

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：12608

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25840045

研究課題名(和文) 真核生物タンパク質の凝集性の網羅的解析

研究課題名(英文) Global aggregation analysis of eukaryotic proteins.

研究代表者

丹羽 達也 (Niwa, Tatsuya)

東京工業大学・生命理工学研究科・助教

研究者番号：50588530

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)：過去に私達が行った原核生物由来のタンパク質の凝集性の網羅的解析に対して、その普遍性を調べるために真核生物由来のタンパク質を用いて同様の解析を行うことで、生物界を超えた「タンパク質凝集・フォールディングに対する一般即」を明らかにすることを目指した。約500種類の真核生物由来のタンパク質について凝集性を調べた結果、物理的な性質という観点からは原核生物由来のタンパク質と同様の性質を示したものの、真核生物由来のタンパク質では真核生物のみに多くみられる「天然変性領域」とよばれる領域が凝集性に関与していた。この結果は原核生物と真核生物の進化の仕方の違いの一端を理解するのに繋がる結果である。

研究成果の概要(英文)：To investigate the generality of the results of the comprehensive analysis of protein aggregation in prokaryotic proteins conducted by our groups, we conducted the comprehensive aggregation analysis in eukaryotic proteins in the same way and aimed to uncover the universal nature of the protein aggregation and folding across biological kingdoms. We investigated the aggregation propensity for ~500 kinds of eukaryotic proteins and analyzed these data, resulting that from the point of view of physicochemical properties, eukaryotic proteins shared the similar tendencies in prokaryotic proteins. However, the specific regions called “intrinsically disordered region”, which are found in almost only eukaryotic proteins, showed the significant relationship with the aggregation propensity of proteins. This result may connect to the understanding of one end of the differences between prokaryotes and eukaryotes from the evolutionary point of view.

研究分野：生化学

キーワード：フォールディング タンパク質凝集 分子シャペロン 無細胞タンパク質合成系

1. 研究開始当初の背景

タンパク質はあらゆる生命の活動を担う生体分子であり、20種類のアミノ酸が様々な並び方で繋がった「ひも」状の物質です。この「ひも」がそれぞれの種類に固有な「かたち(立体構造)」を形成することによって、機能を発揮します。しかし、多くのタンパク質は自発的に固有の立体構造を取ることができず、分子シャペロンと呼ばれるものの助けがなければ凝集体とよばれる機能を持たない状態へと変化してしまいます。

私達は、過去の研究において、原核生物である大腸菌が持つ約 3000 種類のタンパク質に対して、分子シャペロンの助けがない状態でのタンパク質の凝集性を網羅的に調べました。その結果、様々な性質がタンパク質の凝集性と関係するということが明らかとなりました。

2. 研究の目的

本研究では、過去に行われた原核生物由来のタンパク質における凝集性の網羅解析に対し、真核生物由来のタンパク質で同様の解析を行うことで、原核生物由来のタンパク質の研究で得られた結果が真核生物由来のタンパク質に対しても普遍性を持つかどうかを明らかにし、原核生物・真核生物という生物の界を超えて、タンパク質凝集を理解することを目的としています。さらに高い凝集性を示したタンパク質に対しては、既知の分子シャペロンを加えることで凝集性が解消されるかについても同時に調べ、分子シャペロンの効果が生物種の違いによって異なるかどうかについても調べることを目的としています。

3. 研究の方法

実験の手法については過去の原核生物由来のタンパク質の凝集性の網羅解析と同様、分子シャペロンをいっさい含まない無細胞タンパク質合成系である PURE system を利用しました。タンパク質を作るための遺伝子として、市販されている出芽酵母の遺伝子ライブラリーを利用し、PCR 法によって遺伝子を増幅・調製しました。これらを用いて、約 500 種類のタンパク質を個別に作らせ、遠心分離法および電気泳動法を用いてタンパク質の凝集の程度を調べました。また高い凝集性を示したタンパク質に対する分子シャペロンの効果をみるために、原核生物由来のシャペロン 2 種類と、真核生物由来のシャペロン 1 種類を、大腸菌を利用した発現系を用いて準備しました。

4. 研究成果

約 500 種類の真核生物由来のタンパク質の凝集性を数値化し、その結果を原核生物由来のタンパク質における結果と比較したところ、分子量、等電点、アミノ酸組成などの物理科学的な性質においては、原核生物と真核生物の間で共通していることが明らかとなりました。さらに、原核生物由来のタンパク質では立体構造の種類 (SCOP データベースと呼ばれる立体構造分類データベースを利用) がタンパク質の凝集性と関係しているという知見が過去の結果より得られていますが、真核生物由来のタンパク質で同様の比較を行ったところ、立体構造の種類と凝集性との関係は原核生物由来のタンパク質と比べて弱いという結果が得られました。

真核生物由来タンパク質の凝集性が何によって決められているかを調べていくうちに、「天然変性領域」と呼ばれる、特定の立体構造を持たない特殊な領域が凝集性と関係しているということを見出しました。天然変性領域は原核生物由来のタンパク質にはほとんどみられず、真核生物由来のタンパク質にのみ特徴的にみられるものです。真核生物由来のタンパク質では、この領域が長いほど凝集しやすいという性質を持つということが今回の解析で明らかとなりました。さらに詳細な解析を行った結果、天然変性領域を持たないような、原核生物由来のタンパク質と似ているものは凝集しにくい性質を持ち、真核生物にのみ存在するようなタンパク質は凝集しやすい性質を持つという傾向があることも明らかとなりました。天然変性領域はタンパク質の機能の多様性に関係していると言われており、原核生物と真核生物において、このようなタンパク質の性質の違いが両者の進化の仕方が異なった理由の 1 つであると考えられます。

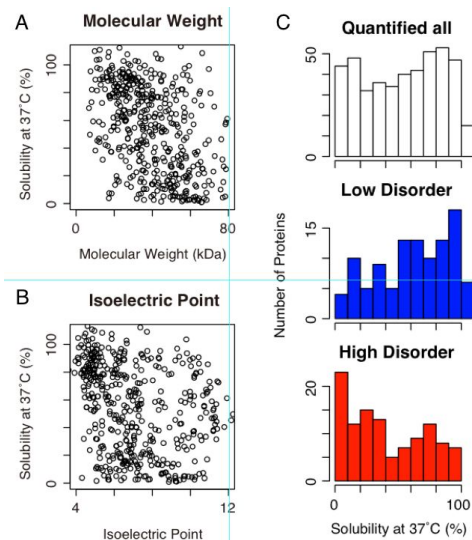


図1 様々な性質と凝集性との関係 (A) 分子量との関係 (B) 等電点との関係 (C) 天然変性領域との関係

さらに、高い凝集性を示した約 100 種の真核生物由来タンパク質に対し、2 種の原核生物由来分子シャペロンおよび 1 種の真核生物由来分子シャペロンを作用させ、凝集が抑制されるかを調べたところ、いずれのシャペロンについても強い凝集抑制効果が確認されました。この結果から、異なる生物種由来の分子シャペロンであっても、凝集を防ぐという効果は発揮されるということが明らかとなりました。しかし原核生物由来のシャペロンのうち、真核生物由来のシャペロンとより似ているもののほうが効果がより強かったことから、シャペロンの「好み」は生物種によって異なる傾向にあること、そして、この「好み」の違いが、先ほど述べた天然変性領域の長さに関係していることが確認されました。より詳細に言うと、原核生物にしかないシャペロンは天然変性領域を好まない傾向にありました。

このような原核生物と真核生物における「分子シャペロンの種類の違い」、「天然変性領域の有無」とタンパク質の凝集性との関係性を調べることによって、原核生物と真核生物の進化の仕方を想像することに繋がります。原核生物は原核生物に特有の分子シャペロンを持ち、天然変性領域を持たないタンパク質と共に進化してきたのに対し、真核生物では天然変性領域と相性のよい分子シャペロンが発達し、それに伴って天然変性領域を持つタンパク質が発展し、より多様な機能を獲得した、と考えることができます。本研究の結果は、このような原核生物と真核生物の発展の仕方の違いの一端を説明する知見を与えたという意味において大変意義深いものであると言えます。

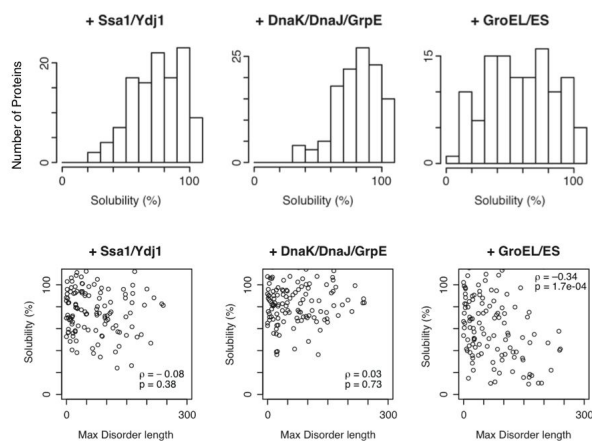


図2 分子シャペロンによる凝集抑制効果
上：分子シャペロンによる可溶化効果
下：分子シャペロンによる可溶化効果と天然変性領域との関係

注：Ssa1/Ydj1 が真核生物由来、残りの 2 つが原核生物由来のシャペロン。Ssa1/Ydj1 と DnaK/DnaJ/GrpE は非常によく似ている。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

第 9 回無細胞生命科学研究会

2014 年 10 月 8 日～9 日

大阪大学医学部 銀杏会館(大阪府)

発表者：丹羽達也

発表演題：再構築型無細胞タンパク質合成系を用いた出芽酵母タンパク質の凝集性の解析

第 14 回日本蛋白質科学会年会

2014 年 6 月 25 日～27 日

ワークピア横浜(神奈川県)

発表者：上村英里、丹羽達也、上田卓也、田口英樹

発表演題：出芽酵母タンパク質に対するシャペロンの可溶化効果

Molecular Chaperones & Stress Responses at Cold Spring Harbor Laboratory (United States of America)

2014 年 4 月 29 日～5 月 3 日

発表者：Tatsuya Niwa, Eri Uemura, Takuya Ueda, and Hideki Taguchi

発表演題：LARGE-SCALE ANALYSES OF PROTEIN AGGREGATION AND CHAPERONE ACTION FOR PROKARYOTIC AND EUKARYOTIC PROTEINS

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

丹羽 達也 (NIWA TATSUYA)
東京工業大学・大学院生命理工学研究科・
助教
研究者番号：50588530

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

田口 英樹 (TAGUCHI HIDEKI)
東京工業大学・大学院生命理工学研究科・
教授
研究者番号：40272710