

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06513

研究課題名(和文)大腸菌 HdeA：「環境応答型」分子シャペロンが見せる可逆線維化反応の解析

研究課題名(英文)E. coli HdeA: Analysis of the reversible formation of fibrils by an environmentally responsive molecular chaperone

研究代表者

溝端 知宏 (Mizobata, Tomohiro)

鳥取大学・工学研究科・教授

研究者番号：50263489

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)：大腸菌のペリプラズムには低pHストレス時に自らの構造を酸変性させて他の蛋白質を保護するHdeA/HdeBという2種の分子シャペロンが存在する。本研究では変性構造を機能的に利用するHdeAとBが変性構造よりアミロイド線維を形成する性質を持つことに注目し、この線維化反応の詳細な解析と両者の比較を通して蛋白質変性と線維化に関する知見を得た。HdeAとHdeBは共にpH 2でアミロイド線維を形成し、中性pHでは線維が再溶解する「可逆性」を見せた。更に、線維形成中の中間構造の検出、そして、線維形成後の緩やかな構造転移も確認され、両者の線維化反応が実験条件に極めて敏感で複雑なものである事が見いだされた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

「蛋白質のダイナミックな変性構造が機能実現と調節に活用される」現象は最近注目を浴びている。特に真核細胞内で顕著に見られるこの変性蛋白質の新たな役割であるが、研究のモデルとなるような、蛋白質の変性構造と機能が関連付けられている蛋白質、特に、詳細な物理化学的解析に適したモデルとなる様な蛋白質の例がまだ少ない。本研究のHdeAとHdeBは「機能的変性蛋白質」の好例であり、更に「蛋白質の変性疾患」や「分子シャペロン」という重要現象とも関連性が高い。この為、本研究で得られた知見は広く他の蛋白質において「変性構造の役割」を理解する為に役立つ普遍的なものとなる。

研究成果の概要(英文)：The molecular chaperones HdeA and HdeB utilize a unique mechanism where their acid denatured states are used to express molecular chaperone activity. In this study we demonstrate that both HdeA and HdeB form regular fibril structures resembling amyloid fibrils. HdeA and HdeB fibrils differ in one important aspect from typical fibrils; HdeA and HdeB fibrils formed in acid both dissolve at pH 7 to recover soluble protein. Our research involves elucidating the details of this reversible fibrillation of HdeA and HdeB at acidic pH, with special focus on the numerous experimental conditions that alter the original reversibility of the fibrillation. We found multiple conditions under which both HdeA and HdeB form alternative fibrils that are not dissolved at pH 7, and the details of our experiments provide insights in understanding protein denaturation and fibrillation, as well as the mechanisms underlying the activities of intrinsically denatured proteins.

研究分野：構造生物化学

キーワード：分子シャペロン ペリプラズム アミロイド線維 機能的変性構造 フォールディング

## 1. 研究開始当初の背景

蛋白質の構造と機能の相関に関する最近の研究では、明確な構造を持たない変性構造が機能実現に活用されている現象に注目が集まっている。いわゆる「天然変性蛋白質」は、細胞内の多様な生理的機能の実現とその機能の複雑な調節を可能にしている。一方、細胞内に天然変性蛋白質が多く含まれることにより生じる細胞への障害、いわゆる神経変性疾患等を引き起こす天然変性蛋白質の凝集と線維化が天然変性蛋白質の構造・機能と関連する現象として同時に注目されている。ダイナミックな蛋白質の構造・機能相関の全貌を理解するには、「天然構造」、「変性構造」、そして「凝集(線維)構造」の三者が密接に関連している点を踏まえる必要がある。このような背景の元、この蛋白質の構造三態を正確に観察し、そして時には操作できる様なモデル系があれば、研究者は広く蛋白質全般の構造と機能相関を解明する普遍的な原理の解明が可能になる。

グラム陰性細菌である大腸菌には、外膜と内膜に囲われているペリプラズム空間に蛋白質の形と機能を守る様々な仕組みが備わっている。ペリプラズム内は外膜の孔(ポア)により菌体外へ通じており環境の急激な変化に応じて刻一刻と変化する。一例として、大腸菌が人の胃の中などに侵入するとペリプラズム内部は胃の強い酸性環境にさらされ、その中の蛋白質が酸で構造を崩し(変性し)、失活する。大腸菌ではこの様な低 pH での有害な蛋白質変性を防ぐため、2種類の分子シャペロン、HdeA と HdeB を発現し「酸環境に対する耐性」を菌に付与している。

HdeA と HdeB は共にサブユニット分子量が 1 万にも満たない 2 量体の蛋白質であり、分子シャペロンとして働く際に自らの酸変性構造を活用するというユニークな特徴を見せる。中性 pH ではこの 2 種の蛋白質は休眠構造に相当する 2 量体を形成し、pH が急激に低下すると 2 量体が酸変性し、同じく変性した他のペリプラズム蛋白質と結合してこれを安定化する。HdeA と HdeB はこの様に自分の構造が酸変性して初めて機能を発揮する為、この仕組みが簡易の「pH 変化センサー」として機能する。低 pH でペリプラズムの蛋白質が不安定化し、分子シャペロンの補助が必要とされる時のみ働く HdeA と HdeB は、(天然) 変性構造を機能の実現に用いる蛋白質の好例であり、この様な例は原核生物においては比較的珍しい。更に、HdeA と HdeB が蛋白質の構造を保護する分子シャペロン蛋白質である点も特徴的で、この様に蛋白質の構造と機能を理解する上で重要な特性を数多く併せ持つ HdeA と HdeB は蛋白質の構造を理解する為の興味深い研究対象である。

## 2. 研究の目的

本研究では、我々が HdeA のユニークな構造と機能の関連性を解析する実験において、酸変性した HdeA が神経変性疾患などで見られるアミロイド線維に酷似した線維沈殿物を容易に形成する事を見いだした事が着手の起点となっている[1]。酸変性 HdeA が形成するアミロイド線維は他の蛋白質では見られない様々な興味深い特徴を見せた。その中で最も我々が注目したのは HdeA 線維のいわゆる「可逆性」であった。パーキンソン病などで見かける蛋白質のアミロイド線維は一度形成されて細胞内で沈殿すると非常に安定である為、可溶化と細胞からの除去がほぼ不可能である。これに対し、低 pH で形成された HdeA の線維は溶液の pH を中性に戻すと簡単に可溶性状態に戻り、中性 pH の休眠 2 量体構造をほぼ定量的に回復した。HdeA は従って「2 量体構造」・「酸変性構造」・「線維沈殿」の 3 種類の特徴的な蛋白質構造を溶液の pH に応じて自由に形成する極めて珍しい蛋白質であり、構造間の遷移を詳細に解析する事も容易な、理想に近いモデル系となった。HdeA の研究を通して「機能を生む蛋白質の変性構造」や、「蛋白質線維化と変性蛋白質が生み出す機能の関係」等、蛋白質の構造を巡る様々な現象を詳細に研究することが可能となる。

そこで、我々は 3 年の研究期間を通して HdeA が形成する 3 タイプの構造、そして「分子シャペロン」という機能との関係を詳細に理解することを目指した。研究は「HdeA 線維化反応の分子機構について；線維が可溶化する反応の詳細を解明すること」、「HdeA 可逆線維化の普遍性について:HdeA と同様の仕組みで蛋白質を保護する類縁分子シャペロンの HdeB が可逆に線維を形成するか確かめること」、「HdeA の線維化を操る:低分子化合物の添加で HdeA の性質を変えること事を試みる事」という 3 つの具体的な目標を設定し、進めた。

本研究では、これら 3 項目のいずれについても一定の成果を得ることができた。

## 3. 研究の方法

(1)HdeA、および HdeB の調製：HdeA および HdeB は大腸菌内において発現されるプラスミドベクターをそれぞれ作成し、ホストとなる大腸菌を形質転換して得た細菌のペリプラズム画分より精製することで得た。精製は陰イオン交換クロマトグラフィー (HdeA、HdeB 共通) ならびに陽イオン交換クロマトグラフィー (HdeA) を利用して行った。

(2) 酸性 pH 条件下における HdeA および HdeB のアミロイド線維化反応追跡と特徴解明：HdeA、及び HdeB のサンプルをグリシン緩衝液、またはクエン酸・グリシン緩衝液に溶解した後、各酸性 pH に調整し、その後プレートリーダーを利用して 37°C で測定した。サンプルにお

ける線維の形成度合いはサンプルに添加する蛍光色素 Thioflavin-T がアミロイド線維と特異的に結合した際発する強い蛍光を指標に追跡した。

蛍光測定で線維の形成が確認されたサンプルについては一部採取し、ネガティブ染色法による透過型電子顕微鏡解析、そして線維を構成するポリペプチド鎖の二次構造特性を解析するために円偏光二色性スペクトル解析、及び FT-IR 赤外線吸収スペクトル解析等を実施した。

なお、詳細な実験条件、試料調製法については本研究背景となる文献[1]に記載している。

#### 4. 研究成果

(1) (背景)HdeA の線維化反応は中間的な構造を経て多段階プロセスで形成される[1]

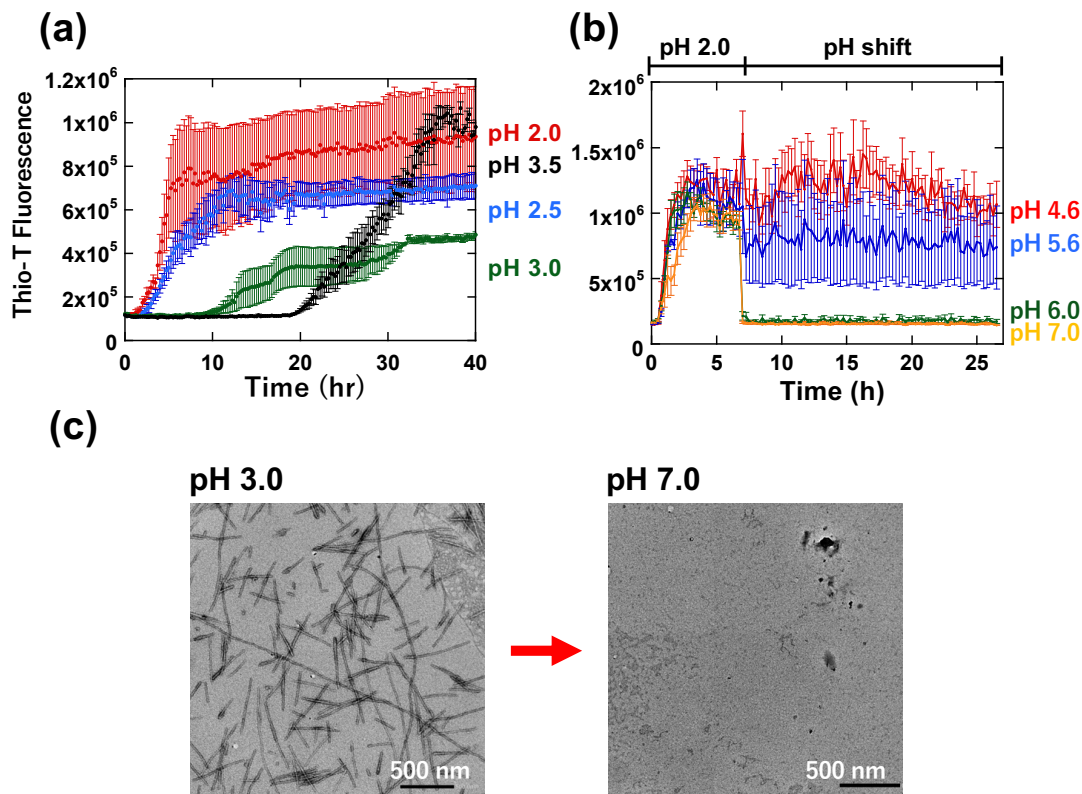


図 1. 様々な pH における大腸菌 HdeA の線維化反応[1]。(a) HdeA (1 mg/ml) を図示の pH に調整したグリシン緩衝液に溶解し、37°C で振盪した。(b) それぞれの pH で形成された線維は溶液の pH を中性(pH > 6)に設定すると再可溶化する。(c) pH 3 において形成された HdeA 線維は pH 7 では完全に解消した(透過型電子顕微鏡解析)。

図 1 に、酸における HdeA の線維化反応の特徴を示す実験の一例を示した。HdeA の線維化反応は溶液 pH に依存して進行し、pH > 3.5 の条件では線維が形成されないのが特徴であった。また、HdeA の線維は図 1(c)に示す様に規則正しい構造を示し、長さは数十 nm という短いものから 1 μm 以上の長いものまでに広く分布した一方で、線維の太さは一律で原子間力顕微鏡を用いた解析では約 6~8 nm と推定された。いずれの pH で形成された線維も、溶液の pH を 6 以上に調整すると直ちに線維の消失を示唆する蛍光のシグナル低下が見られ(図 1(b))、また電子顕微鏡画像でも線維の消失が確認された(図 1(c))。

次に、線維を形成する最中の HdeA の二次構造の変化を解析する為、蛋白質の二次構造に関する情報を得る円偏光二色性 (CD) スペクトル解析を利用した(図 2)。解析の結果、HdeA の線維化反応では最終の線維構造が形成される前にある中間構造が形成されることが示唆された。反応初期では図 2 の 216 nm における CD の負の吸収が増大する様子が確認され、これは線維内の β シート構造が増大している事を反映している。次に、反応が更に進行すると CD スペクトルの吸収極大が長波長側へ移動し、負の吸収値が反応初期とは逆に減少する様子が確認された。

最終的に形成された線維の二次構造含有率を推定したところ、HdeA の線維には α ヘリックス構造が非常に多く含まれること(条件によっては 50% 以上)が判明した。通常、アミロイド線維は非常に高い β シート構造含有率が特徴として挙げられる。HdeA が高い α ヘリックス含有率を保有している実験結果を受け、我々は HdeA 線維が pH 7 で可溶化し、2 量体を回復させる能力と高い α ヘリックス含有率に関連があると考えている。

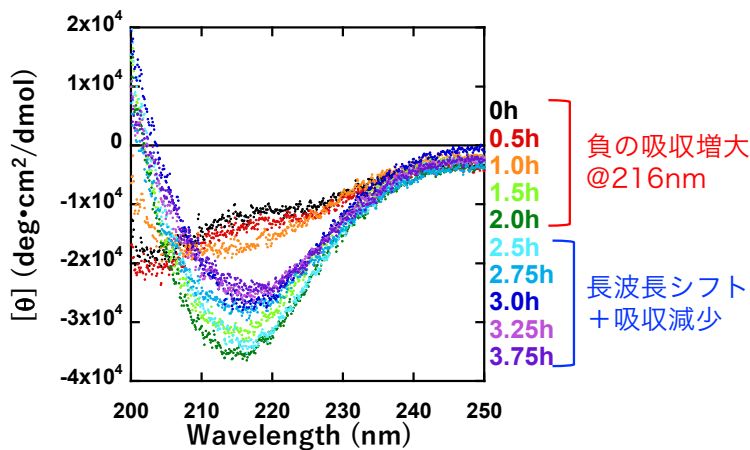


図2. HdeAの線維化反応中における二次構造変化の追跡(CDスペクトル測定)[1]。HdeAの二次構造は線維形成時に2段階のプロセスを経て変化することが判明し、初期段階では負の吸収の増大、反応の後期では波長の変化と負の吸収の減少が検出された。線維のCDスペクトルより二次構造含有率を推定したところ、高い $\alpha$ ヘリックス含有率が見られた。

(2) HdeAは特定の溶液条件で別形態の「不可逆線維」を形成した

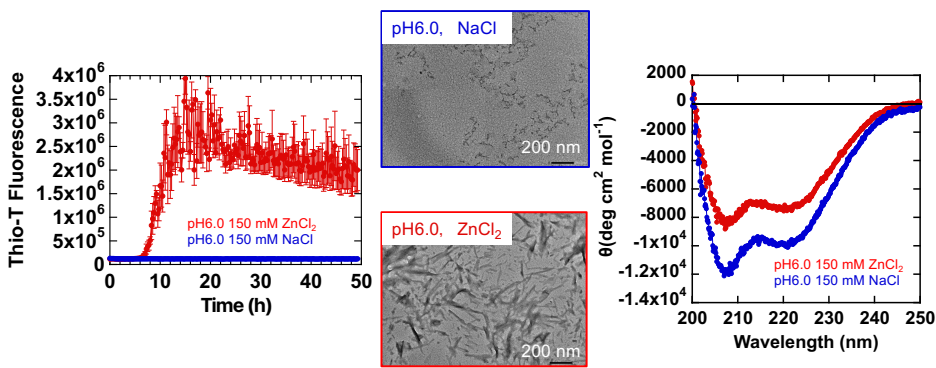


図3. HdeAは $Zn^{2+}$ イオン存在下で、中性で $\alpha$ ヘリックス含有率の高い不可逆線維を形成する。

HdeAのpH 2における可逆線維化反応はpH、塩濃度などの溶液の様々な条件に敏感に反応し、線維の形態や形成反応の特性を変化させることが実験的に確認できた。本研究では特に、HdeAが溶液中の二価陽イオンの存在に応じて様々な性質の変化を見せることを発見した。HdeA線維化反応における二価陽イオンの効果の中で最も興味深いものは、溶液に $Zn^{2+}$ イオンを添加した実験においてみられ(図3)、HdeAが $Zn^{2+}$ イオン存在下ではpH 6.0の中性条件でもアミロイド線維を形成する事が確認された。HdeAは中性条件で可溶性2量体構造を本来形成しているため、pH6.0でのHdeAのアミロイド線維出現は予想外の結果であった。更に、この新たなタイプの線維の二次構造をCDスペクトル測定で確かめたところ、この線維は $\alpha$ ヘリックス構造含有率が大変高いことが確かめられた。

$Zn^{2+}$ イオンが溶液に存在すると、HdeA 2量体構造がこのイオンに影響を受け、アミロイド線維の形成を可能にする部位が露出するのではないかと考察し、これを確かめるべく現在更に実験を進めている。今後の実験ではより詳細なHdeAの構造に関するデータの獲得と、HdeAアミノ酸配列内における線維化に関与する配列領域の特定などを急ぐ。

(3) 酸変性HdeBもHdeAと同様、pH依存的に可逆なアミロイド線維を形成したが、HdeBでは可溶化しない「不可逆線維」への緩やかな移行も確認された

HdeAと同様の分子機構で機能する類縁蛋白質のHdeBも酸変性状態よりアミロイド線維を形成すると予想し実験したところ、HdeBが容易に酸性条件で線維を形成する事が確認された(図4)。酸変性HdeBが線維を形成するpHの範囲は $pH < 3$ とHdeAとほぼ同一の強酸性条件であった。 $pH < 3$ ではHdeBが分子シャペロンとして機能しないことが報告されている為[2]、HdeBの線維化構造は分子シャペロン機能とは無関係の高度に変性した状態であると示唆された。更に、一旦形成されたHdeBの線維は溶液のpHを中性に戻すとHdeAと同様、可溶化する様子が見られた(図4、“24h”)。ところが、pH 2で形成されたHdeBの線維サンプルをpH 2で長時間(3、4日)静置保存すると、線維はpH 7でも解消されない構造へと緩やかに変化している様子が確認された(図4、“72h” “96h”)。HdeBでは低pHで線維が形成された後、構造の変化が更に緩やかに進み、pH 7で可溶化されない線維構造へ変化するという、この様な緩やかな構造変化は細胞の中における疾患との関連が高い蛋白質のアミロイド線維反応とも類似点が多く、この点を念頭にHdeBの構造的特性を今後より詳細に解析する。

#### (4) HdeA の線維化反応に影響を及ぼす低分子化合物の同定

蛋白質の線維形成反応は特定の低分子との結合、及び配列内のアミノ酸側鎖の化学修飾などに影響を受けることが知られている。HdeA と HdeB の線維化反応は両者の分子シャペロン機能と関連が高く、またその分子シャペロン機能が菌の環境応答能力維持に重要である。そこで、将来的に大腸菌や他のグラム陰性細菌への感染予防と治療等の応用に本研究の成果を応用する可能性を想定して、HdeA の線維形成反応に作用してその性質を改変する様々な低分子化合物の検索を実施した。実験の結果、HdeA の線維形成反応に特異的な影響を及ぼす低分子化合物が複数同定された。興味深いことに、同定された化合物の中には HdeA の線維形成反応を促進するもの、逆に抑制するものなどが含まれ、各々の化合物が HdeA に異なるメカニズムで作用する事が示唆された。今後の研究ではこれらの化合物が HdeA と作用する具体的な部位の同定や、反応に及ぼす影響の分子機構を解明することで HdeA 線維化反応を更に詳細に解析していく。

#### (5) 本研究のインパクトと今後の展望

本研究で解明した HdeA、HdeB の線維化反応に関する知見は蛋白質の変性、凝集と線維化、及び変性蛋白質が生理的機能を発揮する上の分子機構に関する情報を数多く提供するものであり、今後 2 種の分子シャペロンの構造動態における類似点、相違点が比較研究を通して解明されていくことで、蛋白質構造における普遍的な原理の解明につながる事が期待できる。更に、本研究では HdeA と HdeB の構造が pH をはじめとする各種要因に非常に敏感に反応し、その構造的性質を変化させる様子が垣間見られた。大腸菌のペリプラズムは脂質膜、ペプチドグリカン、各種蛋白質などが高濃度で存在する夾雑空間で、更に菌体外の環境変化に左右されやすい、非常にダイナミックな空間である。この様な空間で蛋白質の構造と機能の「恒常性」を維持する様に作用する HdeA と HdeB の性質解明はペリプラズムにおける諸現象の理解にも貢献することが期待される。

#### 参考文献

- [1] Miyawaki, S., Uemura, Y., Hongo, K., Kawata, Y., and Mizobata, T. (2019) Acid-denatured small heat shock protein HdeA from *Escherichia coli* forms reversible fibrils with an atypical secondary structure. *J. Biol. Chem.* **294**, 1590-1601
- [2] Dahl, J. U., Koldewey, P., Salmon, L., Horowitz, S., Bardwell, J. C., and Jakob, U. (2015) HdeB functions as an acid-protective chaperone in bacteria. *J. Biol. Chem.* **290**, 65-75

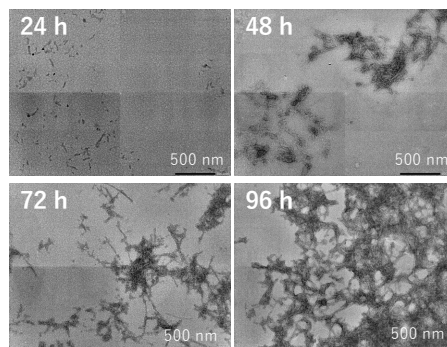
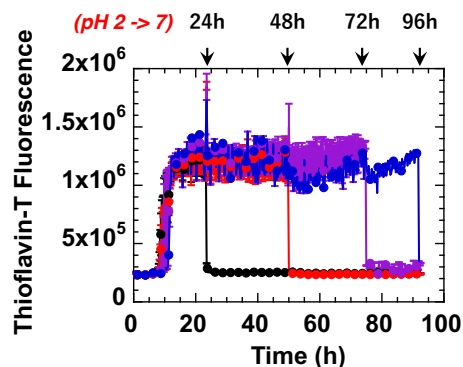


図 4. HdeB の線維は pH 2 において長時間保管すると pH 7 では解消されない「不可逆」線維へと構造を変化させる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Fukui Naoya, Yamamoto Hanae, Miyabe Moe, Aoyama Yuki, Hongo Kunihiro, Mizobata Tomohiro, Kawahata Ichiro, Yabuki Yasushi, Shinoda Yasuharu, Fukunaga Kohji, Kawata Yasushi	4. 巻 296
2. 論文標題 An $\alpha$ -synuclein decoy peptide prevents cytotoxic $\alpha$ -synuclein aggregation caused by fatty acid binding protein 3	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 100663 ~ 100663
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2021.100663	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 -
1. 著者名 Kawahata Ichiro, Sekimori Tomoki, Wang Haoyang, Wang Yanyan, Sasaoka Toshikuni, Bousset Luc, Melki Ronald, Mizobata Tomohiro, Kawata Yasushi, Fukunaga Kohji	4. 巻 9
2. 論文標題 Dopamine D2 Long Receptors Are Critical for Caveolae-Mediated $\alpha$ -Synuclein Uptake in Cultured Dopaminergic Neurons	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 49 ~ 49
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biomedicines9010049	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 Cheng An, Wang Yi-fei, Shinoda Yasuharu, Kawahata Ichiro, Yamamoto Tetsunori, Jia Wen-bin, Yamamoto Hanae, Mizobata Tomohiro, Kawata Yasushi, Fukunaga Kohji	4. 巻 43
2. 論文標題 Fatty acid-binding protein 7 triggers $\alpha$ -synuclein oligomerization in glial cells and oligodendrocytes associated with oxidative stress	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Acta Pharmacologica Sinica	6. 最初と最後の頁 552 ~ 562
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41401-021-00675-8	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 -
1. 著者名 中田結衣, 宮脇史織, 東末剛己, 溝端知宏	4. 巻 53
2. 論文標題 大腸菌の「環境応答型」分子シャペロンが見せる可逆線維化反応の解析	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 月刊細胞	6. 最初と最後の頁 565-568
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 無
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 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 宮部 萌, 山本英絵, 福井 直也, 本郷 邦広, 溝端 知宏, 福永 浩司, 河田 康志
2. 発表標題 真核細胞内における シヌクレインと脂肪酸結合タンパク質FABP3の相互作用に関する研究
3. 学会等名 第21回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 北崎悠人, 中田結衣, 上原梨那, 本郷邦広, 河田康志, 溝端知宏
2. 発表標題 環境応答型分子シャペロンHdeBの可逆線維化反応
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 東末剛己, 宮脇史織, 本郷邦広, 溝端知宏
2. 発表標題 酸感受性分子シャペロンHdeAの可逆的アミロイド線維形成と金属イオンに関する研究
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 古川敦智, 本郷邦広, 河田康志, 溝端知宏
2. 発表標題 酸感受性分子シャペロンHdeAの不活性化を誘発するペプチド配列の検索
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 上原梨那、中田結衣、本郷邦広、河田康志、溝端知宏
2. 発表標題 HdeBの線維化およびその構造特性
3. 学会等名 第20回 日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tomohiro Mizobata
2. 発表標題 The structural landscape of the periplasmic molecular chaperones HdeA and HdeB: Acid induced activation of molecular chaperone activity and fibrillar aggregation
3. 学会等名 The 10th KRIBB Asia-Pacific IDP Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 溝端知宏
2. 発表標題 酸変性に誘発される大腸菌ペリプラズムHdeAの分子シャペロン機能と可逆線維化
3. 学会等名 第 92 回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 溝端知宏
2. 発表標題 環境応答型分子シャペロンが見せる可逆線維化反応とその応用
3. 学会等名 日本ペプチド学会 第26回ペプチドフォーラム (招待講演)
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 宮脇史織, 本郷邦広, 河田康志, 溝端知宏
2. 発表標題 大腸菌ペリプラズム分子シャペロンHdeAが見せる可逆線維化反応の構造多型
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 合同年次大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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