

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月28日現在

機関番号：14301
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2012～2012
 課題番号：24656501
 研究課題名（和文） 分子内シャペロン改変によるタンパク質のフォールディングメモリーの解明とその応用
 研究課題名（英文） Analysis of protein folding memory with modification of intramolecular chaperons and its application
 研究代表者
 植田 充美 (UEDA MITSUYOSHI)
 京都大学・大学院農学研究科・教授
 研究者番号：90183201

研究成果の概要（和文）：プロペプチド変異体CPY(カルボキシペプチダーゼY)を酵母分子ディスプレイ法を用いて調製し、活性を測定したところ、成熟体のアミノ酸配列は同一であるが活性が変化しているCPY成熟体が得られた。精製したこれらのCPYを速度論的解析により比較したところ、触媒効率の上昇が認められた。活性化エネルギーにも変化が認められることから、プロペプチドへの変異導入が成熟酵素の機能や構造の改変を誘導した可能性が示唆された。これらの結果は、「プロテインフォールディングメモリー」として、分子内シャペロンが関わるタンパク質構造形成について新たな知見となった。

研究成果の概要（英文）：CPYs (carboxypeptidase Y) with mutated propeptides were successfully displayed on yeast cell surface, and the mature enzymes were purified by the selective cleavage of mutated propeptides. Measurement of the activity and kinetics of the displayed CPYs indicated that the propeptide mutation altered the catalytic efficiency of mCPY. Although the mature region of the wild-type and mutant CPYs had identical amino acid sequences, the mCPYs from the mutant proCPYs had higher catalytic efficiency than the wild-type. These results indicate that proteins with identical amino acid sequence can fold into isomeric proteins with micro-conformational changes through mutated intramolecular chaperones.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・生物機能・バイオプロセス

キーワード：プロテインフォールディングメモリー、プロペプチド、分子内シャペロン、カルボキシペプチダーゼ Y、分子ディスプレイ、活性化エネルギー、アンフィンセン理論、触媒効率

1. 研究開始当初の背景

タンパク質の構造は、アンフィンセンに

より、RNaseA を用いて、その一次構造により一義的に決定され、エネルギーの最低安定状態に収束定着するという「アンフィンセン理論」が形成されている。この理論は、ノーベル賞受賞でもわかるように、一つのタンパク質の構造と機能を研究するのに、「足かせ」のようになっている。この発見と提唱は、まだ、ゲノム解析の行われる前の、遺伝子組み換えなどの自由でなかった時代のものである。今回の挑戦的萌芽研究では、この理論に挑戦できる新しい研究手法の適用とその展開を試みる。

2. 研究の目的

タンパク質の構造形成と機能創出への全く新しい視点である「タンパク質のフォールディングメモリー」という概念を提唱する。タンパク質の基本的な要素であるフォールディングにおいて、特に、「分子内シャペロン」には、タンパク質の前駆体としてN末端にプロペプチドとして機能しているものが多い。この分子内シャペロンプロペプチドは、本体のタンパク質の成熟化をサポートし、その構造形成に、いわゆる機能をもつ構造をインプリンティングする役割をもつものが存在する。したがって、この分子内シャペロンへの変異導入により、酵素本体に「構造異性」ともいふべき新たな機能をもつ生体触媒を形成させることができることを見出した。この手法により、酵素本体に変異を入れることなく、酵素に新たなエネルギー状態にある「構造変異」の機能が創出可能であることがわかった。この手法により、いわゆる「フォールディング原理（メモリー）」の解明への挑戦とその応用による新しい生体触媒の創製に挑む。

3. 研究の方法

CPY のプロペプチドは成熟体を不活性化前駆体として維持することから阻害剤としても機能するが、CPY には別に CPY 特異的阻害タンパク質 I^c が存在する。プロペプチドと I^c の相同性検索により、両者の配列には相同性が認められた。更に、相同性のある I^c の配列は CPY と相互作用するのに必須な部分であることが CPY-I^c 結晶構造より明らかとなり、プロペプチドの成熟体への結合様式が推察された。これらの情報を基に作製したプロペプチド変異体 CPY を酵母分子ディスプレイ法を用いて調製し、活性を測定することにより、成熟体のアミノ酸配列は同一であるが活性が変化している CPY 成熟体を得る。更に、精製しこれらの CPY を速度論的解析により比較することにより、触媒効率の変化を活性化エネルギーのレベルの観点から、構造異性の本質を追究し、応用展開を企む。

1. 分子内シャペロン機能を持つ CPY のプロペプチドへの変異導入体の調製
プロペプチドと CPY 特異的阻害タンパク質 I^c の相同性が認められたので、その相同性に基づいた変異を加えたプロペプチド配列を導入した CPY 前駆体を酵母分子ディスプレイ法を用いて各種調製する。その後、プロペプチド配列取り外した成熟体 CPY に変換する。
2. 配列が全く同一であるが、変異プロペプチドを介して作製した構造異性各種 CPY の速度論的解析
構造異性があると予想される精製 CPY の活性や活性化エネルギーを測定し、野生由来の CPY (WT) との速度論的比較を行う。
3. 構造異性 CPY の物性比較
コンフォメーションの違いを明らかにするため、CD スペクトル解析などを行い、構造変異の本質を追究するとともに、

フォールディング原理（メモリー）を推察・検討する。

4. 応用への展開

4-1. こういう構造異性をもつ酵素の存在を実際の細胞内の各種酵素から探索し、このメモリーの一般性を検証する。

4-2. 分子内シャペロン（プロペプチド）と成熟タンパク質の組み合わせを各種酵素に適用し、新しい機能を持った酵素の創製にチャレンジする。

5. 研究成果

CPY のプロペプチドは、配列の欠損や置換による CPY 活性への影響を解析する実験は行われているが、CPY とプロペプチド間の詳細な分子間相互作用に関しては未解明のままである。CPY とプロペプチドの相互作用における新たな知見を得るために、CPY との相互作用が明らかな I^c の情報を利用した。I^c はプロペプチドと同様に、CPY に結合し、その活性を阻害する。すなわち、I^c とプロペプチドは CPY の阻害機構に共通性があるのではないかと考えた。そこで、CPY に結合する I^c と CPY のアミノ酸を比較したところ、プロペプチドの C 末端とそれに続く成熟領域に I^c の N 末端と相同性が高い配列を見つけた。特に阻害に必要とされる N 末端配列と良く似たものがプロペプチドの C 末端側に存在した。つまり、この部位が前駆体において阻害配列となっており、CPY の成熟領域に結合しているのではないかと考えた。そこでこれらの配列のペプチドを合成し、mCPY の阻害実験を行った。その結果、I^c の N 末端配列ペプチド ICN 及び ICN と相同性のあるプロペプチド内配列ペプチド CPICN は CPY の活性を阻害した。この結果、I^c の N 末端と相同性のあるプロペプチド配列が阻害部位として CPY の基質認識部位に結合している可能性が示唆された。

また、上記の相同性と阻害実験の結果から、前駆体から成熟体へと変換する過程において、プロペプチドは I^c 様の結合様式で CPY に結合する、特にプロペプチドの CPY 阻害部位が CPY 成熟体の基質認識部位に結合し、かつその部位を形成しているという分子モデルを予測した。

CPY の詳細な成熟化機構を解析するために、プロペプチドの I^c と相同性のある部位を順次 I^c の相同性配列へと置換し、その変異の影響を酵母分子ディスプレイ法を用いて検証した。上記のモデルによると、プロペプチド変異体から形成される成熟体 CPY の活性は野生型と同じ活性を示すと考えられる。分子ディスプレイ法を用いることで、2 種類のプロペプチド変異体により形成された成熟体 CPY (mCPY^{ICN5}, mCPY^{ICN8}) を作ることに成功した。この酵母を用い、蛍光基質に対する分解活性を行った。予想に反して、提示した mCPY^{ICN5}, mCPY^{ICN8} の活性は、野生型よりも活性が高い結果となった。プロペプチドの変異箇所を各々アラニン置換した CPY は活性が野生型よりも減少したことからも、この部位はフォールディングに重要な部位だということも示唆された。さらに、成熟体酵素 (mCPY, mCPY^{ICN5}, mCPY^{ICN8}) を精製し、速度論的解析を行った結果、mCPY^{ICN5}, mCPY^{ICN8} は mCPY よりも活性効率が上昇することが認められた。つまり、プロペプチドに変異を導入することで、成熟体 CPY のアミノ酸配列は同一にも関わらず異なる活性を持つ mCPY を創出することができた。プロペプチドに変異が入った結果、成熟体のフォールディング経路が変化して異なる構造を持つ状態へとフォールドされたと考えている。すなわち、分子内シャペロンに成熟体の構造を決定するフォールディング経路の情報が入っており、その構造情報を成熟体へとインプリンティングして残すことから

この現象を‘プロテインフォールディングメモリー’と命名した。非常に興味深いことに、CD スペクトル解析により 2 次構造を比較したところ、mCPY、mCPY^{ICN5}、mCPY^{ICN8} 間で大きな差は見られなかった。今回、変異を導入した部位は、基質認識部位へと結合するので、全体の構造が変化するというよりも基質認識部位周辺の構造が微細に変化したものと予測している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 2 件)

1. M. Nagayama, K. Kuroda, M. Ueda, Identification of interaction site of propeptide toward mature carboxypeptidase Y (mCPY) based on similarity between propeptide and CPY inhibitor (I^c), *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 査読有, 76, 153-156 (2012) DOI: 10.1271/bbb.110668
2. M. Nagayama, H. Maeda, K. Kuroda, M. Ueda, Mutated intramolecular chaperones generate high-activity isomers of mature enzymes, 査読有, *Biochemistry*, 51, 3547-3553 (2012) DOI: 10.1021/bi3001159

〔学会発表〕 (計 1 件)

1. 里村淳ら, タンパク質フォールディングメモリーによる酵素の改変, 日本生物工学会, 2012.10.24, 神戸
- 2.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www/tenko.kais.kyoto-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

植田 充美 (UEDA MITSUYOSHI)

京都大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号 : 90183201