

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20760536
 研究課題名（和文）プレフォルデインの形成する多様な構造による変性タンパク質認識機構の解明
 研究課題名（英文）Denatured protein recognition mechanism of multiple conformation of prefoldins.
 研究代表者
 大滝 証 （OHTAKI AKASHI）
 東京農工大学・大学院工学府・特任助教
 研究者番号：30466924

研究成果の概要（和文）：本研究課題では超好熱性古細菌（*Thermococcus* sp. KS-1）の生産する 6 種類のプレフォルデインのうち、 $\alpha 1$ - $\beta 1$ ヘテロヘキサマー複合体ならびに $\beta 2$ ホモテトラマーの結晶化を行い、 $\alpha 1$ - $\beta 1$ ヘテロヘキサマーならびに $\beta 2$ ホモテトラマー複合体の構造を決定した。また、 $\beta 2$ テトラマーと変性インスリンとのドッキングシミュレーションを行い、PFD のもつ構造多様性、基質認識機構について明らかにした。

研究成果の概要（英文）：In this study, we have determined the crystal structure of *Thermococcus* sp. KS-1 $\alpha 1\beta 1$ hetero-hexamer complex prefoldin and $\beta 2$ homo-tetramer complex prefoldin. In addition, we examined the substrate binding mode of TsPFD $\beta 2$ tetramer complex by molecular dynamics (MD) simulation. Our results showed that the substrate binding mode of tetramer complex is different from that of PFD hexamer complex.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・生体機能・バイオプロセス

キーワード：分子シャペロン、結晶構造解析

1. 研究開始当初の背景

PFD は古細菌や真核細胞の細胞質に存在する分子シャペロンであり、変性状態のタンパク質を基質として捕捉し、グループ II 型シャペロニンへと受け渡す役割を担っている。古細菌の PFD は 2 つの α サブユニット及び 4 つの β サブユニットからなる 6 量体であり、各サブユニットの N 末端及び C 末端領域には

長い α ヘリックスが存在してコイルドコイル構造を形成している。一方、いずれのサブユニットも中央部に β ストランドが存在し、各サブユニットはこの β ストランドを介して会合し、コイルドコイル構造がこれにぶら下がるようなクラゲ様構造をしている。電子顕微鏡実験などから、PFD は可動性の高いコイルドコイル構造を変化させて空洞内部の大

きさを調節し、様々な形、大きさの変性タンパク質を捕捉し、凝集を抑制することがわかっている。しかし、PFDはその運動性の高い構造から結晶化が困難であり、また、結晶構造が得られても基質結合に関わるコイルドコイル先端の構造は揺らいでいるため、基質認識機構に関する構造情報は多くない。

申請者らのグループは、超好熱性古細菌 *Pyrococcus horikoshii* PFD (PhPFD) を材料とした生化学的解析により、変性タンパク質結合部位、グループ II 型シャペロンへの結合部位について明らかにしている。超好熱性古細菌 *Thermococcus* sp. strain KS-1 PFD には 2 種類の α サブユニット ($\alpha 1$ 、 $\alpha 2$) と β サブユニット ($\beta 1$ 、 $\beta 2$) 遺伝子が存在することが明らかとなった。申請者らは各サブユニットの組換え体発現系を作製し、in vitro で 4 種類の複合体を形成させ ($\alpha 1$ - $\beta 1$ 、 $\alpha 2$ - $\beta 1$ 、 $\alpha 1$ - $\beta 2$ 、 $\alpha 2$ - $\beta 2$)、全てが分子シャペロン活性を有していることを明らかにした。さらに、 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ サブユニットは単独で 4 量体を形成し、シャペロン活性を示すことも明らかにした。これらの結果は、*Thermococcus* sp. strain KS-1 では、PFD サブユニットの組み合わせを変え、生育環境、基質タンパク質の種類に応じた多様性を生み出していることを強く示唆していた。

2. 研究の目的

本研究課題では、真核細胞と同様に複数のサブユニット遺伝子をもつ *Thermococcus* sp. strain KS-1 由来 PFD を材料とし、(1) 様々なサブユニット組成の PFD の結晶構造解析、(2) 分子動力学計算による変性タンパク質捕捉時におけるダイナミックな構造変化を伴う基質認識の多様性の解明により PFD のもつ共通基質認識機構について明らかにすることを研究目的とした。

3. 研究の方法

(1) 様々なサブユニット組成の PFD の結晶構造解析

Thermococcus sp. strain KS-1 は 6 種類の PFD ($\alpha 1$ - $\beta 1$ 、 $\alpha 2$ - $\beta 1$ 、 $\alpha 1$ - $\beta 2$ 、 $\alpha 2$ - $\beta 2$: ヘテロヘキサマー、 $\beta 1$ ならびに $\beta 2$: ホモテトラマー) を生産する。そのため、*Thermococcus* sp. strain KS-1 生育環境、基質タンパク質の種類に応じて機能の異なる PFD を発現させている可能性が高い。そこで、それぞれの PFD の構造について X 線結晶解析を用いて明らかにする。

(2) 分子動力学計算による変性タンパク質捕捉時におけるダイナミックな構造変化を伴う基質認識の多様性の解明

PFD の基質である変性タンパク質は、立体構造が不均一であるとともに高い運動性

を有している。それに対応して PFD の基質認識部位も柔軟な立体構造を有するはずであり、両者の相互作用を X 線結晶構造解析で詳細に解析することは容易ではない。MD 計算プログラム Amber8 の sander モジュールを用いて、分子シャペロンの活性評価によく用いられる基質タンパク質 (インスリン) について、その結晶構造から変性状態モデルを構築する。計算による変性条件は PFD の活性測定条件と同じ温度である 330K で行うことで、疎水性残基が表面に露出した擬似的な熱変性状態のモデルを作製する。得られた変性状態の基質タンパク質モデルと PFD とのドッキングは manual で行い、エネルギー極小化計算により最適化したものを初期構造とする。この初期構造の周囲に半径 40Å の球状の水を発生させ、330K にて MD シミュレーションを行ない、基質結合に伴う構造変化、分子間相互作用について観測する。同様に異なる初期構造、基質タンパク質を用いて MD シミュレーションを行い、共通してみられる構造変化から PFD の基質認識機構について考察を行なった。

4. 研究成果

(1) 様々なサブユニット組成の PFD の結晶構造解析

6 種類の PFD の精製、結晶化を行ったところ全ての PFD の結晶が得られたが、 $\alpha 1$ - $\beta 1$ ヘテロヘキサマーと $\beta 2$ ホモテトラマーの結晶からのみ X 線回折データが得られた。

$\alpha 1$ - $\beta 1$ ヘテロヘキサマーの結晶構造解析

$\alpha 1$ - $\beta 1$ ヘテロヘキサマーの初期位相の決定は PhPFD の構造を用いた分子置換法により行い、分解能 3.0 Å の構造を決定した (図 1(a), (b))。

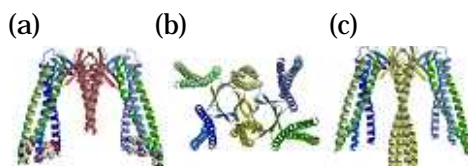


図 1 $\alpha 1$ - $\beta 1$ ヘテロヘキサマーの全体構造 (a) side view (b) bottom view (c) モデリング

$\alpha 1$ - $\beta 1$ ヘテロヘキサマーは 2 つの $\alpha 1$ サブユニットと 4 つの $\beta 1$ サブユニットからなるヘテロヘキサマー構造をしていた。得られた構造は我々が既に報告している PhPFD の構造と大変類似しており、各サブユニットの両末端にあるヘリックス部がペプチド鎖中央部のストランドを介して会合した六本の Coiled-Coil ヘリックスが突き出たクラゲ様構造を形成していた。得られた構造から、 $\alpha 1$ - $\beta 1$ ヘテロヘキサマー

は beta1 サブユニット末端の疎水性の溝で変性タンパク質と相互作用し、6本のコイルドコイルヘリックスで形成される空洞内部に基質タンパク質を捕捉すると考えられた。一方、得られた構造の alpha1 サブユニットは末端領域の揺らぎが大きく電子密度が観測されなかったため末端領域まで構造を決定することができなかった。そこで alpha1 サブユニット単独の構造解析を行った。得られた高分解能 alpha1 サブユニット構造 (1.7 分解能) は末端まで電子密度が観測され、alpha1 サブユニット全長の構造を決定した。得られた構造と alpha1-beta1 ヘテロヘキサマー複合体の alpha1 サブユニットの部分を重ね合わせることで alpha1-beta1 ヘテロヘキサマー構造をモデリングにより構築した (図 1(c))。得られた構造において、alpha1 サブユニットのコイルドコイル領域は beta1 サブユニットに比べ、疎水性の溝が存在しておらず、基質タンパク質捕捉には関与しない可能性が示唆された。

beta2 ホモテトラマーの結晶構造解析

beta2 ホモテトラマーの初期位相の決定は重原子オスニウム置換体結晶を用いた SAD 法により行い、分解能 1.7 の構造を決定した。beta2 ホモテトラマーは、alpha1-beta1 ヘテロヘキサマーから alpha1 サブユニットが抜けた構造に相当するテトラマー構造を形成しており、ヘキサマーと同様 4つのコイルドコイルヘリックスからなるクラゲ様構造をしていた (図 2(a),(b))。コイルドコイル末端領域には疎水性アミノ酸によって形成される疎水性の溝が存在している。また、N 末端側ヘリックスの Tyr7 残基が空洞内に張り出しており、空洞の底を形成しているような構造をしていた。その結果 beta2 テトラマーの空洞は大変浅くなっている。

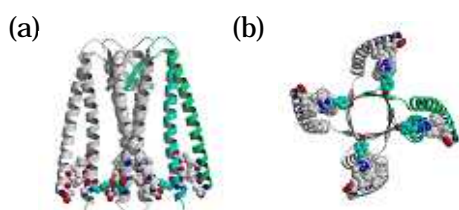


図 2 beta2 ホモテトラマーの全体構造 (a) side view (b) bottom view

この beta2 ホモテトラマーと alpha1-beta1 ヘテロヘキサマーの構造を比較すると、beta2 ホモテトラマーは サブユニットが抜け落ちているため、末端に位置する疎水性の溝の向きが alpha1-beta1 ヘテロヘキサマーとは異なっていた (図 1(b)、図 2(b))。また、空洞内のサイズも大きく異なっており (50 × 90 ; alpha1-beta1 ヘテロヘキサマー、36 × 36 ; beta2 ホモテトラマー) ヘキサマー複合体とテトラマー複合体では基質特異性、

基質認識機構が異なる可能性が示唆された。また、beta2 ホモテトラマーのシャペロン活性測定の結果、beta2 ホモテトラマーは低分子量基質タンパク質に対してのみ活性を示した。

(2) 分子動力学計算による変性タンパク質捕捉時におけるダイナミックな構造変化を伴う基質認識の多様性の解明

結晶構造解析の結果、ヘキサマー複合体とテトラマー複合体では基質特異性、基質認識機構が異なる可能性が示唆された。そこで、beta2 ホモテトラマーの基質認識機構を検討するために、beta2 ホモテトラマーと変性蛋白質 (インスリン) との分子動力学法によるドッキングシミュレーションを行った。インスリンは計算科学的に 350K で変性させたモデルを用いた。変性させたインスリンを beta2 ホモテトラマー空洞近傍に配置し、ドッキングシミュレーションを行った。MD 計算の結果、変性インスリンは空洞内部の方へ移動し、基質結合時における beta2 ホモテトラマーの構造変化、分子運動を観測することができた。シミュレーションを行っている間、空洞内部に張り出した

Tyr7 残基が常に変性インスリンと強く相互作用しており、インスリンの空洞内部への侵入を防いでいた (図 3(a))

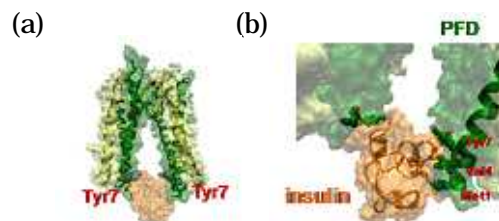


図 3 beta2 ホモテトラマーと変性インスリンのドッキングシミュレーション (a) 全体構造 (b) ヘリックス先端における基質認識

これらのことから、Tyr7 は基質認識と同時に基質の空洞内進入に伴う構造崩壊を防ぐ重要な残基であることが示された。また、コイルドコイルヘリックス先端に位置する疎水性溝は基質結合に関与しておらず、ヘリックス先端に位置する 3つの疎水性残基によって変性蛋白質の表面に露出した疎水性残基と相互作用、認識していた (図 3(b))。以上の結果より、ヘテロヘキサマーとホモテトラマーでは基質認識機構が異なっていることが示された。また、超好熱性古細菌 *Thermococcus* sp. KS-1 は極限環境下において、その環境、また基質の種類に応じて、プレフォルデインの種類を使い分け、適応している可能性が示された。

本研究では、超好熱性古細菌 *Thermococcus* sp. KS-1 の生産する多種多様な PFD の構造と機能について解析を行った。構造解析につい

では、alpha1-beta1 ヘテロヘキサマーならびに beta2 ホモテトラマーの結晶構造を決定した。alpha1-beta1 ヘテロヘキサマーの構造は既に構造が報告されている 2 種類の PFD と同様の構造をしており、ヘテロヘキサマー構造である PFD の基質認識機構、基質認識部位は種に関係なく同様なものである可能性を示した。また、beta2 ホモテトラマーの構造を決定した。beta2 ホモテトラマーの構造は alpha サブユニットを持たない新規の構造である。beta2 ホモテトラマーはヘテロヘキサマーとは空洞内部の大きさ、コイルドコイル末端の疎水性の溝の配向が異なっており、PFD の持つ構造・変性タンパク質認識の多様性について構造学的に初めて示した。また、beta2 ホモテトラマーと変性タンパク質のドッキングシミュレーションを行い、変性タンパク質認識機構について考察を行った。この分子シャペロンである PFD と変性タンパク質認識について計算科学的に可視化・考察を行う試みは、我々のグループ以外に報告例はない。今後、PFD のような多様な構造変化を示すシャペロン、新規分子シャペロンの機能解析に関する研究が飛躍的に展開されることが期待される。

本研究成果は基礎科学的なものであるが、今後、ヒトを含め真核生物のもつ多様で複雑な PFD の構造、機能を理解する上で重要な意味を持つことが期待される。

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)

Muhamad, S., Zako, T., Phan, T., Ohtaki, A., Noguchi, K., Maeda, M., Miyatake, H., Dohmae, N. and Yohda¹ M. Thermodynamic Characterization of the Interaction between Prefoldin and Group II Chaperonin. *J. Mol. Biol.* (2010) In press 査読有

Takenoya, M., Ohtaki, A., Noguchi, K., Endo, K., Sasaki, Y., Ohsawa, K., Yajima, S. and Yohda, M. Crystal structure of 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate reductoisomerase from the hyperthermophile *Thermotoga maritima* for insights into the coordination of conformational changes and an inhibitor binding. *J. Struct. Biol.* (2010) In press 査読有

Yamanaka, Y., Hashimoto, K., Ohtaki, A., Noguchi, K., Yohda, M. and Odaka, M. Roles of the serine ligand and a strictly conserved tyrosine residue in nitrile hydratase. *J. Biol. Inorg. Chem.* In press.

(2010) 査読有

Sagermann, M., Ohtaki, A., Newton, K. and Doukyu, N. Structural characterization of the organic solvent-stable cholesterol oxidase from *Chromobacterium* sp. DS-1. *J. Struct. Biol.* 170(1):32-40. (2010) 査読有

Ohtaki, A., Murata, K., Sato, Y., Noguchi, K., Miyatake, H., Dohmae, N., Yamada, K., Yohda, M. and Odaka, M. Structure and Characterization of Amidase from *Rhodococcus* sp. N-771: Insight into the Molecular Mechanism of Substrate Recognition. *Biochim Biophys Acta*, **1804**(1):184-92. (2010) 査読有

Sato, Y., Shimizu, S., Ohtaki, A., Noguchi, K., Miyatake, H., Dohmae, N., Sasaki, S., Odaka, M., and Yohda, M. Crystal structures of lumazine protein from *Photobacterium kishitanii* in complex with the authentic chromophore, 6,7-dimethyl-8-(1'-D-ribityl) lumazine and its analogues, riboflavin and FMN, at high resolutions. *J. Bacteriol.*, 192(1):127-33. (2010) 査読有

Ohtaki, A., Noguchi, K. and Yohda, M. Structure and function of archaeal prefoldin, a co-chaperone of group II chaperonin. *Frontiers in Bioscience*, **15**,708-17. (2010) 査読有

Sagermann, M., Ohtaki, A., Nikolakakis, K. Crystal structure of the EutL shell protein of the ethanalamine ammonia lyase microcompartment. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106:8883-7, (2009) 査読有

Nikolakakis, K., Ohtaki, A., Newton, K., Chworos, A. and Sagermann, M. Preliminary structural investigations of the Eut-L shell protein of the ethanalamine ammonia-lyase metabolosome of *Escherichia coli*. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.* **65**, 128-32, (2009) 査読有

[学会発表](計 7 件)

大滝証、菅野由利、佐藤孝晴、野口恵一、尾高雅文、養王田正文：超好熱性古細菌 *Thermococcus* strain KS-1 由来プレフォルデインの基質認識機構、第 82 回日本生化学会大会年会、神戸、10 月 21 日(2009)

大滝証、菅野由利、佐藤孝晴、野口恵一、尾高雅文、養王田正文：超好熱性古細菌 *Thermococcus* strain KS-1 由来 4 量体プレフォルデインの基質認識機構、生体機能関連(24 回)・バイオテクノロジー(12 回)シンポジウム、福岡、9 月 14 日(2009)

大滝証、菅野由利、佐藤孝晴、野口恵一、尾高雅文、養王田正文：超好熱性古細菌

Thermococcus strain KS-1 由来プレフォルデインの基質認識機構の検討、第 12 回マリンバイオテクノロジー学会大会、早稲田、5 月 30 日(2009)

野口恵一、大滝証、菅野由利、佐藤孝晴、尾高雅文、養王田正文：超好熱性古細菌
Thermococcus strain KS-1 由来プレフォルデインの基質認識機構の検討、第 9 回日本蛋白質科学会、熊本、5 月 21 日(2009)
米澤哲洋、花田恵、大滝証、野口恵一、養王田正文：超好熱性古細菌

Thermococcus sp. strain KS-1 由来プレフォルデインとシャペロニンの協調作用機構の解析、第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会、神戸、12 月 9 日(2008)

米澤哲洋、花田恵、大滝証、野口恵一、養王田正文：超好熱性古細菌
Thermococcus sp. strain KS-1 由来プレフォルデインとシャペロニンの協調作用機構の解析、第 9 回極限環境微生物学会、池袋、11 月 4 日(2008)

米澤哲洋、菅野由利、飯塚怜、大滝証、井出直希、吉田尊雄、藤原伸介、今中忠行、養王田正文：超好熱性古細菌
Thermococcus sp. strain KS-1 由来プレフォルデインの機能解析、第 8 回日本蛋白質科学会、船堀、6 月 11 日(2008)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

大滝 証 (OHTAKI AKASHI)

東京農工大学・大学院工学府・特任助教

研究者番号：30466924

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし