、タンパク質の輸送や分解などにも深く関与し、細胞内のタンパク質の品質と恒常性を保っている。多くの場合、シャペロンは単独で機能するのではなく、活性や特性が異なる複数のシャペロンが半特異的で *promiscuous* な相互作用を介して協働的に機能している。これまでの研究代表者らの研究によって、シャペロンは複数かつ特定のシャペロンを認識し、複合体を形成して協働的に機能することによって基質タンパク質を受け渡し、基質タンパク質を特定の経路へと振り分けることが明らかになっている (Fig. 1)。しかし、シャペロンがどのようにして半特異的な相互作用を実現し、どのようにして協働的に機能するのか、その詳細なメカニズムはほとんど明らかにされていない。

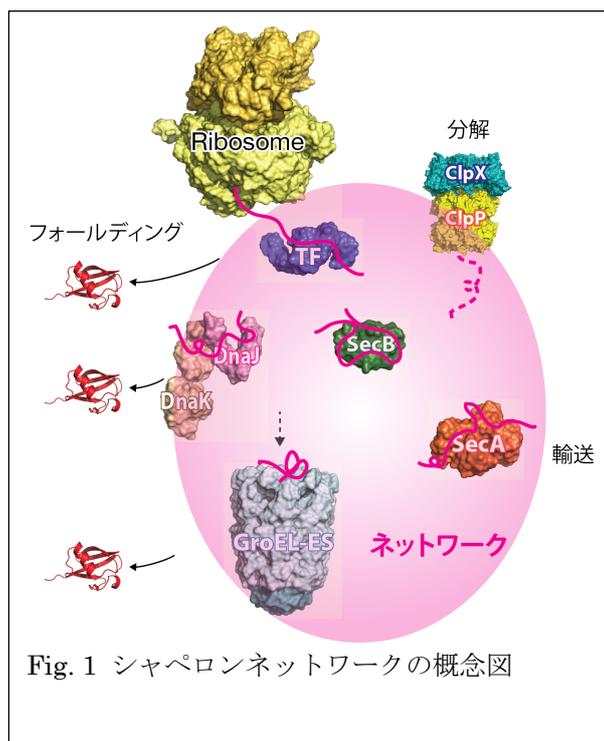


Fig. 1 シャペロンネットワークの概念図

メカニズム解明のためにはシャペロン複合体の立体構造情報が重要であるが、シャペロン複合体は K_D 数十 μM 程度の弱く動的な相互作用によって成り立っているために、相互作用解析や立体構造解析の難易度が高く、研究が遅れている。多くのシャペロンについて、X線結晶構造解析やクライオ電子顕微鏡解析によって単独での立体構造が明らかにされているが、シャペロン複合体についての立体構造解析は進んでいない。このような弱い相互作用であっても、数十 μM 程度の高濃度で存在するシャペロンにとっては十分に意味のある相互作用である。弱く動的なタンパク質複合体に対する構造解析手法の確立と、それによるシャペロン間相互作用や協働機能についてのメカニズム解明が求められている。

2. 研究の目的

本研究では、大腸菌細胞質のシャペロンネットワークを対象に、Trigger Factor (TF) シャペロンを中心としたシャペロン間の *promiscuous* な相互作用と、それを介した協働機能のメカニズム解明を目指した。特に、不良タンパク質の分解に関わるシャペロン ClpX と TF との相互作用解析・立体構造解析に取り組んだ。特に、溶液中での弱い相互作用や動的複合体の立体構造解析に優れる、溶液核磁気共鳴 (NMR) 法を主に用いた解析に取り組んだ。

3. 研究の方法

本研究ではまず、TF シャペロンおよび ClpX シャペロンについて、 ^{15}N または ^{13}C , 2H などの安定同位体で標識した試料を調製するため、大腸菌を用いた強制発現系を用いた。発現させたタンパク質はクロマトグラフィーシステム等を用いて精製した後、NMR 測定を実施した。TF と ClpX の相互作用を高い分解能で評価するために、全長タンパク質を用いた相互作用解析に加えて、ドメインに分割したコンストラクト、TF Peptidyl prolyl isomerase domain (PPD), TF substrate-binding domain (SBD), ribosome-binding domain (RBD), ClpX zinc-binding domain (ZBD), ClpX ATPases associated with diverse cellular activities (AAA) domain などについても用いた。NMR 相互作用解析においては、安定同位体標識した TF および TF ドメインに ClpX または ClpX ドメインを加え、その前後での NMR 信号の化学シフト変化および強度変化を評価した。

また、本研究では、シャペロン複合体の構造解析のために、常磁性金属を用いて長距離間の情報を取得することについても計画し、そのための手法開発にも取り組んだ。具体的には、タンパク質表面のシステイン残基を介してキレートタグをタンパク質表面の任意の部位に固定し、常磁性ランタノイドイオンを固定し、電子スピン共鳴 (ESR) による距離測定について検討した。

4. 研究成果

本研究ではまず、NMR 滴定実験により、TF と ClpX の相互作用解析に取り組んだ。全長 TF および全長 ClpX を用いた滴定実験を行った結果、信号摂動が観測され、両者の相互作用が確認された。一方で、TF 全長は二量体を形成するため、TF 全長を用いた実験では、ClpX との結合に伴う信号摂動に加えて、TF の二量体/単量体の平衡の変化に起因する信号摂動を観測する可能性が考えられた。ClpX との相互作用に起因する信号摂動についてより詳細に観測するために、TF ドメインを用いた滴定実験を行った。その結果、TF ドメインに ClpX ドメインを加えることにより、複数の NMR 信号に摂動 (化学シフト変化および強度変化) が観測された (Fig. 2)。摂動

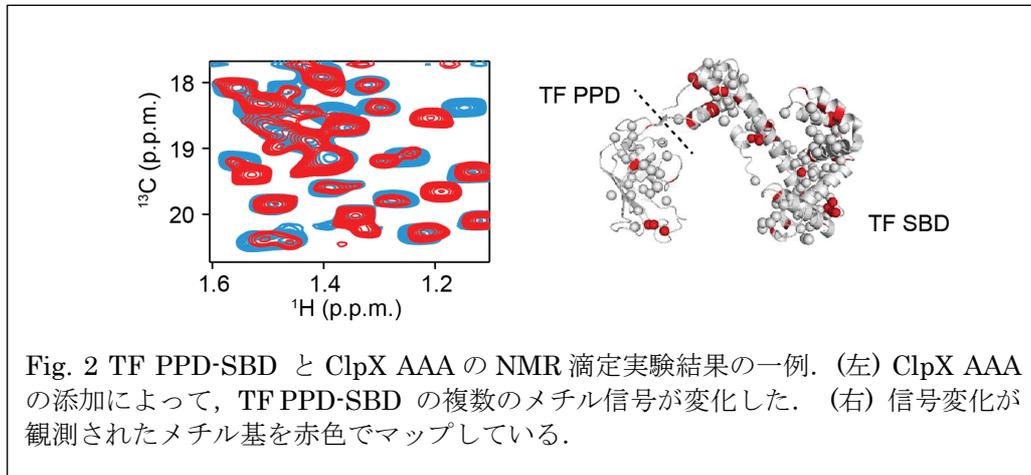


Fig. 2 TF PPD-SBD と ClpX AAA の NMR 滴定実験結果の一例。(左) ClpX AAA の添加によって、TF PPD-SBD の複数のメチル信号が変化した。(右) 信号変化が観測されたメチル基を赤色でマップしている。

が観測された信号は、TF PPD-SBD の複数の領域に由来しており、その結果から、TF は複数の結合面を用いて ClpX AAA を認識することが明らかになった。さらに、ClpX ZBD を用いた滴定実験においても、TF の複数の領域に由来する信号が観測されたことから、TF は、AAA だけではなく、ZBD についても認識することが明らかになった。興味深いことに、TF 上の ClpX-結合面は、TF の基質結合面や TF の二量体化における相互作用面と一部共通していたことから、TF と ClpX の相互作用は、TF の二量体形成および TF の基質結合と競合する可能性が示唆された。ClpX は、プロテアーゼである ClpP と複合体を形成し、不良タンパク質などのアンフォールディングと分解を担うことが知られ、TF と ClpX の相互作用が、ClpX によるタンパク質アンフォールディングを促進することも示されている。NMR の結果からは、TF に結合した基質タンパク質が、TF-ClpX 間の相互作用によって TF から ClpX に受け渡される、というメカニズムが示唆された。以上の内容を含む研究成果の一部は、国際共著論文として、国際誌に発表した (Kamran et al. 2021 *Nat. Commun.*)。

また本研究では、シャペロン複合体の構造解析のための手法開発として、常磁性ランタノイドイオンを用いた ESR 距離測定技術の開発にも取り組んだ。ここでは、モデルタンパク質である MurD に対して 2 つの常磁性ランタノイドイオンをそれぞれ特定の位置に固定し、その間の距離と分布を計測した。ランタノイドイオンを用いた ESR 距離測定においては、最大 8 nm 程度の金属間距離についての計測が可能になる。実験の結果、MurD のコンフォメーション多型と、リガンド結合に伴うコンフォメーション状態の変化を検出することに成功した (Saio et al. 2021 *Biophys. J.*)。本手法は、タンパク質の複数のコンフォメーション状態を分布として評価することが可能であるが、シャペロンやシャペロン複合体の構造解析においても、このような構造情報は有用であると期待される。

<引用文献>

Rizzolo K, Yu AYH, Ologbenla A, Kim SR, Zhu H, Ishimori K, Thibault G, Leung E, Zhang YW, Teng M, Haniszewski M, Miah N, Phanse S, Minic Z, Lee S, Caballero JD, Babu M, Tsai FTF, Saio T, Houry WA. Functional cooperativity between the trigger factor chaperone and the ClpXP proteolytic complex. *Nat Commun.* 2021 Jan 12;12(1):281. doi: 10.1038/s41467-020-20553-x.

Saio T, Hiramatsu S, Asada M, Nakagawa H, Shimizu K, Kumeta H, Nakamura T, Ishimori K. Conformational ensemble of a multidomain protein explored by Gd^{3+} electron paramagnetic resonance. *Biophys J.* 2021 Aug 3;120(15):2943-2951. doi: 10.1016/j.bpj.2021.06.033.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 3件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Okumura Masaki, Kanemura Shingo, Matsusaki Motonori, Kinoshita Misaki, Saio Tomohide, Ito Dai, Hirayama Chihiro, Kumeta Hiroyuki, Watabe Mai, Amagai Yuta, Lee Young-Ho, Akiyama Shuji, Inaba Kenji	4. 巻 29
2. 論文標題 A unique leucine-valine adhesive motif supports structure and function of protein disulfide isomerase P5 via dimerization	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Structure	6. 最初と最後の頁 1357 ~ 1370
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.str.2021.03.016	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Rizzolo Kamran, Yu Angela Yeou Hsiung, Ologbenla Adedeji, Kim Sa Rang, Zhu Haojie, Ishimori Koichiro, Thibault Guillaume, Leung Elisa, Zhang Yi Wen, Teng Mona, Haniszewski Marta, Miah Noha, Phanse Sadhna, Minic Zoran, Lee Sukyeong, Caballero Julio Diaz, Babu Mohan, Tsai Francis T. F., Saio Tomohide, Houry Walid A.	4. 巻 12
2. 論文標題 Functional cooperativity between the trigger factor chaperone and the ClpXP proteolytic complex	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 281-281
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-20553-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Taguchi Yuya, Saio Tomohide, Kohda Daisuke	4. 巻 11
2. 論文標題 Distance Distribution between Two Iodine Atoms Derived from Small-Angle X-ray Scattering Interferometry for Analyzing a Conformational Ensemble of Heavy Atom-Labeled Small Molecules	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 5451 ~ 5456
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpcllett.0c01107	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yoshizawa Takuya, Nozawa Ryu-Suke, Jia Tony Z., Saio Tomohide, Mori Eiichiro	4. 巻 12
2. 論文標題 Biological phase separation: cell biology meets biophysics	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biophysical Reviews	6. 最初と最後の頁 519 ~ 539
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12551-020-00680-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Saio Tomohide, Okumura Masaki, Lee Young-Ho	4. 巻 24
2. 論文標題 Solution NMR spectroscopy for investigation of liquid-liquid phase separation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of the Korean Magnetic Resonance Society	6. 最初と最後の頁 47 ~ 52
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Okumura M, Noi K, Kanemura S, Kinoshita M, Saio T, Inoue Y, Hikima T, Akiyama S, Ogura T, Inaba K.	4. 巻 15
2. 論文標題 Dynamic assembly of protein disulfide isomerase in catalysis of oxidative folding	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 499 ~ 509
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41589-019-0268-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Saio T, Ishimori K.	4. 巻 1864
2. 論文標題 Accelerating structural life science by paramagnetic lanthanide probe methods	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects	6. 最初と最後の頁 129332~129332
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbagen.2019.03.018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Saio T, Ishimori K.	4. 巻 59
2. 論文標題 Structural Basis for Protein Folding and Holding Mediated by Molecular Chaperones	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Seibutsu Butsuri	6. 最初と最後の頁 197 ~ 201
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2142/biophys.59.197	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Saio Tomohide、Hiramatsu Soya、Asada Mizue、Nakagawa Hiroshi、Shimizu Kazumi、Kumeta Hiroyuki、Nakamura Toshikazu、Ishimori Koichiro	4. 巻 120
2. 論文標題 Conformational ensemble of a multidomain protein explored by Gd ³⁺ electron paramagnetic resonance	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biophysical Journal	6. 最初と最後の頁 2943 ~ 2951
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bpj.2021.06.033	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Zhu Haojie、Matsusaki Motonori、Sugawara Taiga、Ishimori Koichiro、Saio Tomohide	4. 巻 10
2. 論文標題 Zinc-Dependent Oligomerization of Thermus thermophilus Trigger Factor Chaperone	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biology	6. 最初と最後の頁 1106 ~ 1106
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biology10111106	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計24件 (うち招待講演 20件 / うち国際学会 8件)

1. 発表者名 齋尾 智英
2. 発表標題 シャペロンから理解する細胞内タンパク質の動態制御メカニズム
3. 学会等名 第93回日本生化学会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 齋尾 智英、石森 浩一郎
2. 発表標題 Exploiting paramagnetic metal ions for protein structural study in solution
3. 学会等名 第 58 回日本生物物理学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 齋尾 智英
2. 発表標題 常磁性金属と分子シャペロン
3. 学会等名 2020年度日本分光学会NMR分光部会 集中講義 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tomohide Saio
2. 発表標題 On and off between molecular chaperones and clients: Appropriate distance and timing for protein folding
3. 学会等名 21st Hokudai-RIES International Symposium (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tomohide Saio
2. 発表標題 Mechanistic insights into a molecular chaperone in protein folding and degradation
3. 学会等名 2021 virtual Cold Spring Harbor Asia Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tomohide Saio
2. 発表標題 Applications of paramagnetic lanthanide ions in NMR and ESR
3. 学会等名 International IPR Seminar -Open up a new era of structural biology with advanced NMR study- (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomohide Saio
2. 発表標題 Structural and kinetic insights into molecular chaperones
3. 学会等名 International Symposium on Protein Folding and Misfolding-related Aggregation (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomohide Saio
2. 発表標題 Exploring conformational states of a protein enzyme using paramagnetic lanthanide ions
3. 学会等名 Biometal Science 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 齋尾 智英
2. 発表標題 第4回 LLPS 研究会・ASUKA 若手交流会 2019
3. 学会等名 低複雑性タンパク質の液-液相分離の制御と破綻のメカニズム: NMRによる解析 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 齋尾 智英
2. 発表標題 Structure and dynamics of molecular chaperones in protein folding, holding, and degradation
3. 学会等名 第2回 タンパク質可塑性についての研究会 - タンパク質と人工分子のダイナミクスと機能相関 - (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 齋尾 智英
2. 発表標題 金属イオンを用いたSAXSとNMRによるマルチドメインタンパク質の動的構造解析
3. 学会等名 PF研究会 -BioSASが拓く生体高分子の分子間相互作用解析の最前線- (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 齋尾 智英
2. 発表標題 タンパク質フォールディングにおける分子シャペロンの機能とメカニズム: 立体構造と速度論からのアプローチ
3. 学会等名 第92回 日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 齋尾 智英
2. 発表標題 細胞内恒常性維持を担うシャペロンの動的構造基盤と制御
3. 学会等名 日本生化学会北海道支部 第56回支部例会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomohide Saio
2. 発表標題 Protein structure and dynamics by solution NMR
3. 学会等名 ASUKA Symposium 2019 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 齋尾 智英
2. 発表標題 細胞内恒常性維持を担うシャペロンの動的構造基盤と制御
3. 学会等名 日本化学会北海道支部 奨励賞受賞講演（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 齋尾 智英, 平松 蒼野, 浅田 瑞枝, 瀧下 俊平, 中川 洋, 中村 敏和, 石森 浩一郎
2. 発表標題 Conformational ensemble of a multidomain protein MurD visualized by paramagnetic lanthanide probe methods in NMR and EPR
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会 第71回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 齋尾 智英, 平松 蒼野, 浅田 瑞枝, 瀧下 俊平, 齋藤 彦太, 中村 敏和, 石森 浩一郎
2. 発表標題 常磁性ランタノイドイオンを用いたNMRとEPRによるマルチドメインタンパク質の構造解析
3. 学会等名 第58回 NMR討論会SEST2019連合大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomohide Saio
2. 発表標題 NMR investigation of molecular chaperones manipulating protein folding
3. 学会等名 Pacifichem 2021（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tomohide Saio
2. 発表標題 Structural and kinetic insights into a molecular chaperone for protein folding, translocation, and degradation
3. 学会等名 Pacifichem 2021 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川越聡一郎、松崎元紀、石森浩一郎、齋尾智英
2. 発表標題 ストレス応答を制御する転写因子Heat shock factor1の酸化還元依存的な相転移
3. 学会等名 第44回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 齋尾 智英
2. 発表標題 多量体形成を介したシャペロンの機能制御
3. 学会等名 第44回 日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Honoka Kawamukai, Koichiro Ishimori, Tomohide Saio
2. 発表標題 ALS-associated factor PRn inhibit the function of KapB2
3. 学会等名 The 16th International Symposium of the Institute Network for Biomedical Sciences & KEY FORUM 2021 International Symposium (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tomohide Saio
2. 発表標題 Mechanistic insight into chaperone-mediated protein homeostasis
3. 学会等名 The 16th International Symposium of the Institute Network for Biomedical Sciences & KEY FORUM 2021 International Symposium (招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 齋尾 智英
2. 発表標題 タンパク質液滴の形成・制御・破綻の分子メカニズム
3. 学会等名 日本化学会第102春季年会(招待講演)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 液滴及びその製造方法	発明者 奥村正樹, 松崎元 紀, 金村進吾, 稲葉 謙次, 齋尾智英	権利者 東北大学、北海 道大学、関西学 院大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-100517	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

研究室ホームページ https://saio-lab.jp
徳島大学藤井節郎記念医科学センター分子生命科学研究室ホームページ https://www.fujii.tokushima-u.ac.jp/mls/

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
カナダ	University of Toronto			
米国	St. Jude Children's Research Hospital			