

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 31 日現在

機関番号：34506

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21770151

研究課題名（和文） 脱凝集活性を持つ分子シャペロン ClpB の構造変化と機能

研究課題名（英文） Structural change and function of ClpB chaperone disaggregase

研究代表者

渡辺 洋平（WATANABE YO-HEI）

甲南大学・理工学部・講師

研究者番号：40411839

研究成果の概要（和文）：ClpB は凝集したタンパク質を再生（脱凝集）できる。N ドメインの動きをジスルフィド結合で制限すると、ClpB の脱凝集活性が低下するが、その原因は基質を結合した後の糸通し過程にあることを明らかにした。また、ClpB 量体の隣り合うサブユニット 2 つ、あるいは 6 つ全てをジスルフィド結合でつないだ変異体をそれぞれ作成した。これらの変異体を用いた実験により、ClpB による効率的な脱凝集には、6 量体の適度な解離会合が必要であることが分かった。

研究成果の概要（英文）：ClpB can rescue the aggregated proteins (disaggregation). When the motion of N domain was restricted by the disulfide bond, the disaggregation activity of ClpB reduced. We found that the cause is in the threading-through process following the substrate-binding process. Moreover, we made two ClpB mutants in which two or six adjacent subunits of ClpB hexamer were cross-linked by the disulfide bond(s). Using these mutants, we found that the efficient disaggregation by ClpB required the moderate dissociation/association of the hexamer.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：酵素の触媒機構

1. 研究開始当初の背景

分子シャペロンはおもに、立体構造の崩れたタンパク質を認識、結合し、凝集体の形成を抑制することで、そのタンパク質の立体構造の形成を助ける。しかし、分子シャペロンの多くは一度凝集してしまったタンパク質をほぐし（脱凝集）再生することはできない。

私たちは以前、ClpBが別の分子シャペロンであるDnaKとその補因子と協力し、熱などのストレスにより変性、凝集したタンパク質を再生できる特異な分子シャペロンであることを見出した。

また私たちは、アメリカの研究グループと共同で、ClpBの立体構造を原子レベルで決定

し、ClpBのサブユニットが、Nドメイン、AAA1モジュール、ミドルドメイン、AAA2モジュールからなり(図1)、それがリング状の6量体を形成していることを明らかにした。AAA1、AAA2の両モジュールは、AAA+タンパク質ファミリーに共通してみられる構造で、ClpBはここでATPを結合・加水分解し、そのエネルギーを利用して働く。

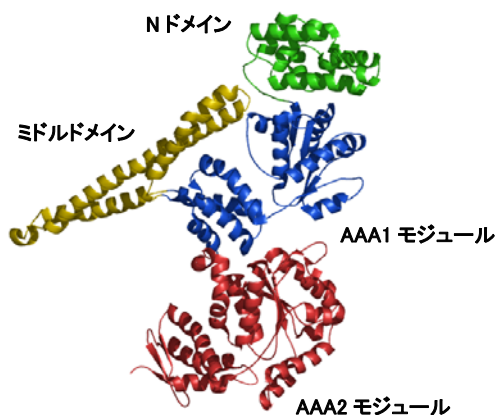


図1) ClpB 単量体の立体構造 (PDB accession: 1QVR)

さらに私たちは、ミドルドメインとAAA1モジュールの近接する部分にそれぞれシステイン残基を導入した変異体を作成した。この変異体を用いた実験で、ミドルドメインがClpBのATP加水分解サイクルに応じて、大きく構造変化すること、この構造変化がClpBの脱凝集活性に必須であることなどを明らかにした。

一方、ドイツのBukaらのグループは、大腸菌のClpBに変異を導入して、ClpPというプロテアーゼを結合できるようにした。ClpP存在下では、この変異ClpB (BAP) の6量体リングの孔を通り抜けたタンパク質はClpPによって分解される。Bukaらはこの変異体を用いて、ClpBが脱凝集する際、凝集タンパク質を6量体リングの孔に通す(糸通し)ことを示した。さらに、凝集した基質がうまく通らないときは、6量体を一度解離させ、再集合させることで目詰まりを解消するというモデルを提唱した。

私たちは、本研究で用いる好熱菌のClpBについても糸通し活性の検出を行えるよう、好熱菌型のBAP (TBAP) を作成した。

2. 研究の目的

ClpBは、2つのAAAモジュールでのATP加水分解サイクルに共役した構造変化によって、脱凝集反応を直接的に進めると考えられる。本研究では、こうした構造変化の過程で

現れる様々な反応中間体が、それぞれどのような性質を持つのかを調べ、脱凝集反応の分子機構の全容を明らかにする。

3. 研究の方法

具体的には、ClpBの結晶構造情報をもとにシステイン残基を変異導入し、ジスルフィド結合により反応中間体と考えられる構造を固定する。得られた反応中間体候補について生化学的解析を行い、それが真の反応中間体か、反応中のどのタイミングで現れるかなどを評価する。多数の中間体候補について評価を行い、ClpBの反応シーケンスモデルを構築する。

4. 研究成果

結晶構造解析や電子顕微鏡像の単粒子解析の結果から、ClpBのNドメインは非常に可動性が高いと考えられている。私たちはこれまでに、Nドメインを、ジスルフィド結合によりAAA1モジュールに固定することで、その動きを制限すると、基質との親和性はそのまま、脱凝集活性が低下することを示している。今回、このNドメイン固定変異とTBAP変異を組み合わせ、Nドメインの動きと糸通し活性の関係を調べた。その結果、Nドメインの動きを制限することにより、糸通し活性が大きく低下することが分かった(図2)。この結果は、これまで見られていた脱凝集活性の低下の原因のひとつが、糸通し活性の低下によるものであることを示している。

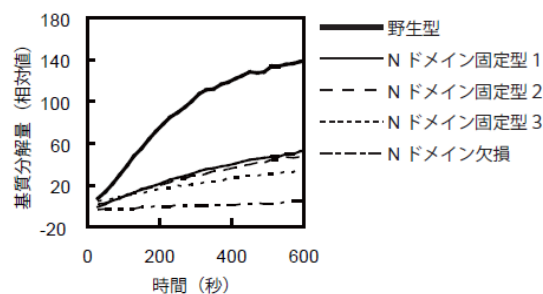


図2) Nドメイン固定変異体の糸通し活性

ClpBの6量体リングは不安定で、タンパク質濃度、塩濃度、温度、ヌクレオチドの結合状態に応じて、解離会合を繰り返している。この不安定さは、ClpBが効率的に脱凝集を行うために必要といわれているが、一方で、ClpBの機能解析を非常に複雑で困難にする。そこで今回、ClpB6量体中の隣り合うサブユニットをジスルフィド結合で固定することにより、サブユニット2つをつなげた固定化2量体ClpB、サブユニット6つ全てをつなげた固定化6量体ClpBを作成した。

まずはこれらを用いて、脱凝集反応におけるClpBサブユニットの解離会合の重要性を検証した。ゲルろ過HPLCによる分析から、固定化2量体ClpBは野生型に比べ6量体構造を安定に維持できることが分かった。生理的な条件において、固定化2量体の脱凝集活性は野生型よりも低かったが、6量体構造がより不安定になる高塩濃度条件下では、野生型よりも高くなった。一方、固定化6量体では、いずれの条件においても脱凝集活性は著しく低下していた。以上の結果より、効率的な脱凝集反応にはClpB6量体の適度な解離会合が重要であることが示唆された。

固定化6量体で脱凝集活性が著しく低下していることから、この変異体を用いての反応中間体の解析は難しいことが分かった。一方で、固定化2量体は有意な脱凝集活性を持つ。この固定化法を応用することで、ClpB6量体中で、異なる変異を持ったサブユニットを隣合わせて並べることができる。今後、様々な反応中間体を特定の組み合わせで隣合わせることで、各中間体がとなりのサブユニットに及ぼす効果を検証できると期待される。

様々な反応中間体をATP加水分解サイクルと対応させて理解する上で、AAA1、AAA2それぞれのATP加水分解サイクルを制御する変異も重要である。これまで、WalkerA、WalkerBと呼ばれる保存配列に変異を導入することで、各AAAモジュールのATP結合を阻害する変異体、加水分解のみを阻害する変異体を得ている。ところでClpBは、WalkerA、WalkerB保存配列の他に、各AAAモジュールにアルギニンフィンガーと呼ばれる高度に保存されたアルギニン残基を持つ。アルギニンフィンガーは、隣接するサブユニットに結合したATPのγリン酸の近くに位置しており、ここに変異を導入することで、新たな性質を持った、ATP加水分解サイクル制御変異体が得られると期待される。これらの保存アルギニンをアラニンに置換した変異体を作成したところ、ATPの結合には影響せず、隣のサブユニットでのATPの加水分解を阻害することが分かった。さらに、AAA1のアルギニンフィンガーは、AAA1へのATPの結合に依存したClpBの6量体構造の安定化に重要であることも明らかになった。

今回作成したアルギニンフィンガー変異体は、今後、様々な反応中間体とATP加水分解サイクルとの関係を明らかにする上で、有効なツールになると期待される。

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4件)

- ① Sayaka Mizuno, Yosuke Nakazaki, Masasuke Yoshida, Yo-hei Watanabe, Orientation of the amino-terminal domain of ClpB affects the disaggregation of the protein, FEBS J. 査読有、279, 2012, pp.1474-1484, DOI:10.1111/j.1742-4658.2012.08540.x
- ② Takashi Yamasaki, Yosuke Nakazaki, Masasuke Yoshida, Yo-hei Watanabe, Roles of conserved arginines in ATP-binding domains of AAA+ chaperone ClpB from *Thermus thermophilus*, FEBS J. 査読有、278, 2011, pp.2395-2403, DOI:10.1111/j.1742-4658.2011.08167.x
- ③ Tadashi Mizutani, Shohei Nemoto, Masasuke Yoshida, Yo-hei Watanabe, Temperature-dependent regulation of *Thermus thermophilus* DnaK/DnaJ chaperone by DafA protein, Genes to Cells, 査読有、14, 2009, pp.1405-1413, DOI:10.1111/j.1365-2443.2009.01357.x
- ④ Yo-hei Watanabe, Yosuke Nakazaki, Ryoji Suno, Masasuke Yoshida, Stability of the two wings of the coiled-coil domain of ClpB chaperone is Critical for its disaggregation activity, Biochem. J. 査読有、421, 2009, pp.71-77, DOI:10.1042/BJ20082238

[学会発表] (計10件)

- ① 山崎孝史、中村俊樹、吉田賢右、渡辺洋平、分子シャペロンClpBのサブユニット間の協同性、第84回日本生化学会大会、2011年9月23日、京都
- ② 中村俊樹、山崎孝史、本多大輔、吉田賢右、渡辺洋平、分子シャペロンClpBの6量体構造の安定性とシャペロン活性との関係、第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会、2010年12月10日、神戸
- ③ 中崎洋介、水野さやか、吉田賢右、渡辺洋平、分子シャペロンClpB変異体の基質糸通し速度の測定、第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会、2010年12月9日、神戸
- ④ 山崎孝史、中村俊樹、吉田賢右、渡辺洋平、分子シャペロンClpBのアルギニンフィンガーの役割、第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会、2010年12月9日、神戸

- ⑤ Yosuke Nakazaki, Sayaka Mizuno, Masasuke Yoshida, Yo-hei Watanabe, Roles of the motion of the N-terminal domain of ClpB chaperone, The 3rd International Symposium on Protein Community, 2010年9月14日、奈良
- ⑥ 渡邊久美子、中村俊樹、中崎洋介、水野さやか、吉田賢右、渡辺洋平、分子シャペロンClpBにおけるミドルドメインWing-2の保存荷電残基の重要性、第82回日本生化学会大会、2009年10月22日、神戸
- ⑦ 中崎洋介、水野さやか、渡邊久美子、中村俊樹、吉田賢右、渡辺洋平、ClpB変異体の基質糸通し活性の解析、第82回日本生化学会大会、2009年10月22日、神戸
- ⑧ 中村俊樹、中崎洋介、渡辺洋平、サブユニット間ジスルフィド結合による分子シャペロンClpBの6量体構造の固定化、第82回日本生化学会大会、2009年10月22日、神戸

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡辺 洋平 (WATANABE YO-HEI)

甲南大学・理工学部・講師

研究者番号：40411839

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし