

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：34506

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06566

研究課題名（和文）任意のタンパク質やその凝集体を選択的にアンフォールドし分解するシステムの開発

研究課題名（英文）Development of a system that selectively unfolds and degrades a targeted protein or its aggregate

研究代表者

渡辺 洋平（Watanabe, Yo-hei）

甲南大学・理工学部・教授

研究者番号：40411839

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：特定のタンパク質の役割を調べる上で、任意のタンパク質を選択的に分解する技術は有用である。既存の技術として、ユビキチン・プロテアソーム系に標的タンパク質を誘導する方法があるが、その適用範囲は限られる。本研究では、標的タンパク質を結合するナノボディー、結合したタンパク質をアンフォールドするClpBシャペロン、さらにそれを分解するLonプロテアーゼを融合させ、新たな選択的タンパク質分解システムの構築を目指した。本研究により、ClpBとLonのプロテアーゼドメインを機能を持った形で融合させることができた。一方でナノボディーの融合はタンパク質を不安定化させた。標的の認識に、他の方法を検討する必要がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で作製を目指した、任意のタンパク質を選択的にアンフォールド・脱凝集・分解するT-ProUDシステムは、特定のタンパク質や、そのアミロイドの役割を調べるための強力なツールとなる。特に、単一のタンパク質で構成されている点、ユビキチン・プロテアソーム系のない原核生物や細胞外でも利用できる点、分解を伴わない凝集状態の制御を行える点は、既存の選択的タンパク質分解系にはない特徴である。本研究において、ClpBとLonのプロテアーゼドメインを機能を持った形で融合させることができたことで、T-ProUDシステムの完成に大きく近づいたと言える。

研究成果の概要（英文）：Techniques to selectively degrade any targeted protein are useful for studying the role of specific proteins. One existing technique is to target proteins to the ubiquitin-proteasome system, but its application is limited. In this study, we aimed to construct a new selective proteolytic system by integrating nanobody that bind target proteins, ClpB chaperone that unfold the bound proteins, and Lon protease that degrade them. In this study, we were able to functionally fuse the ClpB and the protease domain of Lon. On the other hand, the nanobody fusion destabilised the protein. Other methods to bind target proteins need to be explored.

研究分野：タンパク質科学

キーワード：タンパク質 選択的分解 凝集体 脱凝集 アミロイド

## 1. 研究開始当初の背景

ゲノム編集による遺伝子破壊や、RNAiによる mRNA の分解は、特定のタンパク質の発現を制御し、生体内の役割を調べる方法として一般的である。しかし、遺伝子破壊は生存に必須のタンパク質には適用できず、可逆的な制御も難しい。また mRNA の分解は、細胞内寿命の長いタンパク質の解析には適さず、使用する RNA の配列デザインが難しいなどの問題もある。こうした限界を補うため、任意のタンパク質を直接分解する技術も開発されている。その主要なものは、標的タンパク質を特定のユビキチンリガーゼまで誘導してポリユビキチン化し、プロテアソームに分解させるというものである。しかしこの方法も、プロテアソームが分解できないアミロイドや固い構造を持つタンパク質には適用できない。使用するユビキチン・プロテアソーム経路の本来の機能と競合することもある。そして、そもそもユビキチン・プロテアソーム系を持たない生物には適用できない。

また、凝集やアミロイド化したタンパク質が生体に独自の影響を与えることがある。アルツハイマー病など、特定のタンパク質のアミロイドが疾患の原因となる例がよく知られている。また近年、特定のアミロイドが、細胞内の一連の反応の反応場を作り出したり、バイオフィルムに見られるような細胞間の連携に使われたりするなど、タンパク質の凝集に依存した機能発現の例も見出されつつある。このような、凝集・アミロイドと疾患・機能発現の因果関係や、その生理的重要性は、既存のタンパク質発現制御系では検証できない。

## 2. 研究の目的

そこで本研究は、凝集体をほぐす(脱凝集)活性を持つ分子シャペロン ClpB を用い、任意のタンパク質・凝集・アミロイドを選択的にアンフォールドする、またそれをさらに分解する、Targeted Protein Unfolding and Degradation (T-ProUD) システムの構築を目指す。本来 ClpB の活性は、高度に制御されており、脱凝集には複数の補助因子の協力が必須である。しかし私たちは、活性化状態を擬態した変異 ClpB が、単独で脱凝集活性を示すことを見出した( *Sci. Rep.*, 2017)。この変異型 ClpB を用いれば、以下に挙げる利点を備えた、新たなタンパク質の発現・凝集制御系を構築できると考えた。

- 1) 標的タンパク質の認識から分解までを単一のタンパク質で完結するため、適用できる標的の種類や、使用環境の範囲(細菌や細胞外環境などを含む)が広い。
- 2) 強力なアンフォールド活性・脱凝集活性があるため、強固なタンパク質や、アミロイドなどの凝集状態にあるタンパク質も標的にできる。
- 3) 分解を伴わない脱凝集やアミロイドの解除ができるため、特定のタンパク質の凝集状態に起因する疾患や生理機能の検証が可能となる。

## 3. 研究の方法

本研究では、生命科学研究の新たな解析ツールとして、任意のタンパク質・凝集・アミロイドを選択的にアンフォールドし分解する、T-ProUD システムの構築を目指す。本システムは、「選択的結合」、「アンフォールド・脱凝集」、「分解」の3要素からなる。

## 1) 選択的結合

T-ProUD に標的タンパク質のみを誘導するため、ナノボディーを利用する。ナノボディーは、サメやラクダが持つ単鎖抗体の可変領域を含むドメインで、ポリペプチド鎖 1 本からなる小型のタンパク質でありながら、多様な分子に対し選択的な結合性を持たせることができる。T-ProUD の本体となる ClpB の N 末端には、球状の N ドメインがあり、補助因子である DnaK とともに、凝集体の認識・結合を担う。この N ドメインの代わりに、標的タンパク質、あるいはそれに導入したタグ配列を認識するナノボディーを導入する。

## 2) アンフォールド・脱凝集

タンパク質のアンフォールド・脱凝集は、変異型の ClpB が担う。ClpB はリング状の 6 量体タンパク質で、各サブユニットは、AAA+とよばれる ATP 加水分解ドメインを 2 つ持つ。ClpB は、ATP のエネルギーを利用して、タンパク質やその凝集体をリング中央の孔に引き込んで、アンフォールド・脱凝集する。ただしこの活性は、ClpB 単体では抑制状態にあり、抑制の解除には補助因子である DnaK の結合が必要である。私たちは、これまでの研究により、DnaK なしで活性化状態をとる活性型変異 ClpB を複数見出している (*Biochem. J.*, 2009; *Sci. Rep.*, 2017)。これらの活性型 ClpB を用いて、1) によって、リング中央孔の入り口に誘導された標的タンパク質 (あるいはその凝集やアミロイド) だけを、強力にアンフォールド・脱凝集する。

## 3) 分解

ClpB の C 末端に、ATP 依存プロテアーゼである Lon のプロテアーゼドメインを融合させる。Lon は、ClpB と同じ AAA+タンパク質で、AAA+ドメインとプロテアーゼドメインを持ち、これがリング状の 6 量体を形成する。AAA+部分が分解すべき基質を選別し、リング中央の孔を通してプロテアーゼドメインへと送り込み、プロテアーゼドメインは、送り込まれた基質だけをリング内側の活性部位で分解する。ClpB は、Lon の AAA+ドメインにはない、強力なアンフォールド活性・脱凝集活性を持つ。ClpB とこれらのプロテアーゼドメインを融合させることで、凝集・アミロイドを含む強固な構造を持ったタンパク質をアンフォールド・脱凝集し、分解できるようにする。

## 4. 研究成果

### 1) ナノボディーと活性型 ClpB 変異体の融合体の作製および活性測定

まず、ナノボディーと ClpB の融合タンパク質 (Targeted Protein Unfolding (T-ProU) システム) を作製した。ナノボディー部分には、10 アミノ酸からなる特定のペプチド (認識タグ) を強く結合するものを使用した。また ClpB 部分には、N 末端ドメインを欠損させ、常時活性型となる変異を導入したものを使用した。作製した T-ProU が標的タンパク質を選択的にアンフォールドできるかを確認するため、認識タグを融合させた GFP (tag-GFP) も作製した。

T-ProU システムは、ATP 存在下で tag-GFP の蛍光を減少させたが、その低下の度合いは小さかった。この結果から、T-ProU システムによる標的の結合やアンフォールドの能力が十分でない可能性が考えられた。しかし一方で、T-ProU システムはアンフォールドしたタンパク質を分解するわけではないので、アンフォールドした tag-GFP がすぐに再生してしまったと考えることもできる。そのためこの段階では、T-ProU システムが標的タンパク質を結合しアンフォールドする能力を十分持つかは判断できなかった。

## 2) ClpB と Lon のプロテアーゼドメインの融合体の作製および活性測定

次に、ClpB と Lon のプロテアーゼドメインの融合タンパク質を作製した。連結部分のデザインを検討するため、ClpB の C 末端側の AAA+ドメイン (AAA2) と Lon の AAA+ドメインの構造を比較したところ、大きな違いが 2 つあった。まず、ClpB の AAA2 の底面には Lon の AAA+にはない突起があった。また、ClpB の AAA2 の C 末端は、Lon の AAA+よりも シートの折り返しが多く、末端が逆方向を向いていた。これらの違いを考慮し、繋ぎかえの位置や間に挟むリンカー配列の長さが異なる 9 パターンの融合タンパク質をデザインし、作製した。これらの融合タンパク質について、凝集タンパク質を脱凝集、分解する活性を測定したところ、高い脱凝集活性を維持しながら、脱凝集したタンパク質をそのまま分解するものが 1 つだけ見つかった。

## 3) 3 者融合タンパク質の作製および活性測定

2) の結果により、T-ProUD システムの後半部分のデザインが確定したため、2) で得た融合タンパク質の ClpB 部分に活性化変異を導入し、N ドメインをナノボディーに置き換えた、3 者融合タンパク質の発現プラスミドを作製した。ところが、このタンパク質は発現量が少なく、安定性も非常に低いものであった。細胞内、細胞破碎液、粗精製標品で標的タンパク質のアンフォールド・分解活性の検出を試みたが、今のところ明確な活性は観察されていない。

想定していた T-ProUD システムの作製にはさらなる改良が必要である。ClpB と Lon のプロテアーゼドメインとの融合タンパク質は想定通りのものができているので、今後は、標的タンパク質の認識・結合に関して、ナノボディー以外の方法を検討する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 三木雅士、辰巳綾理、渡辺洋平
2. 発表標題 脱凝集シャペロンCipBを用いた選択的タンパク質分解システムの構築
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三木雅士、辰巳綾理、渡辺洋平
2. 発表標題 脱凝集シャペロンCipBを土台とする選択的タンパク質分解システムの構築
3. 学会等名 第23回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2023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
---------	---------