

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：24506

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26830141

研究課題名(和文) 新生タンパク質とシャペロン関連因子との機能的ネットワーク

研究課題名(英文) Functional network of nascent protein and molecular chaperones

研究代表者

町田 幸大 (Machida, Kodai)

兵庫県立大学・工学研究科・助教

研究者番号：20553093

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：精製したヒトの翻訳関連因子群を試験管内で混合することで「ヒト因子由来の再構成型タンパク質合成システム」を構築した。このシステムに精製したヒトの主要シャペロン群を添加することで、ヒトの新生タンパク質の立体構造形成に必須となるシャペロン因子を特定するための試験管内解析システムを樹立することに成功した。このシステムは神経変性疾患などタンパク質の立体構造異常に起因する疾患の分子機構の解析のための技術基盤となる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we established an in vitro protein synthesis/folding coupled system reconstituted with purified human translational factors and molecular chaperones. Using this system, we successfully identify the molecular chaperones that are essential for co- or post-translational folding of human nascent proteins. Thus, our in vitro approach can be a useful tool to analyze the molecular mechanisms of protein conformational disorders such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease and Huntington's disease.

研究分野：タンパク質工学

キーワード：合成生物学

1. 研究開始当初の背景

タンパク質のフォールディングは新生鎖がリボソームから出た瞬間からペプチド鎖の伸長に伴ってシャペロン群と相互作用しながら起こる。Niwaらはバクテリア由来の再構成型タンパク質合成システム(PUREシステム)を駆逐することにより、原核細胞における新生ポリペプチド鎖とシャペロン群との機能的相互作用を *in vitro* で網羅的に解析することに成功している(引用文献)。一方、真核細胞においては、リボソームなどの翻訳関連因子の構造や大きさ、シャペロン因子の種類が原核細胞のそれらと大きく異なり精製が困難であるため、PUREシステムの様な再構成型の *in vitro* タンパク質合成システムが開発されていない。従って、真核細胞においては原核細胞と同様の *in vitro* 網羅的解析が実行されていないが、細胞や細胞抽出液を利用した実験系で必須シャペロンである CCT に対するインタラクトームが同定されている。Dekker と Yamらはそれぞれ酵母細胞とウサギ網状赤血球由来セルフリータンパク質合成システムを駆使して、酵母の CCT とウサギの CCT に対するインタラクトームを同定しており、どちらも細胞内タンパク質の約 10%が CCT のインタラクトームであることを明らかにしている(引用文献)。これらの解析は細胞内環境そのもの、あるいは細胞内環境に近い状態で解析を行っているので、同定された基質は真に CCT の基質であると言える。しかしながら、どちらの解析も CCT と結合している基質を検出するので、ベータシート構造をある程度含み、疎水性が強く、フォールディング速度が遅いタンパク質、すなわち CCT と長く強く結合するタンパク質が優先的に選択されている。もちろん、その様なタンパク質が CCT の優良な基質であることは間違いないが、それ以外の性質を持ち CCT の基質と成り得るタンパク質は見逃されている。また Yamらは、CCT インタラクトームのフォールディング解析を行い、CCT がフォールディングさせやすい物とさせ難い物を構造と物理的特徴に基づいて詳細に分類しているが、これも細胞抽出液中でブラックボックス的に行われたフォールディング反応の結果を解析しているため、個々の基質のフォールディングが CCT だけの介助によって達成されたものなのかどうか明らかではない。なぜなら、細胞抽出液中には CCT 以外のシャペロン群も存在し、お互いに連携したネットワークの中で様々なタンパク質のフォールディングを介助しているからである。

2. 研究の目的

上に掲げた問題点を克服し、Niwaらがバクテリアに対して行った網羅的解析を真核生物に対して展開するには「シャペロンを含まない真核細胞由来の再構成型タンパク質合成システムの構築」と「精製した真核細胞由来のシャペロン因子」が必要となる。

そこで申請者は、ヒト因子由来再構成型タンパク質合成システムを樹立した。これは、精製したヒトの翻訳伸長因子複合体(eEFs)、翻訳終結因子複合体(eRFs)、40S・60S リボソーム、tRNAs、20種類のアミノアシル tRNA 合成酵素(ARSS)、アミノ酸、ATPなどのエネルギー源から構成されている。特徴として、HeLa細胞抽出液由来試験管内タンパク質合成システム(引用文献)で採用したC型肝炎ウイルスのIRES依存性発現ベクターを用いることにより、翻訳開始因子群の非存在下で翻訳が進行するように工夫されていることが挙げられる。このタンパク質合成システムは非常にシンプルな *in vitro* タンパク質合成システムであり、20kDa-100kDaのモデルタンパク質を合成することができる。さらに申請者は、以前から大腸菌由来の必須シャペロンである GroELの研究(引用文献)に取り組んできたが、最近では、これを発展させ、ヒトの必須シャペロンである CCT をリコンビナント体として発現・精製するシステムの構築に成功しており(引用文献)、その他のシャペロン(NAC、PFDN、HSP110、HSC70、HSP40)についても同じ手法で発現と精製が可能である。上記2つを組み合わせたシステムを利用すれば、未だ明らかにされていない真核細胞、特にヒトの新生鎖のフォールディングにおけるシャペロン群の機能的相互作用を網羅的に解析することが可能であり、将来的には「ヒトのシャペロンネットワークの全体像」を描くことを目的として本研究を提案した。

3. 研究の方法

(1)ヒト因子由来再構成型タンパク質合成システムの維持(構成因子の精製):再構成型タンパク質合成システムの構成因子は HeLaS3 細胞からネイティブの因子(40S リボソーム、60S リボソーム、eEF2、tRNAs)及びシャペロン群と同じ手法を利用してリコンビナントの因子(eEFs、eRFs、T7RNAPolymerase、ARSS)を精製した。最終的に系に投入する因子の数が数十種類になるため、いかに各因子をできる限り濃縮し高濃度の精製産物を得た。また、翻訳関連因子群には精製の際に、細胞由来のシャペロン群が混入していないことが前提となるため、精製の度に個々のシャペロンに対する抗体を用いたウエスタンブロット法でシャペロン混入が無いことを確認した。

(2)ヒトのリコンビナントシャペロン群の発現・精製:シャペロン群に関しては申請時に予定していた NAC、PFDN、CCT、HSP110、HSC70、HSP40 の 6 種類に加え、HSP90、P23 について、動物細胞、昆虫細胞、大腸菌発現系を駆使して発現系の構築および精製方法の確立を行った。

(3)ヒト因子由来再構成型タンパク質合成システムとリコンビナントシャペロン群を組み合わせた翻訳系を利用したシャペロンネ

ネットワークの解析：ヒトのベータアクチン、ダイニンインターメディアイトチェーン 2、を合成し、これらのフォールディング状態の解析をネイティブページのゲルシフトアッセイで行った。また、グルタミン長の異なるヒトのハンチンチンを合成し、フィルタートラップアッセイに供することで合成されたハンチンチンの凝集を抑えるシャペロン群の特定を行った。

4. 研究成果

研究課題である「新生タンパク質とシャペロン関連因子との機能的ネットワーク」を解析・達成するために、まず、反応系として利用するヒト因子由来再構成型タンパク質合成システムを安定に供給するための手法確立を行った。具体的には、構成因子群の精製法を見直し、シャペロンフリーのシステム構築に成功した。一方、シャペロン関連因子に関しては、ヒトの主要シャペロンである NAC (NAC alpha, NAC beta)、RAC (Hsp70L1、Hsp70A1A、MPP11)、Hsp40、Hsc70、Hsp110、Hsp90、p23、PFD (PFD1、PFD2、PFD3、PFD4、PFD5、PFD6)、CCT (CCT1、CCT2、CCT3、CCT4、CCT5、CCT6A、CCT7、CCT8) に着目し、これら全ての遺伝子をクローニングし、大腸菌発現系、昆虫細胞発現系、真核細胞発現系などを駆使し、リコンビナント体の発現・精製方法を確立した。ヒト因子由来再構成型タンパク質合成システムで、ヒトのベータアクチンやダイニンインターメディアイトチェーン 2 (IC2) を合成する際に、シャペロン群を様々な組み合わせで添加することで、シャペロン因子の機能的ネットワークが新生鎖のフォールディングに与える影響を解析した。その結果、ベータアクチンに関しては、PFD と CCT のみの協奏的ネットワークが必須であり、その他のシャペロンの介助はほとんど受けていないことが証明できた。このとき PFD は新生アクチンにコトランスレーショナルに結合し、アクチンのフォールディング中間体を安定化させ、これを CCT へと受け渡すことでアクチンのフォールディングが達成されることを明らかにした。また IC2 に関しては、リボソームからリリースされた新生 IC2 に CCT のみが結合し、その安定性を向上させていることを新規に発見した。さらに、精製したシャペロン群を様々な組み合わせで添加したタンパク質合成システムで、96 個の連続したグルタミンを持つヒトのハンチンチンタンパク質を合成し、フィルタートラップアッセイで凝集体の形成度合を解析した結果、Hsc70s (Hsc70、Hsp40、Hsp110 の共存下) あるいは CCT の存在下において、ハンチンチンタンパク質の凝集体形成が顕著に抑制されることを見出した。以上の研究成果は、本研究で提案した「ヒト因子由来の再構成型タンパク質合成システム」と「ヒトのシャペロン因子群」を組み合わせた解析システムならではのものである。本解析システムは全てヒト

由来の因子で構成しており、世界的にも似たような研究例はなく独創性が高い。また、本解析システムが、ヒトの病気に関連するタンパク質の凝集を抑制する因子の解析にも応用可能であることを示すことに成功したため、将来的には、神経変性疾患などタンパク質の立体構造異常に起因する疾患の分子機構の解析のための技術基盤になると期待できる。

<引用文献>

Niwa T, Kanamori T, Ueda T, Taguchi H. Global analysis of chaperone effects using a reconstituted cell-free translation system. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Jun 5;109(23):8937-42.

Dekker C, Stirling PC, McCormack EA, Filmore H, Paul A, Brost RL, Costanzo M, Boone C, Leroux MR, Willison KR. The interaction network of the chaperonin CCT. *EMBO J*. 2008 Jul 9;27(13):1827-39.

Yam AY1, Xia Y, Lin HT, Burlingame A, Gerstein M, Frydman J. Defining the TRiC/CCT interactome links chaperonin function to stabilization of newly made proteins with complex topologies. *Nat Struct Mol Biol*. 2008 Dec;15(12):1255-62.

Kobayashi T, Yukigai J, Ueda K, Machida K, Masutani M, Nishino Y, Miyazawa A, Imataka H. Purification and visualization of encephalomyocarditis virus synthesized by an in vitro protein expression system derived from mammalian cell extract. *Biotechnol Lett*. 2013 Mar;35(3):309-14.

Kobayashi T, Nakamura Y, Mikami S, Masutani M, Machida K, Imataka H. Synthesis of encephalomyocarditis virus in a cell-free system: from DNA to RNA virus in one tube. *Kobayashi T, Nakamura Y, Mikami S, Masutani M, Machida K, Imataka H*.

Kobayashi T, Machida K, Mikami S, Masutani M, Imataka H. Cell-free RNA replication systems based on a human cell extracts-derived in vitro translation system with the encephalomyocarditis virus RNA. *J. Biochem*. 2011 Oct;150(4):423-30.

Mikami S, Kobayashi T, Machida K, Masutani M, Yokoyama S, Imataka H. N-terminally truncated GADD34 proteins are convenient translation enhancers in a human cell-derived in vitro protein synthesis system. *Biotechnol. Lett*. 2010 Jul;32(7):897-902.

Machida K, Fujiwara R, Tanaka T, Sakane I, Hongo K, Mizobata T, Kawata Y. Gly192 at hinge 2 site in the chaperonin GroEL plays a pivotal role in the dynamic apical domain movement that leads to GroES binding and efficient encapsulation of substrate proteins. *Biochim Biophys Acta*. 2009

Sep;1794(9):1344-54.

Machida K, Kono-Okada A, Hongo K, Mizobata T, Kawata Y. Hydrophilic residues 526KNDAAAD531 in the flexible C-terminal region of the chaperonin GroEL are critical for substrate protein folding within the central cavity. *J Biol Chem*. 2008 Mar 14;283(11):6886-96.

Masutani M, Machida K, Kobayashi T, Yokoyama S, Imataka H. Reconstitution of eukaryotic translation initiation factor 3 by co-expression of the subunits in a human cell-derived in vitro protein synthesis system. *Protein Expr Purif*. 2013 Jan;87(1):5-10.

Machida K, Kobayashi T, Mikami S, Masutani M, Imataka H. Reconstitution of the human chaperonin CCT by co-expression of the eight distinct subunits in mammalian cells. *Protein Expr. Purif*. 2012 Mar;82(1):61-9.

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3件)

Machida K, Shigeta T, Kobayashi A, Masumoto A, Hidaka Y, Imataka H. Cell-free analysis of polyQ-dependent protein aggregation and its inhibition by chaperone proteins.

J Biotechnol. 2016 Dec 10;239:1-8.

doi: 10.1016/j.jbiotec.2016.09.031.

査読有.

Özdemir A, Machida K, Imataka H, Catling AD.

Identification of the T-complex protein as a binding partner for newly synthesized cytoplasmic dynein intermediate chain 2. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016 Jan 1;469(1):126-31.

doi: 10.1016/j.bbrc.2015.11.082.

査読有.

Machida K, Imataka H.

Production methods for viral particles.

Biotechnol Lett. 2015 Apr;37(4):753-60.

doi: 10.1007/s10529-014-1741-9.

査読有.

[学会発表](計5件)

Kodai Machida, Tomoaki Shigeta, Ayano Kobayashi, Ai Masumoto, Yuna Hidaka, Hiroaki Imataka.

Cell-free analysis of polyglutamine-dependent protein aggregation and its inhibition by molecular chaperones.

Nascent Chain Biology Meeting 2016 (国際学会)

2016年09月01日~2016年09月03日

富士レークホテル(山梨県、南都留郡)

町田幸大、重田友明、今高寛晃

ヒト因子由来再構成型タンパク質合成系の開発と応用

第68回日本生物工学会大会(招待講演)

2016年09月28日~2016年09月30日

ANAクラウンプラザホテル富山(富山市)

町田幸大、重田友明、今高寛晃

ヒト因子由来再構成型翻訳システムの開発とその応用

第89回日本生化学会大会(招待講演)

2016年09月25日~2016年09月27日

東北大学川内北キャンパス(仙台市)

町田幸大、重田友明、今高寛晃

試験管内ウイルス合成

日本農芸化学会2016年大会シンポジウム(招待講演)

2016年03月28日~2016年03月30日

札幌コンベンションセンター(札幌市)

Hiroaki Imataka, Kodai Machida, Tomoaki

Shigeta

A New Experimental Tool: Translation System Reconstituted with Purified Human Factors.

Protein & Peptide Conference 2015(国際学会)

2015年04月25日~2015年04月28日

Nanjing International Youth Conference

Hotel (No. 9 Yecheng Road, Nanjing, P.R, China)

[図書](計1件)

重田友明、町田幸大、今高寛晃

シーエムシー出版

人工細胞の創生とその応用、2017

第1章タンパク質合成技術-4

ヒト完全再構成型タンパク質合成システム

[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:

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

町田 幸大 (MACHIDA, Kodai)
兵庫県立大学・大学院工学研究科・助教
研究者番号：20553093

(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

()