

構造生物学研究センター活動報告

平成 28 年 4 月 20 日受付

吉 田 賢 右*

要 旨

構造生物学研究センターは、5つの研究グループ（吉田賢右グループ、永田和宏グループ、伊藤維昭グループ、嶋本伸雄グループ、津下英明グループ）で構成され、全体として「タンパク質の生成と管理」にかかわる研究を進めてきた。平成 23 年から平成 27 年まで 5 年に渡るプロジェクトが終了した。ここに 5 年のそれぞれのグループの研究成果をまとめ報告する。

5 年間で 76 報の論文を国際誌に発表した。

キーワード：シャペロン, 小胞体品質管理, nascentome, tmRNA, X 線結晶構造解析

ATP 合成酵素と分子シャペロンの作用機構の研究

吉田賢右, 鈴木俊治, 元島史尋

我々の研究室は、ATP 合成酵素と分子シャペロンの研究をおこなってきた。

ATP 合成酵素は、ミトコンドリア内膜、細菌の細胞膜、葉緑体のチラコイド膜に存在し、膜内外の下り坂のポテンシャル勾配を流れる H^+ のエネルギーで ATP 合成を行っている。 H^+ のエネルギーで酵素の中心軸が回転することが知られている。逆反応では、ATP 加水分解によって中心軸が逆向きに回転する。膜中の部分である F_0 と、膜外に突き出ている F_1 に可逆的に分離できる。 F_1 は水溶性の ATPase であり、ATP 加水分解で中心軸の γ サブユニットが回転する。

分子シャペロンは、他のタンパク質の folding を援助する一群のタンパク質である。シャペロニン (GroEL) は、もっともよく研究されてきた分子シャペロンである。HtpG は、Hsp90 とも呼ばれて、真核細胞ではもっとも多量に存在する分子シャペロンで多くの研究があるが、細菌ではその生理的な機能が解明されていない。

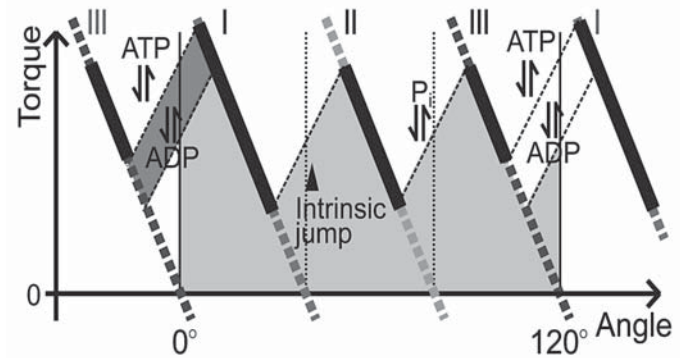
1 ATP 合成酵素

(1) ATP 合成酵素の制御の分子機構

好熱菌の F_1 の回転子 γ サブユニットに微小磁気ビーズを付着して外部磁場の方向と実際の磁気ビーズの方向の角度のずれの精密な測定をおこない、回転角度ごとの回転トルクを算出した。すると、 F_1

* 京都産業大学研究機構, 構造生物学研究センター

はATP加水分解によって、0度、40度、80度のあたりでトルクがジャンプしていることがわかった。つまり、120度に3本のバネが等間隔に配置されて、一つのバネが伸びきったところで、次の圧縮されたバネに乗り移るようなことをしている。0度付近のジャンプはATPの結



合およびADPの解離によって起こり、80度のそれは無機リン酸の解離で起こる。40度のトルクジャンプはATPが無いときにも観察された（このとき、逆方向のトルクが0度から40度の間で働くので、外から力を加えない限り γ サブユニットは40度の位置に到達できない）。 γ サブユニットは40度の位置に置かれると、そこに安定にとどまることはできず、どうしても前に回ろうとするのである。今までは、ATPの結合でトルクが生じて γ サブユニットは0度から80度まで回転する、と考えられた。しかし、ATPの結合によって生じた自由エネルギーは0度から40度の回転に使われて、40度から80度の回転は自動的に生じると考えたほうが良い。言い換えれば、40度までの回転によって F_1 分子内部に構造のひずみが生じて、その解消のために γ サブユニットは80度まで回転する。また、 F_1 の40度ごとのトルクジャンプは、 F_0 の36度ごとのトルクジャンプとずれが少なく、両モーターのスムーズな接続を可能にしていると考えられる。

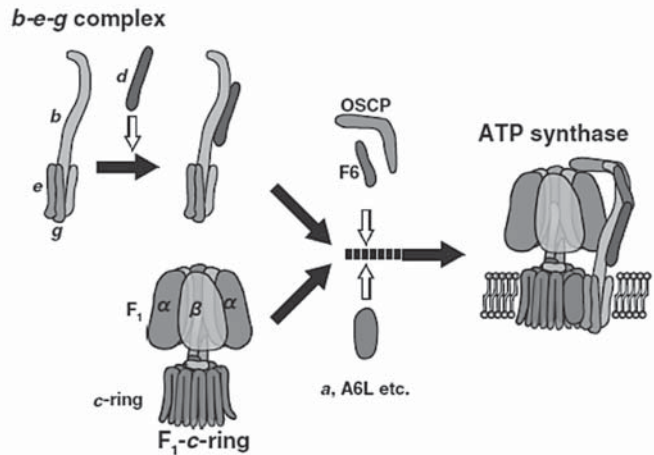
(2) 制御欠陥のある細胞と個体の生理

細菌のATP合成酵素は ϵ サブユニットによって阻害されるが、その阻害が無効となる変異を導入した枯草菌は孢子の産生に障害がおこることがわかった。一方、同様の変異を導入した大腸菌は塩水の中の生育が低下した。このように ϵ サブユニットの生理的な作用は細菌ごとにいろいろであることがわかってきた。

植物葉緑体のATP合成酵素の γ サブユニットには2つのシステインを含む余分な挿入配列があり、酸化されてS—S結合ができると活性（回転）が停止することがわかっていた。今回、実際の野外の植物でも、この酸化還元による制御が起きていることを証明した。すなわち、野外のハウレン草で、日の出とともに γ サブユニットのシステインは還元されて酵素は活性化し、日暮れになると酸化されて不活性化することを見出した。生きた生物でATP合成酵素の制御を直接観察されたのは初めてだろう。

ヒトATP合成酵素に弱く結合しているMLQという機能未知の小さなタンパク質を欠損させたところ、ATP合成酵素の量が顕著に減少した。MLQは、アッセムブリーに必須の因子であることがわかった。また、ATP合成酵素のマイナーなサブユニットである d のノックダウン細胞はミトコンド

リア内に2種のアッセンブリー中間体を蓄積することがわかった。一つはF₁と分子中央の回転シャフトの結合したF₁-c-ringであり、もう一つはF₁の固定子とF₀の固定子をつなぐ分子の外側のstalkの構成サブユニットを含む(b-e-g)複合体である。ヒトATP合成酵素は、回転子シャフトと固定子stalkが別々に構成されて、それが後に合体してできることが示唆された。



ヒト細胞 (HeLa細胞) で、300あまりのミトコンドリア局在で機能未知タンパク質のノックダウン株を作製し、そのATP合成活性をスクリーニングしたところ、遺伝子C20rf47によってコードされるタンパク質が減少するとミトコンドリアのATP合成酵素の量が顕著に減少することを発見した。C20rf47は、ATP合成酵素の量を制御する新しい因子であり、グルコース飢餓によって発現が亢進する。

ミトコンドリアATP合成酵素の阻害因子IF1を完全に失ったノックアウトマウスを作成した。驚いたことに、運動能力、絶食適応、生殖、など何の障害も見られなかった。IF1の阻害作用は今までin vitroの実験で多くの報告があるが、実は個体ではessentialではなかった。これに代替する因子を探索したが見つかっていない。最近、IF1ノックアウトマウスは、ガンになりにくいことを見出した(正確には、持続増殖性を獲得したMEFを移植したヌードマウスのガンの発達がみられない)。ガン細胞は、ATP生産をミトコンドリア依存から解糖系依存にきりかえる。IF1は、その切り替えに必要とされるのだろう。IF1がなくても、日常的な健康には無害で、しかもガンを防ぐ、となれば、IF1を阻害する低分子はガンを抑制する可能性がある。スクリーニングを開始している。

(3) ヒトF₁の回転機構

ヒトF₁を大腸菌に発現することに成功し、その回転触媒分子機構を主として1分子観察で解明した。回転子であるγサブユニットは、ATPの結合で0度から65度回転し、リン酸の解離で90度の位置まで25度回転し、次にATPの加水分解が起きて120度の位置まで30度回転する。F₁は、ATP3分子の加水分解で1回転(360度)するので、上記の120度回転が反応の1サイクルとなる。好熱菌F₁は、ATPの結合で80度回転し、ATPの加水分解が起きて次にリン酸の解離で30度回転する。このようにヒトF₁の回転触媒のようすは好熱菌F₁とはだいぶ違うことがわかった。ヒトF₀F₁を阻害するタンパク質であるIF1は、90度の位置で回転を止めた。これを強引に外力で時計回

り方向 (ATP 合成方向) に回すと、阻害が解除されて γ サブユニットは再び回転を開始した。この結果は、細胞内で水素イオンの流れによって γ サブユニットに時計回りの回転トルクがかかると、IF1 が解離して F_0F_1 の阻害が解除され ATP 合成が開始されることを示唆する。IF1 は、ATP 加水分解は阻害するが、ATP 合成は阻害しない、と考えられる。しかし、これは触媒反応として考えればありえないことであり、謎とされてきたが、上記の実験でこれが解決された。

(4) ATP 合成酵素の原子構造の解明

ATP 合成酵素全体の結晶解析は、いろいろ試みたが成功しなかった。回転異性体が生じるのを防ぐために、好熱菌の ATP 合成酵素の回転子と固定子のサブユニットを遺伝子的に融合したものをいろいろ作製した。しかし、多大な努力にもかかわらず良好な結晶は得られなかった。すでに J. Walker が長年挑んでいるのであるが、私たちもウシの ATP 合成酵素の結晶化を試みた。ウシ心臓から精製法を確立し、結晶化条件をさがしたが、よい結晶は取れなかった。結局、ATP 合成酵素全体の構造解析については世界の誰も成功することはなく、ごく最近、新しい低温無染色電子顕微鏡観察技術を駆使した研究者によって初めてその姿が見えるようになった (分解能はまだヘリックスは見えるがペプチド鎖をたどることは難しいレベル)。万人の予想を裏切って、 F_0 の a サブユニットの 2 本のヘリックスは、膜を垂直に貫通するのではなく、膜の中でななめに横たわっていた。

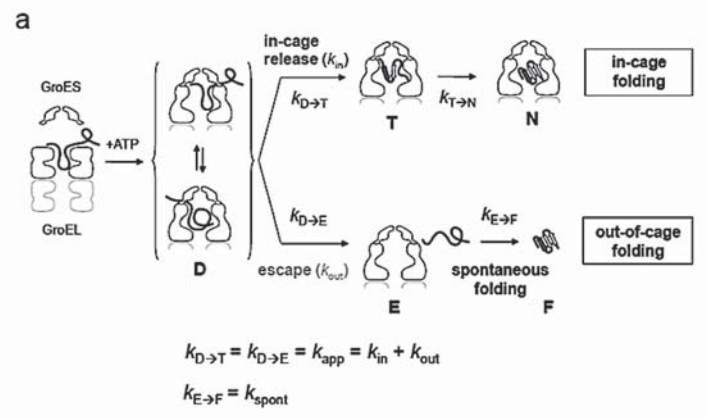
全体構造ではないが、私たちは、好熱菌の F_0 の c-ring の構造を固体 NMR で、好熱菌の F_1 の構造を結晶解析で、明らかにした。また、ウシ F_1 の大腸菌発現にも成功し、その結晶構造解析に成功した。大腸菌に合成させたウシ F_1 は、好熱菌の F_1 の膨大な結晶化努力がまるでウシのように、簡単に結晶化することができた。すでにウシ F_1 の結晶構造解析は Walker らのグループによってやり尽くされている感があるが、とにかく簡単に結晶化できるのでこれからは変異体の構造 (これは Walker にはできない) や阻害剤との複合体の構造など気軽に決めて参照することができる。

2 分子シャペロン

(1) シャペロニンの作用機構

大腸菌 GroEL に代表されるシャペロニンは内部に大きな空洞のあるタンパク質複合体 (分子量 80 万) である。ATP 加水分解のエネルギーによって他のタンパク質の folding を助ける、というシャペロニンの作用機構については、モデルが確立している。それによると、立体構造を持たないポリペプチドや変性したタンパク質は、まずシャペロニンの空洞入り口のへりに結合し、次に ATP 依存的にフタ (GroES) が結合すると、それと同時にカゴの中に放出される。そして、フタで閉じられたカゴの中で、安全に (凝集の恐れなく) native な立体構造に折りたたむことができる。しばらくすると、ATP 加水分解が進行してフタが開いて、収納されていたタンパク質がカゴの外へ出てくる。ところが、私たちはカゴの中のポリペプチド鎖は (GroES でフタされた後でも) シャペロニンに繋留されている (tethering) ことを発見した。繋留はダイナミックで、ポリペプチドのどこか一箇所がしっかりつな

ぎとめられているわけではなく、繫留箇所はいつも動いている、と考えられる（右の図, D)。ポリペプチドの一部がフタの隙間からカゴの外部にはみ出していることも多く、ときには、ポリペプチド鎖全体がカゴの外に逃げ出してしまふ (escape)。シャペロニンにダイナミックに繫留されながらフォールディングする、という新しいフォールディング経路が考えられる。この機構が正しければ、繫留が解かれてポリペプチドが、カゴの中に自由に解き放たれる (in-cage release) のと、外側に逃げ出すのと、同じ速度で起こるはず ($k_{D \rightarrow T} = k_{D \rightarrow E}$) であることが計算から予言される。実際に、実験では、両者の速度はいつもほぼ一致していた。



る、という新しいフォールディング経路が考えられる。この機構が正しければ、繫留が解かれてポリペプチドが、カゴの中に自由に解き放たれる (in-cage release) のと、外側に逃げ出すのと、同じ速度で起こるはず ($k_{D \rightarrow T} = k_{D \rightarrow E}$) であることが計算から予言される。実際に、実験では、両者の速度はいつもほぼ一致していた。

(2) ヒト細胞質のシャペロニン

真核細胞における天然変性タンパク質とシャペロニンの相互作用を考える材料として、大腸菌のシャペロニン GroEL を HeLa cell の小胞体に発現させた。GroEL としては、変性タンパク質に結合するだけで解離しない変異体 (トラップ GroEL) を使い、小胞体残留シグナルの KEDEL を付加し、また局在を確認するために GFP を融合した。すると、小胞内に発現した GroEL はジスルフィド結合で不規則な多量体となっていた。そこで外部に露出したシステインをすべてセリンなどに置換した GroEL を作製して、小胞体に発現させた。その結果、興味深いことに、小胞体ストレスは誘導されないのに、アポトーシスが起きた。分泌すべきタンパク質が GroEL に捕捉されてしまったために、アポトーシスが起きたと思われる

(3) Hsp90 の役割

大腸菌の天然変性タンパク質として報告されているリボソームタンパク質 L2 が分子シャペロン GroEL (Hsp60), DnaK (Hsp70), そして HtpG (Hsp90) に結合することを見いだしたので、大腸菌遺伝子ライブラリー (ASKA クローン) を使って、すべてのリボソームタンパク質を単離精製し、分子シャペロンとの結合を解析した。リボソームタンパク質の多くは塩基性の天然変性タンパク質であり、天然変性状態と分子シャペロンとの結合との相関性を調べるのに適当だと考えられた。迅速なスクリーニングのために、リボソームタンパク質と分子シャペロンの結合は、分子シャペロンの ATPase 活性の上昇を指標に測定する。まず各リボソームタンパク質による HtpG の ATPase 活性上

昇を調べた。多くのリボソームタンパク質が HtpG の ATPase 活性を促進したが、L2 に加え S3, S9, S13, L13, L19 が特に強く促進することがわかった。ただ、HtpG との直接的な結合は検出できていない。

本研究は私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「タンパク質の生成と管理」および基盤研究 S「ATP 合成酵素の構造と制御と生理」(研究課題番号:23227006) の助成を受けた。

参考文献

- 1) Taniguchi N, Suzuki T, Berney M, Yoshida M, Cook GM. The regulatory C-terminal domain of subunit ϵ of F_0F_1 ATP synthase is dispensable for growth and survival of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 2011 Apr;193 (8):2046-52.
- 2) Ohsakaya S, Fujikawa M, Hisabori T, Yoshida M. Knockdown of DAPIT (diabetes-associated protein in insulin-sensitive tissue) results in loss of ATP synthase in mitochondria. *J Biol Chem.* 2011 Jun 10;286 (23):20292-6.
- 3) Suzuki T, Wakabayashi C, Tanaka K, Feniouk BA, Yoshida M. Modulation of nucleotide specificity of thermophilic F_0F_1 -ATP Synthase by epsilon-subunit. *J Biol Chem.* 2011 May 13;286 (19):16807-13.
- 4) Soga N, Kinoshita K Jr, Yoshida M, Suzuki T. Efficient ATP synthesis by thermophilic *Bacillus* F_0F_1 -ATP synthase. *FEBS J.* 2011 Aug;278 (15):2647-54.
- 5) Kohori A, Chiwata R, Hossain MD, Furuie S, Shiroguchi K, Adachi K, Yoshida M, Kinoshita K Jr. Torque generation in F_1 -ATPase devoid of the entire amino-terminal helix of the rotor that fills half of the stator orifice. *Biophys J.* 2011 Jul 6;101 (1):188-95.
- 6) Usukura E, Suzuki T, Furuie S, Soga N, Saita E, Hisabori T, Kinoshita K Jr, Yoshida M. Torque generation and utilization in motor enzyme F_0F_1 -atp synthase: half-torque F_1 with short-sized pushrod helix and reduced atp synthesis by half-torque F_0F_1 . *J Biol Chem.* 2012 Jan 13;287 (3):1884-91.
- 7) Soga N, Kinoshita K, Yoshida M, Suzuki T. Kinetic equivalence of transmembrane pH and electrical potential differences in ATP synthesis. *J Biol Chem.* 2012 Mar 16;287 (12):9633-9.
- 8) Konno H, Nakane T, Yoshida M, Ueoka-Nakanishi H, Hara S, Hisabori T. Thiol modulation of the chloroplast ATP synthase is dependent on the energization of thylakoid membranes. *Plant Cell Physiol.* 2012 Apr; 53 (4): 626-34. doi: 10.1093/pcp/pcs018. Epub 2012 Feb 22.
- 9) Yumen I, Iwasaki I, Suzuki T, Todokoro Y, Tanaka K, Okada O, Fujiwara T, Yoshida M, Akutsu H. Purification, characterization and reconstitution into membranes of the oligomeric c-subunit ring of thermophilic F_0F_1 -ATP synthase expressed in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif.* 2012 Apr;82 (2):396-401. Epub 2012 Feb 20.
- 10) Fujikawa M, Imamura H, Nakamura J, Yoshida M. Assessing actual contribution of IF1, inhibitor of mitochondrial F_0F_1 , to ATP homeostasis, cell growth, mitochondrial morphology, and cell viability. *J Biol Chem.* 2012 May 25; 287 (22): 18781-7. Epub 2012 Apr 9
- 11) Nojima T, Ikegami T, Taguchi H, Yoshida M. Flexibility of GroES Mobile Loop Is Required for Efficient Chaperonin Function. *J Mol Biol.* 2012 Sep 14;422 (2):291-9. Epub 2012 May 25.
- 12) Adachi K, Oiwa K, Yoshida M, Nishizaka T, Kinoshita K Jr. Controlled rotation of the F_1 -ATPase reveals differential and continuous binding changes for ATP synthesis. *Nat Commun.* 2012 Aug 28;3:1022.

doi: 10.1038/ncomms2026.

- 13) Suno R, Shimoyama M, Abe A, Shimamura T, Shimodate N, Watanabe YH, Akiyama Y, Yoshida M. Conformational transition of the lid helix covering the protease active site is essential for the ATP-dependent protease activity of FtsH. *FEBS Lett.* 2012 Sep 21;586 (19):3117-21
- 14) Motojima F, Motojima-Miyazaki Y, Yoshida M. Revisiting the contribution of negative charges on the chaperonin cage wall to the acceleration of protein folding. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 Sep 25; 109 (39): 15740-5.
- 15) Nojima T, Konno H, Kodera N, Seio K, Taguchi H, Yoshida M. Nano-scale alignment of proteins on a flexible DNA backbone. *PLoS One.* 2012; 7 (12): e52534. doi: 10.1371/journal.pone.0052534. Epub 2012 Dec 26.
- 16) Nakamura J, Fujikawa M, Yoshida M. IF1, a natural inhibitor of mitochondrial ATP synthase, is not essential for the normal growth and breeding of mice. *Biosci Rep.* 2013 Sep 17;33 (5). pii: e00067. doi: 10.1042/BSR20130078.
- 17) Sugawara K, Fujikawa M, Yoshida M. Screening of protein kinase inhibitors and knockdown experiments identified four kinases that affect mitochondrial ATP synthesis activity. *FEBS Lett.* 2013 Nov 29;587 (23):3843-7. doi: 10.1016/j.febslet.2013.10.012. Epub 2013 Oct 21.
- 18) Fujikawa M, Ohsakaya S, Sugawara K, Yoshida M. Population of ATP synthase molecules in mitochondria is limited by available 6.8-kDa proteolipid protein (MLQ). *Genes Cells.* 2013 19: 153-60. doi: 10.1111/gtc.12121. [Epub ahead of print]
- 19) Kioka H, Kato H, Fujikawa M, Tsukamoto O, Suzuki T, Imamura H, Nakano A, Higo S, Yamazaki S, Matsuzaki T, Takafuji K, Asanuma H, Asakura M, Minamino T, Shintani Y, Yoshida M, Noji H, Kitakaze M, Komuro I, Asano Y, Takashima S. Evaluation of intramitochondrial ATP levels identifies G0/G1 switch gene 2 as a positive regulator of oxidative phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014 Jan 7;111 (1):273-8. doi: 10.1073/pnas.1318547111. Epub 2013 Dec 16
- 20) Kang S, Todokoro Y, Yumen I, Shen B, Iwasaki I, Suzuki T, Miyagi A, Morikawa K, Yoshida M, Fujiwara T, Akutsu H* (2014) Active-Site Structure of Thermophilic Foc-Subunit Ring in Membranes Elucidated by Solid-State NMR. *Biophys J*, 106 (2), 390-398.
- 21) Chiwata R, Kohori A, Kawakami T, Shiroguchi K, Furuike S, Adachi K, Sutoh K, Yoshida M, Kinoshita K Jr. None of the rotor residues of F1-ATPase are essential for torque generation. *Biophys J.* 2014 May 20;106 (10):2166-74.
- 22) Suzuki T*, Tanaka K, Wakabayashi C, Saita E, Yoshida M* (2014) Chemo-mechanical coupling of human mitochondrial F1-ATPase motor. *Nature Chem Biol*, 10, 930-6.
- 23) Saita E, Suzuki T, Kinoshita K Jr, Yoshida M. Simple mechanism whereby the F₁-ATPase motor rotates with near-perfect chemomechanical energy conversion PNAS 2015 112 (31) 9626-9631
- 24) Shirakihara Y, Shiratori A, Tanikawa H, Nakasako M, Yoshida M, Suzuki T. Structure of a thermophilic F1-ATPase inhibited by an ϵ -subunit: deeper insight into the ϵ -inhibition mechanism. *FEBS J.* 2015 Aug;282 (15):2895-913. doi: 10.1111/febs.13329.
- 25) Fujikawa M, Sugawara K, Tanabe T, Yoshida M. Assembly of human mitochondrial ATP synthase through two separate intermediates, F1-c-ring and b-e-g complex. *FEBS Lett.* 2015 Sep 14;589 (19 Pt B):2707-12. doi: 10.1016/j.febslet.2015.08.006.
- 26) Motojima F, Yoshida M. Productive folding of a tethered protein in the chaperonin GroEL-GroES cage. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015 Oct 9;466 (1):72-5. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.08.108.

ミスフォールドタンパク質の品質管理機構

永田和宏, 潮田亮, 森戸大介, 山本洋平, 伊藤進也

タンパク質はその完成型として正しい構造と機能を持ったものが多く研究の対象となってきた。しかし、ポリペプチドとして翻訳されたのち、機能型へと成熟するプロセスは、どのタンパク質についても重要なステップであり、翻訳後のフォールディングや輸送の問題は避けて通れないものと認識されるようになった。フォールディングのプロセスで主役を演じるのは分子シャペロンであるが、本研究室では分子シャペロンによる細胞機能制御を大きなテーマとして研究を続けている。

また細胞にかかる種々のストレス、細胞老化や遺伝子の変異などによって、タンパク質は構造の変化を受け、変性したり、凝集塊を使ったりする。これらはタンパク質そのものの機能が失われるだけでなく、それ自体が細胞にとって毒性を発揮し、細胞死を誘導する。これら変性や凝集をきたしたタンパク質をどのように再生させたり、除去したりするかは細胞の生存にとって必須である。このような機構をタンパク質の品質管理機構と呼ぶ。本研究室のもう一つの大きなテーマは、タンパク質の品質管理機構の研究である。

そのような二つの大きなテーマのもとに、具体的に本研究期間中に3つの柱に基づいて研究を行った。

- 1) 小胞体におけるタンパク質品質管理, レドックス制御, カルシウム恒常性のクロストーク: 小胞体恒常性維持機構の解明
- 2) コラーゲン特異的分子シャペロン Hsp47 の機能解析
- 3) Moyamoya 病原因遺伝子 *mysterin* の機能解析

1) 小胞体におけるタンパク質品質管理, レドックス制御, カルシウム恒常性のクロストーク: 小胞体恒常性維持機構の解明

細胞内小器官の一つである小胞体では、タンパク質品質管理・レドックス制御・カルシウムホメオスタシスという三つの環境要因が影響を及ぼしあい、恒常性を維持している。小胞体のレドックスはサイトゾルと比較し、非常に酸化的で、その酸化的環境が小胞体内における酸化的フォールディングを促進している。そのため多くの酸化異性化酵素が存在し、それらはネットワークを形成し、タンパク質のジスルフィド結合形成に寄与している。我々は酸化酵素 PDI-ERO1 をハブとして小胞体の酸化酵素ネットワークを解明した (文献1)。

また、酸素電極を利用し、PDI 分子内の電子の移動および ERO1 への電子の流れを証明し、PDI を介したタンパク質の酸化的フォールディングのメカニズム解明に貢献した (文献2)。さらに酸化酵素 ERO1 および PRX4 の小胞体局在メカニズムが ERp44 によって制御され、小胞体における過度な酸化状態を ERO1 の局在制御によって防いでいることを報告した (文献3)。

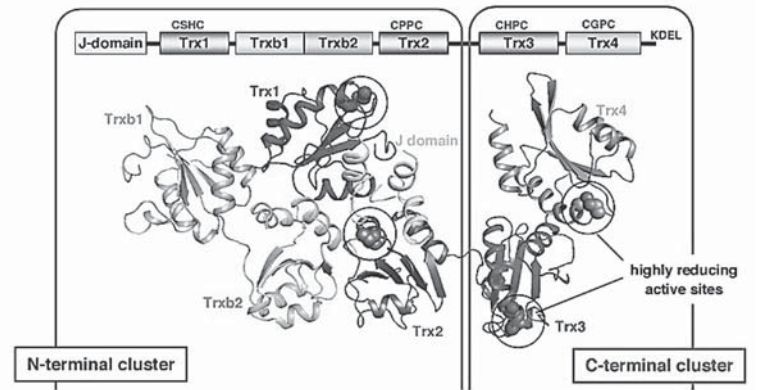
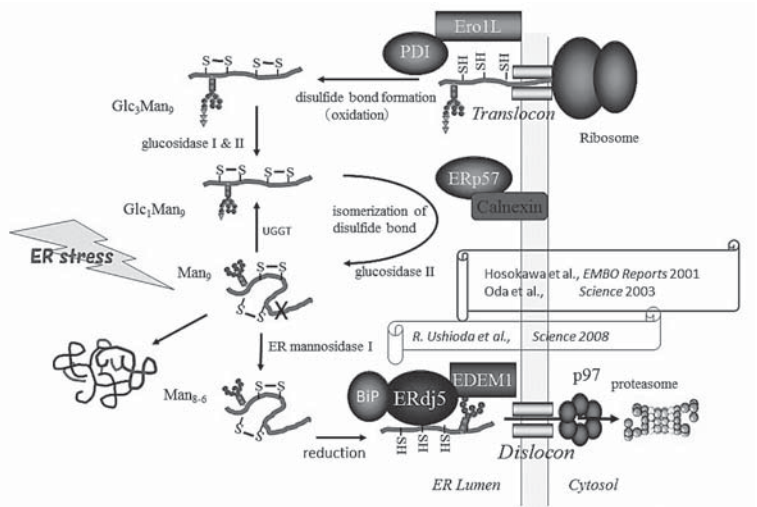
一方、我々は小胞体でジスルフィド還元活性に特化する還元酵素 Erdj5 を発見し、Erdj5 が小胞体のレクチンタンパク質 EDEM および分子シャペロン BiP と複合体を形成することを見出した。Erdj5 は小胞体で末期的にミスフォールドした分解基質のジスルフィド結合を自身の還元活性で切断

し、小胞体からサイトゾルへの排出を促進し、タンパク質品質管理において重要な役割を果たしていることを見出した（文献4）。

続いて、東北大学稲葉謙次教授らとの共同研究によって、ERdj5 全長の X 線結晶構造解析に成功し、詳細な複合体解析とドメイン解析がなされた。その結果、ERdj5 を介した糖タンパク質の品質管理が、EDEM によって基質認識され、ERdj5 の還元活性によって基質のジスルフィド結合が解離され、その後、基質が BiP に受け渡される一連のプロセスが証明された（文献5）。

また、ERdj5 の小胞体品質管理は糖タンパク質に限らず、非糖タンパク

質の品質管理にも関わることが証明され、今まで詳細のわからなかった非糖タンパク質の品質管理について報告した（文献6）。さらに ERdj5 が小胞体膜上に存在するカルシウムポンプ SERCA2 のジスルフィド結合を自身の還元活性で開裂し、複合体を形成することで小胞体へのカルシウム流入を調節し、小胞体のカルシウム動態に影響を与えていることが明らかになった。さらに ERdj5 は小胞体内腔のカルシウム濃度を感じ、SERCA2 との複合体形成を調節していることを明らかにした（論文投稿中）。このことは ERdj5 の還元力がタンパク質品質管理のみならず、小胞体のカルシウムホメオスタシスの制御に重要な役割を果たすことを意味している。本研究は、小胞体内腔の恒常性維持機構を理解する上で重要である。現在、ERdj5 の還元メカニズムを解明するため ERdj5 の結合タンパク質の同定を行っている。候補分子の同定に成功しており、ERdj5 の詳細な分子メカニズムの解明に



も挑戦している。

参考文献

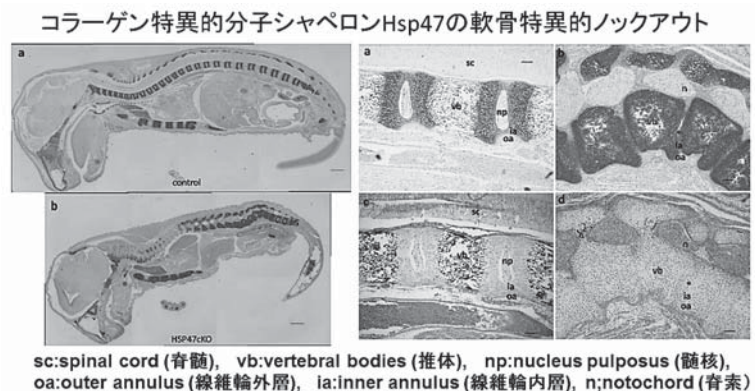
- (1) K. Araki, S. Iemura, Y. Kamiya, D. Ron, K. Kato, T. Natsume & K. Nagata
Ero1 α and PDIs constitute a hierarchical electron transfer network of endoplasmic reticulum oxidoreductases
J. Cell. Biol. 202 (6):861-874 (2013)
- (2) K. Araki and K. Nagata.
Functional in vitro analysis of ERO1 and protein-disulfide isomerase (PDI) pathway.
J. Biol. Chem. 286 (37):32705-32712 (2011)
- (3) T. Kakihana, K. Araki, S. Vavassori, S. Iemura, M. Cortini, C. Fagioli, T. Natsume, R. Sitia & K. Nagata
Dynamic regulation of Ero1 α and Prx4 localization in the secretory pathway
J. Biol. Chem. 288 (41):29586-29594 (2013) DOI: 10.1074/jbc.M113.467845
- (4) R. Ushioda, J. Hoseki, K. Araki, G. Jansen, D.Y. Thomas, & K. Nagata
ERdj5 is required as a disulfide reductase for degradation of misfolded proteins in the ER.
Science 321 (5888):569-72 (2008)
- (5) M. Hagiwara, K. Maegawa, M. Suzuki, R. Ushioda, K. Araki, Y. Matsumoto, J. Hoseki, K. Nagata and K. Inaba
Structural basis of an ERAD pathway mediated by the ER-resident protein disulfide reductase ERdj5.
Mol Cell. 41 (4):432-444 (2011)
- (6) R. Ushioda, J. Hoseki, and K. Nagata
Glycosylation-independent ERAD pathway serves as a backup system under ER stress.
Mol Biol Cell 24 (20):3155-63 (2013)

2) コラーゲン特異的分子シャペロン Hsp47 の機能解析

ヒートショックタンパク質 Hsp47 はコラーゲン特異的に働き、コラーゲンの正しいフォールディングに必須の分子シャペロンである。我々はその発見以来、Hsp47 の機能解析を行ってきた (文献 7)。

Hsp47 ノックアウトマウスは胚発生の初期に死亡することから、軟骨等の結合組織形成において Hsp47 がどのような役割を果たしているかは不明であった。Cre-LoxP システムを利用し、Hsp47 の軟骨細胞特異的なコン

ディショナルノックアウトマウスを作製し、軟骨形成における Hsp47 の機能を調べた。その結果、Hsp47 が軟骨細胞における II 型及び XI 型コラーゲンの産出や軟骨形成において不可欠な分子シャペロンである



ことを明らかにした (文献 8)。

Hsp47 はコラーゲンと相互作用することでそのシャペロンとしての機能を発揮する。従来とは異なる *In vitro* の方法により、単量体ではなく 3 重らせん構造を形成したコラーゲンにのみ Hsp47 が結合することを実証した。さらに、splitGFP を用いた 2 つのタンパク質が相互作用すると蛍光を発する方法を応用し、生きた細胞内で Hsp47 とコラーゲンの相互作用を捉えるツールの開発に成功した (文献 9)。次に、Hsp47 のコラーゲン結合部位を明らかにするために、ホモロジーモデルとアミノ酸特異的ラベルを導入した NMR 法を用いて、コラーゲンペプチド添加時の Hsp47 の NMR シグナルの変化を検出した。その結果、Hsp47 のセルピループ近傍の B/C β パレルドメイン付近でコラーゲンと結合していることが明らかになった (文献 10)。Hsp47 とコラーゲンの相互作用は pH 依存性を示し、pH6.3 以下では Hsp47 はコラーゲンに結合しない。共同研究により CD スペクトル等を用いた解析が行われ、pH 低下時のコラーゲンとの相互作用の変化に Hsp47 のいくつかのヒスチジン残基が関与する可能性が示唆された (文献 11)。

線維化疾患は細胞外マトリックスのコラーゲンの異常蓄積を特徴とする疾患である。慢性的な炎症によるコラーゲンの合成と分解の不均衡がコラーゲンの異常な蓄積を引き起こしている。共同研究により、炎症性腸疾患の一つであるクローン病において、インターロイキン -17A による Hsp47 とコラーゲンの発現誘導が腸の線維化に寄与することが分かった (文献 12)。代表的な線維化疾患である肝硬変において、肝細胞と類洞内皮細胞の間に存在する肝星細胞が活性化し、コラーゲンを過剰に産出し、線維化を進行させる。Cre-LoxP のシステムを用いて、マウスより単離した肝星細胞において、コラーゲン特異的分子シャペロン Hsp47 のノックアウトを行った。その結果、Hsp47 をノックアウトした肝星細胞では細胞外マトリックスのコラーゲン量が著しく減少し、細胞内のコラーゲン蓄積量が増加することが確認された。また、アポトーシスのマーカーであるカスパーゼ 3 の誘導が確認され、Hsp47 が無いことによって肝星細胞にアポトーシスが誘導されることが分かった。このことは、線維化疾患の治療において、Hsp47 が重要な創薬ターゲットとなることを改めて示した (文献 13)。また、当研究室では、線維化疾患のターゲットである Hsp47 の機能阻害を目的とし、Hsp47 とコラーゲンの相互作用を阻害する化合物の探索を行い、既に化合物を得ている (特許所得済み)。NMR 法を用いて化合物の Hsp47 への結合部位を調べた。その結果、化合物とコラーゲンの Hsp47 への結合部位が重なり、化合物の競合的な阻害様式が明らかになった。得られた構造情報はより効果的な Hsp47 阻害剤のデザインに役立つと考えられる。

遺伝性骨疾患である骨形成不全症 (OI) は I 型コラーゲンや I 型コラーゲンの合成に関わるタンパク質の変異によって起こる。近年、コラーゲン特異的分子シャペロンである Hsp47 の変異もヒトやイヌで骨形成不全症を引き起こすことが報告された。Hsp47OI 変異体の分子特性を詳細に研究するために、Hsp47 の 2 つの OI 変異体である L78P と L326P 変異体を Hsp47 ノックアウト線維芽細胞に発現させ、Hsp47 変異体の可溶性及びコラーゲン結合能を調べた。2 つの OI 変異体は構造的に不安定であり、ユビキチンプロテアソーム系により分解されるため、Hsp47 のタンパク質量が少ないこ

とが分かった。また、OI 変異体の可溶性は野生型よりかなり低く、コラーゲンに対する結合能も著しく低下していることが分かった。小胞体内の可溶性の Hsp47 の量の減少だけではなく、分子シャペロンとしてコラーゲンのフォールディングに必須となるコラーゲンに結合する能力の減少もまた骨形成不全症を引き起こす原因の一つであることが考えられた (文献 14)。

参考文献

- (7) Ishida Y, [Nagata K](#).
Hsp47 as a collagen-specific molecular chaperone.
Methods Enzymol. 499:167-82. (2011)
- (8) Masago Y, Hosoya A, Kawasaki K, Kawano S, Nasu A, Toguchida J, Fujita K, Nakamura H, Kondoh G, [Nagata K](#).
The molecular chaperone Hsp47 is essential for cartilage and endochondral bone formation.
J Cell Sci. 125 (Pt 5):1118-28. (2012)
- (9) Ono T, Miyazaki T, Ishida Y, Uehata M, [Nagata K](#).
Direct in vitro and in vivo evidence for interaction between Hsp47 protein and collagen triple helix.
J Biol Chem. 287 (9):6810-8. (2012)
- (10) Yagi-Utsumi M, Yoshikawa S, Yamaguchi Y, Nishi Y, Kurimoto E, Ishida Y, Homma T, Hoseki J, Nishikawa Y, Koide T, [Nagata K](#), Kato K.
NMR and mutational identification of the collagen-binding site of the chaperone Hsp47.
PLoS One. ;7 (9):e45930. (2012)
- (11) Abdul-Wahab MF, Homma T, Wright M, Olerenshaw D, Dafforn TR, [Nagata K](#), Miller AD. The pH sensitivity of murine heat shock protein 47 (HSP47) binding to collagen is affected by mutations in the breach histidine cluster.
J Biol Chem. 288 (6):4452-61. (2013)
- (12) Honzawa Y, Nakase H, Shiokawa M, Yoshino T, Imaeda H, Matsuura M, Kodama Y, Ikeuchi H, Andoh A, Sakai Y, [Nagata K](#), Chiba T.
Involvement of interleukin-17A-induced expression of heat shock protein 47 in intestinal fibrosis in Crohn's disease.
Gut. 63 (12):1902-12. (2014)
- (13) Kawasaki K, [Ushioda R](#), [Ito S](#), Ikeda K, Masago Y, [Nagata K](#).
Deletion of the collagen-specific molecular chaperone Hsp47 causes endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis of hepatic stellate cells.
J Biol Chem. 290 (6):3639-46. (2015)
- (14) [Ito S](#), [Nagata K](#).
Mutants of collagen-specific molecular chaperone Hsp47 causing osteogenesis imperfecta are structurally unstable with weak binding affinity to collagen.
Biochem Biophys Res Commun. 469 (3):437-42. (2016)

3) Moyamoya 病原因遺伝子 *mysterin* の機能解析

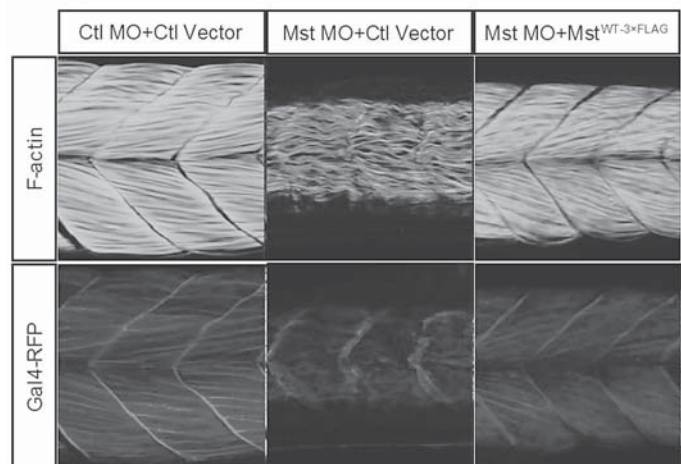
我々は京都大学、国立循環器病センター、大阪大学等と共同で、モヤモヤ病発症の鍵因子と考えられる新規遺伝子ミステリンを同定・クローニングした（文献 15）。モヤモヤ病は日本を含む東アジア地域で多く見られる原因不明の脳血管疾患で、脳底部動脈の狭窄・閉塞による虚血症状と、側副血管からの出血を主な病態としている。ミステリン遺伝子は 591 KDa の巨大なタンパク質をコードしており、C 末端付近に存在するミスセンス SNP (R4810K) により、モヤモヤ病発症率が 100 倍以上上昇していた。興味深いことに、ミステリンタンパク質には AAA+ ATP アーゼドメインと RING フィンガーユビキチンリガーゼドメインが含まれており、これまで知られている中で唯一の ATP アーゼ・ユビキチンリガーゼハイブリッド酵素であると考えられた。ミステリンの生理・病態機能についてはこれまで全く知見がなかったが、脳血管疾患の鍵因子と考えられたことから、ゼブラフィッシュを用いて血管形成への寄与を検討したところ、ミステリンの発現抑制により、生理的血管新生が障害されることが明らかとなった。このことは、ミステリンが生理的血管新生に寄与する因子であり、変異によるミステリン機能異常が脳血管疾患を引き起こすことを示唆している。

アラインメント解析や 2 次構造予測から、ミステリンには 2 つの AAA+ ATP アーゼドメインがあることが示唆された。AAA+ ATP アーゼはドーナツ形の複合体を形成し、ATP 加水分解にともなう構造変化と、それによる物理プロセスへの寄与を特徴とする。ミステリンがこのグループに属する酵素であるか検討するため、全長ミステリンの精製を行い、ネガティブ染色による電子顕微鏡観察を行ったところ、巨大なドーナツ状複合体の形成を認めた。生化学解析、1 分子動態解析からは、ミステリンが 1 つ目の ATP アーゼドメインで ATP に結合して複合体化し、2 つ目の ATP アーゼドメインで ATP を加水分解して何らかの物理プロセスに寄与した後、解離することが示唆された（文献 16）。

今後、X 線結晶構造解析やクライオ電子顕微鏡解析等により、さらに詳細な構造・機能相関情報を得ることを目指す。

ミステリン発現抑制ゼブラフィッシュは顕著な血管新生障害を示したが、ミステリンの発現は血管組織に限局されない。ミステリン抑制ゼブラフィッシュが孵化障害、運動障害を示したことから、さらに詳細な表現型解析を行ったところ、ミステリンは血管の他にも、筋肉、運動神経の形成に必須であり、しかもその際、ATP アーゼ活性、ユビキチンリガーゼ活性の

Mysterin のノックダウンによる速筋特異的障害と回復



両方が重要であることが明らかとなった（文献17）。今後、これら酵素活性の標的基質を明らかにし、細胞内・個体内機能の解明を進めたい。

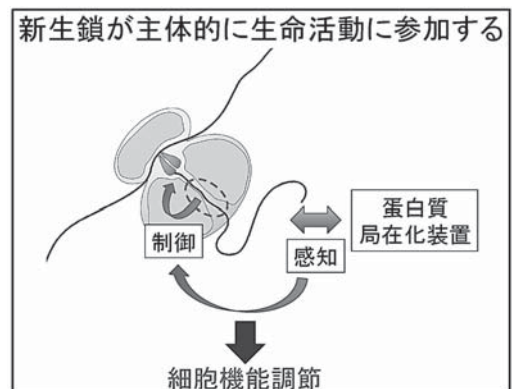
参考文献

- (15) Kotani Y, Morito D, Yamazaki S, Ogino K, Kawakami K, Takashima S, Hirata H, Nagata K
Neuromuscular regulation in zebrafish by a large AAA+ ATPase/ubiquitin ligase, mysterin/RNF213.
Scientific Rep. 5, Article number: 16161 (2015)
- (16) D. Morito, K. Nishikawa, J. Hoseki, A Kitamura, Y. Kotani, K. Kiso, M. Kinjo, Y. Fujiyoshi & K. Nagata
Moyamoya disease-associated protein mysterin/RNF213 is a novel AAA+ ATPase, which dynamically
changes its oligomeric state.
Scientific Rep. 24;4:4442 (2014)
- (17) W. Liu, D. Morito, S. Takashima, Y. Mineharu, H. Kobayashi, T. Hitomi, H. Hashikata, N. Matsuura, S.
Yamazaki, A. Toyoda, K. Kikuta, Y. Takagi, K. H. Harada, A. Fujiyama, R. Herzig, B. Krischek, L. Zou, J.E.
Kim, M. Kitakaze, S. Miyamoto, K. Nagata, N. Hashimoto and A. Koizumi
Identification of RNF213 as a Susceptibility Gene for Moyamoya Disease and Its Possible Role in Vascular
Development.
PLoS One 2011;6 (7):e22542.
- (18) D. Morito and K. Nagata
Pathogenic hijacking of ER-associated degradation: Is ERAD flexible?
Mol. Cell 59:335-344 (2015)

合成途上鎖の機能

伊藤維昭, 千葉志信

概要と意義：本研究では、新たな研究分野「合成途上鎖の分子生物学」の開拓と推進を行った。生命活動を担うタンパク質は、DNA に書き込まれた遺伝情報に従った順番でアミノ酸が順次結合することによって作られる。この「翻訳」はセントラルドグマのキーとなる過程であり、リボソームにおいてデコーディング（情報処理）とペプチド結合形成（ケミストリー）が行われることにより進行する。ペプチド転移活性中心において生成される合成途上鎖（polypeptidyl-tRNA）は、トンネルを通過してリボソームの外に出て行く。我々は、これらの過程が、一定スピードで機械的・単調に進行するものではなく、リボソームと合成途上鎖が相互作用しつつ、緩急の制御を伴って進行するものであることを示し、「合成途上で働く」という、タンパク質の新たなあり方を見いだした。具体的には、タンパク質の細胞表層へ



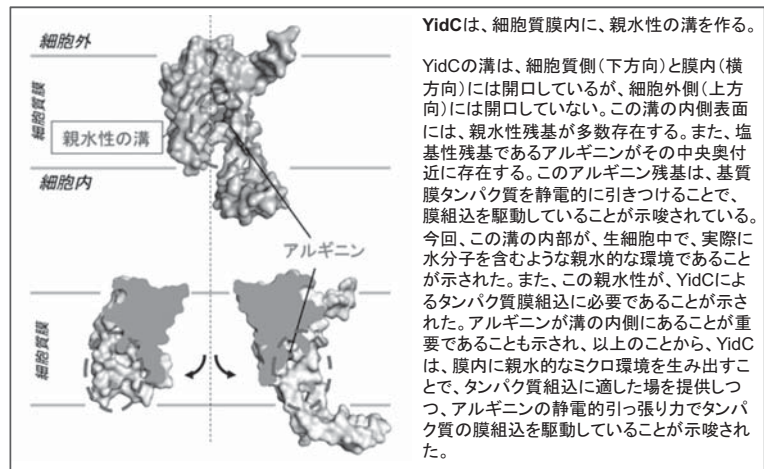
の局在化を監視して膜透過駆動因子 SecA の発現制御を行う大腸菌 SecM (1) や、膜タンパク質の細胞膜への挿入過程を監視して膜挿入装置 YidC の翻訳制御を行う枯草菌 MifM (2) などを取りあげた。さらに共同研究者によって、新たに海洋性細菌の VemP がタンパク質膜透過装置を構成する SecDF の制御を行うことも見出された (3)。我々は, Regulatory nascent polypeptides (4) と呼ばれ、翻訳伸長アレストを起こすタンパク質の中で、タンパク質局在化装置の基質としてその活性をモニターする一連のものをモニター基質 (monitoring substrate) と呼ぶことを提唱している (3)。これらのモニタータンパク質はリボソームトンネルの成分と相互作用して翻訳にブレーキをかける「アレスト配列」を持つ一方、N 末端近くの「センサー」部分はタンパク質局在化装置の働きを受け、それらの活性に呼応して翻訳アレストの時間を決めている (5)。このように mRNA 上でのリボソームの動きが制御され、mRNA 分子の状態変化と標的遺伝子の翻訳制御が行われる。

我々は、翻訳スピードの緩急制御は、新生ポリペプチド鎖のフォールディングや局在化などの「成熟プロセス」が的確に起こるための重要な要素ではないかと考えている。逆に翻訳途上新生鎖の挙動 (タンパク質局在化装置の作用を受けること) によって生ずる物理力が翻訳過程そのものに影響する (翻訳アレストを解除する) ことも、SecM や MifM の研究によって示され、現在ではより一般化された概念として、「新生鎖のフォールディング過程が翻訳のプロセスに影響する」ことが確立するに至った (6)。翻訳進行のスピードが、合成途上鎖のアミノ酸配列およびその動的状態により影響されると言うセントラルドグマの新しい問題点の分子機構を解明し、それが新生タンパク質の「運命決定」にどのように重要であるのかの解明することを目的とした研究を展開した。このような問題意識の下で、細胞に於ける合成途上鎖 (未だ tRNA 分子に結合しているポリペプチド鎖) に注目して、各遺伝子の翻訳過程の実像を明らかにする研究も行った。

(1) タンパク質膜透過、膜組込み装置の立体構造と作用機構

Sec 装置は全生物を通じて共通性が高いポリペプチド鎖透過チャネルを形成するトランスロコンと補助因子からなる。バクテリアにおいては、膜タンパク質 SecY-SecE-SecG が 3 量体を作ってトランスロコンとして働く。SecA ATPase が ATP のエネルギーを使って分泌タンパク質前駆体 (基質タンパク質) を細胞質側からトランスロコンに押し込む。ペリプラズム側では膜タンパク質 SecDF が基質タンパク質の膜透過を助けている。東京大学濡木研究室との共同研究により、高度好熱菌の Sec タンパク質膜透過装置の立体構造決定を進めた。本研究期間には、SecDF の X 線結晶構造を決定し、SecDF がプロトン駆動力を利用して、分泌タンパク質の膜を越えた移動を促進する新たな機構を解明した (7)。一方、膜タンパク質の膜脂質層への挿入と膜タンパク質の正しい構造形成においては、膜タンパク質 YidC が機能する。YidC は SecYEG トランスロコンと共同で働く場合と、単独で基質膜タンパク質の膜への挿入を司る場合の二つの経路が知られる。濡木研究室および奈良先端大学院大学の塚崎研究室などとの共同研究による YidC の結晶構造決定に参加し、機能解析を担当した。その結果、YidC はポリペプチド透過チャネルによらず、膜内部に親水性環境を作り出すことによって、

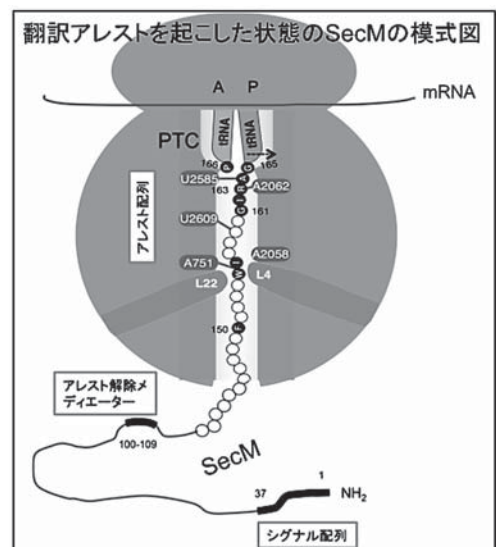
タンパク質の膜組込みを促進すると、新たなメカニズムを提唱した。そして、この機構による YidC の活性に重要なアルギニン残基を同定した (8)。YidC は膜内部に親水性の窪みを形成し、基質タンパク質の細胞外ドメインが膜を横切の際の中継点を提供すると考



えられたが、このモデルを確立するためには、膜に組み込まれた生理的な状態での構造情報を得る必要がある。我々は、YidC 膜貫通部位の残基それぞれについて、水分子要求性の化学修飾の受けやすさを生細胞を用いて調べ、YidC の膜貫通領域が実際に親水性の環境にある (親水性環境を作り出している) ことを実証した。さらに、膜貫通領域に親水性領域が存在することが YidC の機能に必須であることを、以下に述べる MifM を利用した遺伝生化学解析によって明らかにした (9)。

(2) モニター基質タンパク質における翻訳伸長アレストの機構、その制御機構および生理機能。

合成途上でリボソームに働きかけて翻訳伸長にブレーキをかける“Regulatory nascent polypeptide”は、リボソームの成分と相互作用して翻訳機能を阻害するアミノ酸配列を持っている。膜透過駆動因子 SecA の発現制御を行うモニター基質である大腸菌 SecM の翻訳は Gly165 から Pro166 へのペプチド伸長の段階で抑制される。この翻訳伸長アレストは、合成途上鎖が膜透過反応を受けることによって解除される。従来、SecM の機能には C 末端近くのアレスト配列が伸長アレストを起こすこと、および N 末端に存在する膜透過シグナルの働きにより起こる SecM 伸長鎖の Sec 経路による膜透過に共役してアレストが解除されることがわかっていたが、それらに挟まれた領域の役割は不明であった。我々は、この領域に存在する配列 (残基 100-109: アレスト解除メディエーター配列) が、SecM 新生鎖の膜透過反応と共役した効率よいアレスト解除に必要であることを見出した (10)。SecM 新生鎖が物理的な引っ張り力を受け

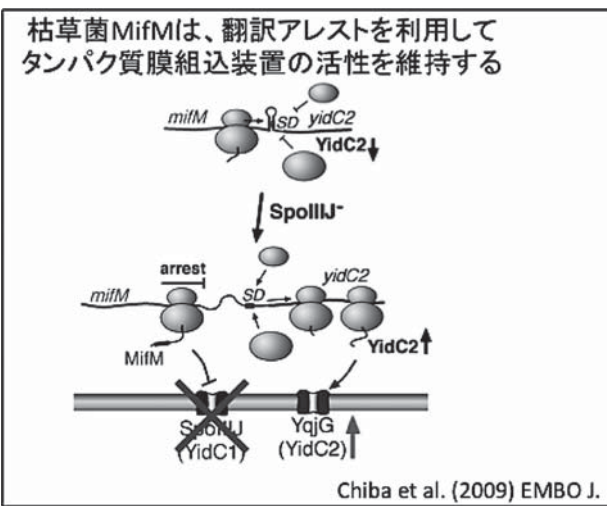
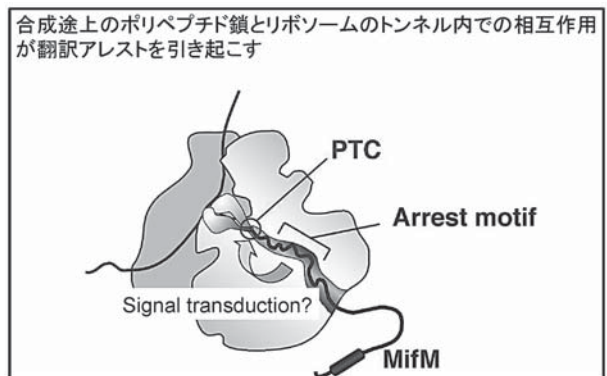


るとアレスト解除（リボソームのペプチド結合形成活性の復活）が起こることが、他の研究者によって示されたが、物理力によるアレスト解除は新生鎖の特定の領域に及ぼされる必要があり、本来のSecMにおける膜透過と共役したアレスト解除の実体は不明であり、今回発見した配列の役割が注目される。

一方、枯草菌の MifM は膜貫通配列となる疎水性領域を N 末端にもち、YidC 経路によって膜に挿入される。枯草菌に存在する二つの YidC 因子のうち、SpoIIIJ が主要な因子として働いているが、SpoIIIJ の活性が低下すると、第 2 の因子である YidC2 が誘導されて働く。MifM は YidC 経路の活性をモニターして、活性低下時に YidC2 の翻訳を誘導するモニター基質であり、*yidC2* 遺伝子の上流 ORF によってコードされる。MifM の C 末端近くにはリボソームトンネルと相互作用することによって自らの翻訳伸長アレストを引き起こすアレスト配列がある。この伸長アレストは連続した 4 つのコドンで複数回繰り返されることを明らかにした (11)。この間、立ち止まったリボソームによって mRNA の二次構造がほぐれ、下流遺伝子 *yidC2* の翻訳が可能となる。アレストの時間が長いほど YidC2 の発現量が上昇するが、アレ

ストは MifM 合成途上鎖が SpoIIIJ による膜挿入反応を受けると解除されるため、SpoIIIJ 活性と YidC2 発現量が逆相関を示す。このフィードバック機構を実験ツールとして利用すると、直接的な測定が困難な細胞内の SpoIIIJ (YidC) の活性を、LacZ 酵素活性から容易に、かつ定量的に見積もることができる。このようなレポーターである *mifM-yidC2-lacZ* を活用して、YidC タンパク質の構造と機能の詳細な解析を進めている。東京大学濡木研究室、奈良先端科学技術大学院大学塚崎研究室などとの共同研究により、新たに決定された YidC の結晶構造に基づく機能解析を行ったことは既に記した。

タンパク質の膜挿入装置 YidC2 の発現制御を行う枯草菌のアレストペプチド MifM の翻訳アレストにおいては、連続した 4ヶ所のペプチド転移反応が抑制されるが、これは、アレスト配列

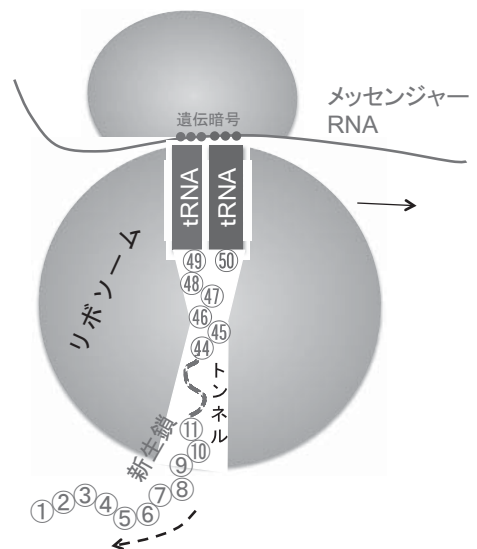


が種特異性の高い方式でリボソームと相互作用することによって引き起こされることを見出した (12)。さらにミュンヘン大学の Daniel Wilson 博士等との共同研究により、低温電子顕微鏡を用いた構造決定を行い、アレストを起こす新生鎖とリボソームの相互作用と種特異性の構造的基盤を明らかにし、同時に種特異性の決定に関与するリボソームタンパク質 L22 のアミノ酸残基を同定した (13)。MifM 合成途上鎖の N 末端にあり、膜を貫通することとなる疎水性配列が YidC 膜挿入装置のセンサーとして機能し、膜挿入過程に参加することと共役して翻訳アレストが解除されることが知られていたが、この翻訳解除は枯草菌がもつ二種類の YidC 膜挿入装置のいずれによっても起こり得ることを見出した (14)。すなわち、MifM は枯草菌細胞における YidC 経路の全活性をモニターするモニター基質である。一方、MifM のセンサー部位を分泌タンパク質のシグナル配列によって置き換えると、MifM の翻訳アレストは Sec 膜透過経路によって解除されるようになった。このように、本来膜挿入活性のモニターである MifM をタンパク質分泌モニターに転換させることに成功した (12)。この実験から、アレスト配列とセンサー部位は独立の機能ユニットであり、それらの組み合わせにより、タンパク質局在化経路のモニター機構が進化したものと考えられた。

(3) 細胞に於ける合成途上鎖 (polypeptidyl-tRNA) の解析

SecM や MifM の研究結果は、いくつかの新たな概念をもたらした。(i) 翻訳伸長は一定のスピードで起こるわけではなく、極端な場合には一時停止を起こすことがある。(ii) 合成途上ポリペプチド鎖 (“産物”) はリボソームのトンネル部分や活性中心部分 (“生産工場”) と相互作用することがある。逆に言うと、リボソームは、常に産物である合成途上ポリペプチドのアミノ酸配列を吟味している。この相互作用に応じてペプチド転移反応の速度が制御される。(iii) 翻訳伸長速度は、合成途上鎖の動態によって制御されることがある。合成途上鎖に働きかける物理力が新生鎖-リボソーム相互作用を変化させることがこの制御のきっかけになると現在考えられている。(iv) 蛋白質機能は合成が完了してから発揮されるとは限らず、合成途上で働くポリペプチドが存在する。

翻って一般的に、リボソームにおけるポリペプチド鎖伸長スピードが一定でないことは、タンパク質が局在化、フォールディング、修飾などの成熟過程を的確に起こすために必要なものかもしれない。たとえば、フォールディングが co-translational

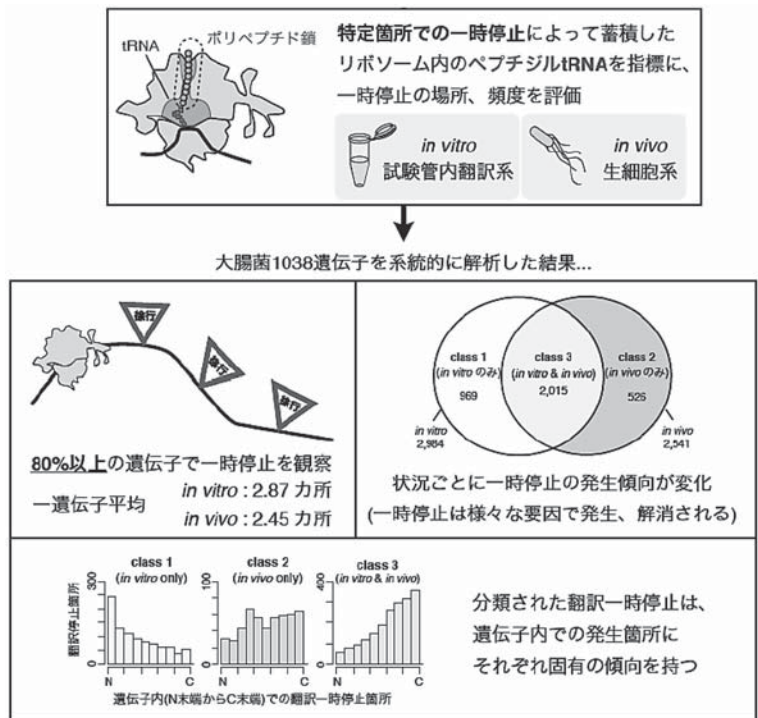


合成途上のタンパク質(赤)はtRNAに繋がれて、一部(アミノ酸約40個分)はリボソームのトンネルに収容されている。番号はアミノ酸を示す。図は、49番目まで合成が進んだ状態を示す。次に起こることは、49番の次に50番を繋げる反応である。次いで、リボソームが1遺伝暗号の分、矢印の方向に進行する。通常、数百個のアミノ酸が一つの完成タンパク質を作ることが多い。

に起こり得ることは明らかであり、伸長速度にブレーキがかかるとフォールディングに必要な時間が確保できるかもしれない。タンパク質の構造形成やアセンブリーが効率よく起こるために、翻訳伸長スピードが適切に制御されて変動することが寄与するという考えが成り立つ。逆に、翻訳途上鎖がフォールディングを起こすと、物理力が発生して伸長スピードが影響される可能性が SecM や MifM の研究から考えられる。フォールディングとポリペプチド伸長の間にポジティブフィードバックループが形成される可能性である。翻訳伸長の速度はコドン使用などの mRNA 側の要因によっても影響されることがわかっており、フォールディングへの影響という文脈で捉えることが可能である。

従来、合成途上鎖は研究対象として本格的に取りあげられることがなかったが、意識して新生鎖の挙動を調べていくことが、今後重要になってくるものと考えられる。翻訳伸長の真の姿を極めることにより、セントラルドグマによる遺伝情報の発現の理解に新たな視点が導入されるものと期待される。近年、翻訳伸長の全体像を鳥瞰する ribosome profiling という新たな実験方法が盛んに用いられるようになった (15)。この方法は翻訳過程を一塩基の解像度で解析できるという大きな利点をもつが、一方では、翻訳の過程そのものを間接的にしか捉えていないという問題点がある。我々は、翻訳中間体 (polypeptidyl-tRNA) がエステル共有結合で結合した tRNA を有するという特徴を利用して、それらを直接観察する手法を開発して、翻訳過程の解析に使った。細胞の全タンパク質を中性 pH の SDS-PAGE で分離すると、その中に含まれる合成途上鎖はインタクトな polypeptidyl-tRNA として泳動される。ゲルのレーンを切り出して弱アルカリ性高温でインキュベートするとペプチドと tRNA とを結ぶエステル結合が

切れる。これを 2 次元目のゲルの上端に横たえて泳動する。タンパク質一般は 1 次元目と 2 次元目で移動度が変わらないため、対角線上に並ぶ。Polypeptidyl-tRNA の場合は、tRNA が存在するため 1 次元目の移動度が単純ポリペプチドに比べて約 18 kDa 相当分遅れる。tRNA のサイズがほぼ均一のため、この遅延は全ての合成途上鎖に関して一様であり、それが失われた 2 次元目では一



様にその分だけ移動が昂進する。従って、合成途上鎖の polypeptide 部分が対角線の下側にラインを形成して並ぶ。このようにして、合成途上にあるポリペプチド鎖を選択的に観察することが可能となり、我々は、細胞の合成途上新生鎖の集合を nascentome と呼ぶことを提唱した (16)。この方法を用いて終止コドンを欠く異常な mRNA の空回り翻訳が大腸菌において高頻度で起こっているが、2種類のリボソーム救援機構によって処理されていることを示した (16)。

さらに、個別のタンパク質毎に翻訳中間体をプロファイリングするため、N末端に His₆ タグを有する大腸菌遺伝子クローンライブラリー (ASKA clone) (17) を用いて、合成途上鎖を遺伝子毎に検出することに成功し、さらに網羅解析に適するよう、一次元の泳動において RNase 感受性のバンドに注目する手法を開発した。この方法によって大腸菌遺伝子の翻訳伸長過程を系統的かつ直接的に in vivo および in vitro でプロファイル化する作業 (iNP = integrated in vivo and in vitro nascent chain profiling) を進め、翻訳伸長の一時停止 (pausing) が、驚くべき多数の遺伝子で起こっていることを見出した (18)。大腸菌ゲノムの 1/4 に相当する 1038 個の遺伝子の翻訳過程の詳細像を網羅解析した結果、大部分 (80% 以上) の遺伝子が、1回~複数回の停滞を伴って翻訳されることが明らかになったのである。一時停止は、in vitro のみで起こるもの、in vivo のみで起こるもの、両方で起こるものに大別され、膜タンパク質と細胞質タンパク質で異なる性質の停滞が起こる傾向や、自発的フォールディングの能力との相関が観察された。翻訳の過程では、広範かつ多様な様式の一時的停止が起こることが明らかになった。このことから、機能的タンパク質の形成は翻訳の緩急によっても支えられているとの考えが強く支持されるに至った。

文献

1. Nakatogawa, H., and Ito, K. (2001) Secretion monitor, SecM, undergoes self-translation arrest in the cytosol. *Mol. Cell.* **7**, 185-192
2. Chiba, S., Lamsa, A., and Pogliano, K. (2009) A ribosome-nascent chain sensor of membrane protein biogenesis in *Bacillus subtilis*. *EMBO J.* **28**, 3461-3475
3. Ishii, E., Chiba, S., Hashimoto, N., Kojima, S., Homma, M., Ito, K., Akiyama, Y., and Mori, H. (2015) Nascent chain-monitored remodeling of the Sec machinery for salinity adaptation of marine bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **112**, E5513-E5522
4. Tenson, T., and Ehrenberg, M. (2002) Regulatory nascent peptides in the ribosomal tunnel. *Cell.* **108**, 591-594
5. Ito, K., and Chiba, S. (2013) Arrest peptides: *Cis*-acting modulators of translation. *Annu. Rev. Biochem.* **82**, 171-202
6. Goldman, D. H., Kaiser, C. M., Milin, A., Righini, M., Tinoco, I., and Bustamante, C. (2015) Mechanical force releases nascent chain-mediated ribosome arrest in vitro and in vivo. *Science* **348**, 457-460
7. Tsukazaki, T., Mori, H., Echizen, Y., Ishitani, R., Fukai, S., Tanaka, T., Perederina, A., Vassilyev, D. G., Kohno, T., Maturana, A. D., Ito, K., and Nureki, O. (2011) Structure and function of a membrane component SecDF that enhances protein export. *Nature.* **474**, 235-238
8. Kumazaki, K., Chiba, S., Takemoto, M., Furukawa, A., Nishiyama, K., Sugano, Y., Mori, T., Dohmae, N.,

- Hirata, K., Nakada-Nakura, Y., Maturana, A. D., Tanaka, Y., Mori, H., Sugita, Y., Arisaka, F., Ito, K., Ishitani, R., Tsukazaki, T., and Nureki, O. (2014) Structural basis of Sec-independent membrane protein insertion by YidC. *Nature*. **509**, 516-20
9. Shimokawa-Chiba, N., Kumazaki, K., Tsukazaki, T., Nureki, O., Ito, K., and Chiba, S. (2015) Hydrophilic microenvironment required for the channel-independent insertase function of YidC protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **112**, 5063-5068
 10. Nakamori, K., Chiba, S., and Ito, K. (2014) Identification of a SecM segment required for export-coupled release from elongation arrest. *FEBS Lett.* **588**, 3098-3103
 11. Chiba, S., and Ito, K. (2012) Multisite ribosomal stalling: A unique mode of regulatory nascent chain action revealed for MifM. *Mol. Cell.* **47**, 863-872
 12. Chiba, S., Kanamori, T., Ueda, T., Akiyama, Y., Pogliano, K., and Ito, K. (2011) Recruitment of a species-specific translational arrest module to monitor different cellular processes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 6073-6078
 13. Sohmen, D., Chiba, S., Shimokawa-Chiba, N., Innis, C. A., Berninghausen, O., Beckmann, R., Ito, K., and Wilson, D. N. (2015) Structure of the *Bacillus subtilis* 70S ribosome reveals the basis for species-specific stalling. *Nat. Commun.* **6**, 6941
 14. Chiba, S., and Ito, K. (2015) MifM monitors total YidC activities of *Bacillus subtilis*, including that of YidC2, the target of regulation. *J. Bacteriol.* **197**, 99-107
 15. Ingolia, N. T., Ghaemmaghami, S., Newman, J. R. S., and Weissman, J. S. (2009) Genome-wide analysis in vivo of translation with nucleotide resolution using ribosome profiling. *Science* **324**, 218-223
 16. Ito, K., Chadani, Y., Nakamori, K., Chiba, S., Akiyama, Y., and Abo, T. (2011) Nascentome analysis uncovers futile protein synthesis in *Escherichia coli*. *PLoS One*. **6**, e28413
 17. Kitagawa, M., Ara, T., Arifuzzaman, M., Ioka-Nakamichi, T., Inamoto, E., Toyonaga, H., and Mori, H. (2005) Complete set of ORF clones of *Escherichia coli* ASKA library (A complete set of *E. coli* K-12 ORF archive): unique resources for biological research. *DNA Res.* **12**, 291-299
 18. Chadani, Y., Niwa, T., Chiba, S., Taguchi, H., and Ito, K. (2016) Integrated in vivo and in vitro nascent chain profiling reveals widespread translational pausing. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **113**, E829-E838

転写からタンパク質分解までの総合的調節のナノバイオロジー

嶋本伸雄, 中山秀喜

タンパク質の品質管理において、最も危機的な状況の1つは、栄養枯渇等によって、アミノ酸を初めとするタンパク質合成に必要な材料や、必要な化学修飾の材料が不足したときである。このような危機的状況での調節機構の研究は、ここの遺伝子の発現調節研究で、機構が推定されることはあっても、全体の調節ネットワークを念頭に置いた鳥瞰的研究はほとんどなされていない。このような未知の機構が自然淘汰で選別されているはずの腸内細菌は、栄養摂取機構を発達させているものの、それらの研究でも限定的なものとなっている。そこで我々は、もっとも知見の多い腸内細菌大腸菌を用いて、定常期と死滅期のタンパク質品質管理機構に焦点を絞り、機構の解析をおこなった。

大腸菌の栄養枯渇下の遺伝子発現調節には、stringent control が最も良く研究されている。栄養枯渇により、アミノ酸濃度が低下し、アミノアシル化される tRNA が減少すると、アミノアシル化され

ていない tRNA がリボソームに結合し、RelA というリボソームに結合する酵素が ppGpp というヌクレオチドを合成する。このシグナル分子は、プライマー RNA を合成する DnaG を阻害し DNA 複製を停止させる。最も総合的な応答は転写であり、RNA polymerase に結合して、増殖時に多く発現する遺伝子の発現を抑制し、アミノ酸合成系の遺伝子の発現を促進する (文献 1, 2)。この stringent control は、増殖期から定常期への切替を行っていると考えられていて、可逆的であることから大腸菌の生存やタンパク質品質管理には直接関係していない。

タンパク質品質管理に関係していることが明らかになっているのは、tmRNA という ala-tRNA 類似分子で、リボソームの aminoacyl tRNA 結合サイトである A site に結合すると、mRNA を切断して自身を mRNA として、翻訳途中のペプチドに、ANDENYAA というタグ配列をつけて翻訳を終了させる。この *ssrA* タグ配列を持つタンパク質は、ClpXP, ClpAP, Lon, HslUV などの ATP 依存プロテアーゼ (AAA+protease) で短いペプチドに分解されることが知られている。この分解は、不良タンパク質の分解により、アミノ酸を再生して、必要なタンパク質を合成する protein turnover だと考えられている。この protein turnover の最大の基質は、大腸菌の乾燥総重量の 30% を占めるリボソームであることは明かである。そこで私達は、tmRNA 遺伝子 *ssrA* と AAA+protease の遺伝子の遺伝学的関係を求め、定常期と死滅期のリボソームの個数と存在様式を観察して、protein turnover というタンパク質品質管理現象の機構を解析した。

I RMF の分解による調節と tmRNA との関係

RMF はリボソームの休眠状態と言われる 100S リボソームの形成に必須の因子で、定常期の初期に時間的に鋭い立ち上がりがあるとされている。そのような調節は、ppGpp 等による転写調節のパターンでは説明できないため、post-translational な分解により調節されている可能性がある。そのために、まず生理的条件下で RMF を低レベルに押さえ込んでいる protease を、RMF-GFP の蛍光を指標として、トランスポゾーム法で探索したところ、Lon AAA+protease が検出された (図 1)。

一般に、酵素と基質の関係は特異的とされるが、AAA+proteases の基質特異性は簡単に予想できるようなものは無い。RMF-GFP を高発現させると、主な分解酵素 Lon 以外の ClpXP, ClpAP, HslUV 等の AAA+protease でも有意に分解されていることが発見された。さらに、GFP-H₆ のみを高発現させた細胞では、tmRNA を欠損させると、GFP が分解される現象が観測された (図 2)。このことは、*ssrA*-tag を持つタンパク質を基質とする ClpXP, ClpAP, Lon が、基質特異性の低

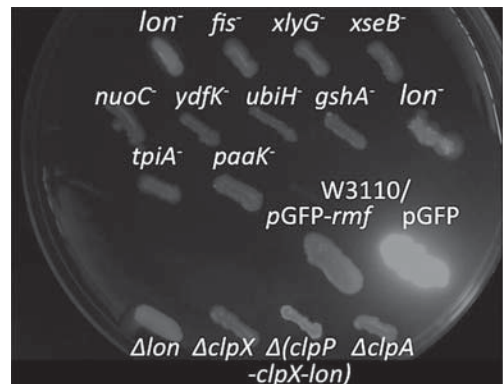


図 1. RMF-GFP 発現菌に trans-poson を導入して蛍光が増加した遺伝子欠損の二次スクリーニング

いとおもわれる GFP-H₆ を分解することを示している。つまり、これらの AAA+proteases の基質選択性は甘く、高濃度存在すれば、特異性の弱い基質も分解する。また、ある酵素の特異的基質と同定されていても、濃度が高くなれば他の酵素によって分解されることを示している。つまり、RMF が普段 Lon で低レベルに保たれていても、共に Lon の特異的基質である

2 tmRNA 遺伝子と AAA+protease 遺伝子との合成効果

細胞の生存は、いくつかの遺伝子の発現で促進される。複製の促進因子や、活性酸素を消滅させる因子が含まれ、survival facto^es とされる。また、複製の阻害因子や、活性

酸素を発生させる因子は killing factors とされ、過剰発現すると細胞死が誘導される。これらは生死制御因子である。tmRNA 欠損は、翻訳を pause させ、翻訳のレベルを減少させ、は生死制御因子の発現を制御しているであろう。AAA+protease、主要シャペロン欠損は、生死制御因子の分解や構造形成を変化させる。このことは、生存にとって有利か不利かは自明でないが、生死を分ける可能性を持つ。様々な原因で細胞死が誘導されることから、生死の制御因子は複数有り、分業していると考えられている。tmRNA は、アミノ酸枯渇下のタンパク質品質管理に中心的役割を果たしていると考えられているが、遺伝子を破壊しても致命的で無く、コロニーが小さくなる程度の影響しか無い。ここで、他の遺伝子欠損と、合成致死になることを期待して、AAA+protease や主要シャペロン欠損との合成効果を検討した。合成致死の検出は、negative selection であり、通常の遺伝学手法では、確実な結論とならない。また、ClpXP 等の遺伝子を削除すると、遺伝子変異をおこす確率が飛躍的に上昇し、相補変異と生存を混同する誤った結論を導きやすい。従って我々は、各種欠損株の tmRNA 遺伝子を染色体からプラスミドに移動させ (文献 3)、このプラスミドの複製オリジンに pSC101 の ts オリジンを採用し、32°C と 42°C のプレートにまいて得られる CFU を定量的に比較して結論を得た。通常の 37°C での測定とは異なるが、合成効果の有無を決定する精度は高いからである。

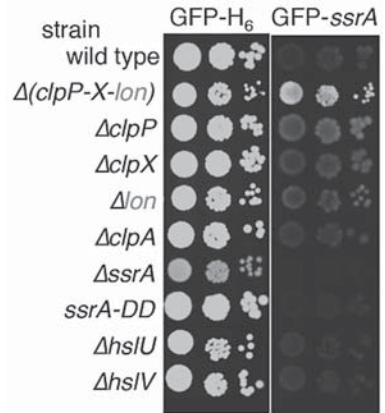


図 2 各遺伝子欠損菌の GFP-His₆ と GFP-ssrA の発現量

表 1 tmRNA 欠損と合成効果のある遺伝子欠損

Gene	Synthetic Effect	Ratio of CFU at 30°C to that at 42°C
clpA	++	1,000
hslU	++	1,000
hslV	++	1,000
htpG	++	1,000
clpX-clpP-lon	+	30
clpB	-	1
prc	-	0.1

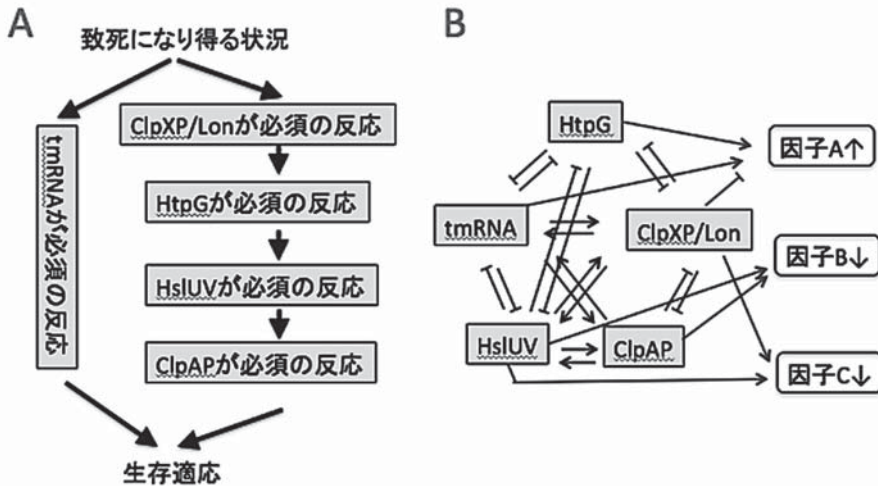


図3 $\Delta tmRNA$ との合成致死の解釈 A. 教科書的解釈例 B. 遺伝子間に相互作用があるときは、複数の生死制御因子 (\square)をもつネットワーク(\rightarrow 促進 \dashv 阻害)と解釈できる

結果は驚くべきことに、tmRNA と遺伝子欠損の合成効果を示すのは、数多く有った (表 1)。

教科書的に合成致死を解釈すると、生存に必要なステップが数多くあり、その各々が、tmRNA が必要な反応と合成効果を持つ遺伝子が必要な反応が並列していることになる。

合成致死の組み合わせ ($\Delta tmRNA \Delta clpA$, $\Delta tmRNA \Delta hslU$, $\Delta tmRNA \Delta hslV$, $\Delta tmRNA \Delta htpG$, $\Delta tmRNA \Delta clpX \Delta clpP \Delta lon$) においては、翻訳レベルが下がった時、あるいは *ssrA*-tag を持つ protease 基質の増加時に、ClpAP, HslUV, HtpG, ClpXP および Lon の欠損が致死で有ることを意味すると解釈するのが自然であろう。ただし、 $\Delta tmRNA$ が翻訳レベルの一般的低下では無く、特定の因子の増減に関わって居る可能性を否定するものではないが。

一般に、ある遺伝子が複数の遺伝子と合成致死を示すならば、生存の維持は、複数のステップに分離される。ただし、複数の遺伝子の機能が独立している、という条件が必要である (図 3A)。しかし、後述するように、ClpAP, HslUV, HtpG, ClpXP および Lon は、互いに関係しており、独立では無い。従って、シャペロンと AAA+proteases が構成するネットワークの恒常性が、通常は安定していて、survive and killing factors が生存に適する範囲内に保たれる。しかし、tmRNA 欠損により翻訳レベルが下がったり、protease 基質の増加時には、不安定化して、survive and killing factors のバランスが崩れて、死滅するというモデルが得られる (図 3B)。

3. リボソームの分解と protein turnover

定常期の $E. coli$ のリボソームの特徴は、翻訳活性を持たない 70S の二量体 100S リボソームの一過

的形成である。時間的に急激に形成されること、形成には RMF と HPF が必要で 70S への解離には YfiA が必要であることが知られているが、その形成と解離が、リボソームの分解や生死と同期しているかは知られていない。

大腸菌の生死の index である CFU や、リボソームの形態や数の時間変化の定量的観測は出来ていない。それをするには、細胞増殖に依存しない蛍光プローブを開発する必要がある。われわれは、蛍光基の成熟が早く、退色が従来より二桁おそい、B-maggio という GFP を発明した (知財権 1)。この蛍光基は、大腸菌増殖の定常期と死滅期で成熟の度合いは変わらず、この時期のリボソームの増減や 100S 形成を忠実に反映する。さらに CFU の定量的測定法を改良して精度を上昇させ、CFU、CFU のアミノ酸添加効果、S10-GFP のペプチドの量、100S 形成の時間変化を測定したところ、次のことが明らかになった (文献 4)。

1. 100S 形成は定常期の前半でみられるだけで、細胞死の開始前に 100S 解離はおこる。
2. 100S 形成は、知られていたように、*rmf* と *hpf* の欠損株で無くなり、*yfiA* の欠損株ではより長期に起こるが、リボソーム分解は、3 つのどの欠損株でも、早い時期から開始され、定常期が無くなった。
3. 10S-GFP の分解中間体は蓄積せず、リボソームの分解中間体の蓄積も多くはみられず、リボソームは、一気に分解される。
4. 野生株では、死滅期のみアミノ酸枯渇が観測されたが、様々な欠損株では、早期に要求性がみられることがある。

このことから、100S の役割は、定常期を長くすることであり、またアミノ酸を定常期後期までするための分解を遅らせる kinetic trap と考えることが出来る。

本研究は私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「タンパク質の生成と管理」の助成を受けた。

参考文献

1. Shimamoto, N. Nanobiology of RNA Polymerase: Biological Consequence of Inhomogeneity in Reactant. *Chem. Rev.* 113, 8400-8422 (2013).
2. Imashimizu, M., Shimamoto, N., Oshima, T., and Kashlev, M. Transcription elongation: Heterogeneous tracking of RNA polymerase and its biological implications. *Transcription* 5, e282851-10 (2014).
3. Nakayama, H., and Shimamoto, N. Modern and simple construction of plasmid: Saving time and cost. *J. Microbiol.* 52, 891-897 (2014).
4. Shcherbakova, K., Nakayama, H., and Shimamoto, N. Role of 100S ribosomes in bacterial decay period. *Genes Cells* 20, 789-801 (2015).

知財権 1

中山秀喜, 高橋麻矢子, 嶋本伸雄 特許出願 新規蛍光タンパク質 出願番号: 特願 2013-246642 2013 年 11 月 28 日

ADP リボシル化毒素と基質タンパク質の複合体の構造生物学

津下英明, 鶴村俊治, 吉田徹

我々の研究室は、細菌の分泌する ADP リボシル化毒素を研究の主題として研究を行っている。イオタ毒素 (Ia) -アクチン複合体結晶構造は、このタイプの毒素では初めてのヒト基質タンパク質複合体である。2015 年、C3 exoenzyme とその基質 RhoA 複合体の結晶構造解析に成功した。細菌由来のモノ ADP リボシル化毒素はその基質の違いから、幾つかの種類に分類できる。この中でウェルシュ菌由来のモノ ADP リボシル化毒素である Ia は、アクチンの Arg177 を特異的に ADP リボシル化しアクチンを脱重合する。一方、ボツリヌス菌やセレウス菌が持つモノ ADP リボシル化毒素 C3 は、RhoA の Asn41 を ADP リボシル化することで間接的にアクチン細胞骨格に影響を与える。この 2 つの毒素はどちらも ARTC グループに属して、その構造は良く似ているが、修飾する基質タンパク質も修飾するアミノ酸も異なる。2 つの毒素の構造と機能は単体でそれぞれ研究されてきたが、その複合体の構造がわからないために基質認識機構と反応機構はまだよくわかっていなかった。我々のグループでは、これらの毒素と基質タンパク質複合体結晶構造解析を目的に長らく研究を行ってきた。2008 年に Ia-アクチンの複合体構造を明らかにし (文献 1)、2013 年には NAD⁺ 結合型 Ia-アクチンと Ia-ADP リボシル化アクチンの複合体結晶を作り分けることに成功し、反応の前と後での高分解能の構造を明らかにした。これから ADP リボシル化の反応機構として "strain-alleviation (緊張と緩和) モデル" を提唱した (文献 2, 3, 4)。更に 2015 年、長らくその複合体の構造解析が期待されてきた C3-RhoA の初めての複合体構造解析に成功した (文献 5, 6)。これらの複合体解析から得られた、モノ ADP リボシル化毒素の基質認識と ADP リボシル化の反応機構についてまとめる。

C3-RhoA 複合体の結晶構造解析

RhoA 特異的 ADP リボシル化酵素 C3 exoenzyme は RhoA の Asn41 を特異的に ADP リボシル化する毒素であり、1989 年に見出された。代表的な Rho ファミリー分子には RhoA, Rac1, Cdc42 があるが、C3 は RhoA のみを ADP リボシル化する。この特異性を利用して、Alan Hall (メモリアルスローンケタリングがんセンター) らは、RhoA がストレスファイバーと接着斑を、Rac1 が葉状仮足を、Cdc42 が糸状仮足を、それぞれ誘導することを見出した。このような生物学的に重要な知見をもたらした C3 の RhoA に対する特異性に、RhoA の研究者を含む多くの研究グループが興味を抱いてきたが、その相互作用と ADP リボシル化の機構はよくわかっていなかった。

最初に見つかったボツリヌス菌の C3 exoenzyme に続いて、現在 7 つの異なる種類の C3 が見出されている。ボツリヌス菌由来の C3bot1, C3bot2, *C.limosum* 由来の C3lim, 黄色ブドウ球菌由来の C3stau1, C3stau2, C3stau3 およびセレウス菌由来の C3cer がある。それぞれの C3 で Rho GTPase に対する特異性は少しずつ異なるが、C3cer は RhoA のみを修飾する。RhoA とよく似た small GTPase である Rac1, Cdc42 は RhoA で ADP リボシル化される Asn41 と同じ位置に Asn を持っているにもかかわらず C3 の基質とならない。我々はセレウス菌由来の C3 を用いて、GTP が結合した

RhoA (RhoA (GTP)) と C3 の複合体および, GDP が結合した RhoA (RhoA (GDP)) と C3 の複合体の結晶化に初めて成功し, その立体構造 (apo-C3-RhoA (GTP)) を決定した。さらに, これらの結晶を NADH を含む溶液にソーキングした後に X 線回折データを収集することで, NADH, RhoA, C3 の 3 者複合体の結晶構造 (NADH-C3-RhoA (GTP)) と NADH-C3-RhoA (GDP)) を明らかにした (図 1ABC)。

RhoA (GDP) と RhoA (GTP) の C3 による認識構造

RhoA のシグナル伝達スイッチとして機能する可変領域 (switch I と switch II) は RhoA (GDP) と RhoA (GTP) で大きく構造が異なることが知られていた。しかしながら, C3 が結合した複合体構造では C3-RhoA (GDP) および C3-RhoA (GTP) はどちらも同じ可変領域の構造をとる (switch I は単体の RhoA (GDP) と同じ, switch II は単体の RhoA (GTP) と同じ) (図 1D)。すなわち, C3 の結合によりこの部分の構造変化をおこし, その結果, RhoA (GDP) と RhoA (GTP) はどちらの状態でも ADP リボシル化される。

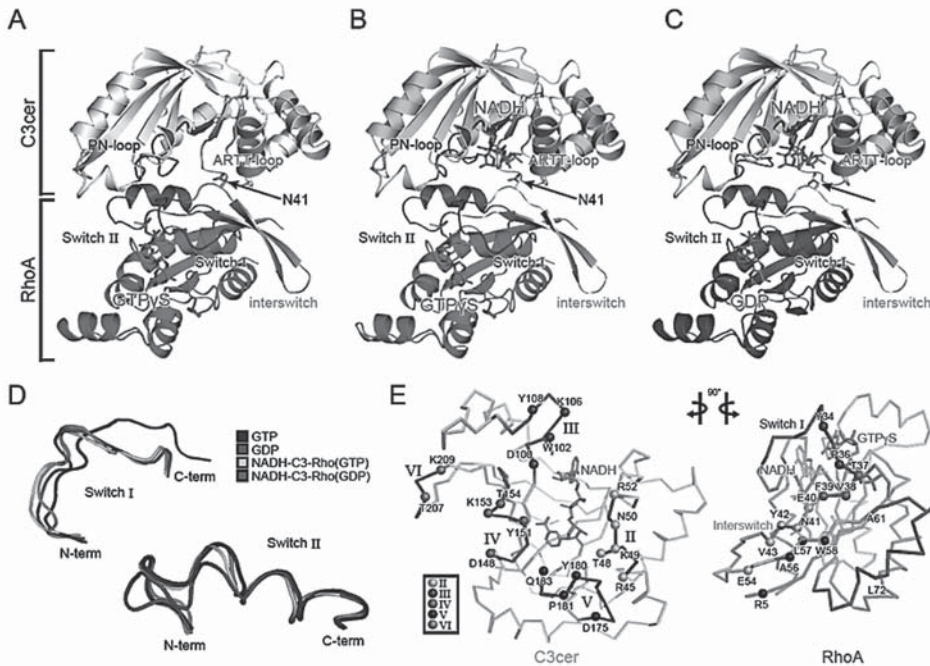


図 1 C3-RhoA 複合体の結晶構造とそれに基づく switch 領域の構造変化および結合面における相互作用領域 (A) apo-C3-RhoA (GTP), (B) NADH-C3-RhoA (GTP), (C) NADH-C3-RhoA (GDP), (D) 単体および複合体における RhoA の switch 領域のループ構造の比較, (E) C3-RhoA 結合面の見開図と相互作用領域

C3-RhoA の相互作用

図 1E に C3 と RhoA の相互作用を示す。C3 は RhoA を NAD 近傍の 4 つのループと少し離れた 1 つのループ VI で認識する。これらのループは loop II (45-52: 活性部位 ループ), loop III (100-110: アデニンループ), loop IV (148-156: リン酸ニコチンアミドループ (PN-loop)), loop V (175-183: ADP リボシル化毒素ターントーンループ (ARTT-loop)), loop VI (206-209: NAD から離れた位置に存在するループ) である。RhoA 側から見ると, C3 で認識される部位は, シグナルによって構造の変わる switch I (28-38) と switch II (61-78) とその間に存在する inter switch 領域 (39-60) であった。

C3 はなぜ RhoA に対して特異的か

図 2A に small GTPase のアライメントとその結合領域を示す。switch II (61-78) 領域は, RhoA, Rac1, Cdc42 つで保存されており, その RhoA 特異性に関与していないと考えられた。switch I と inter switch で幾つかの保存されていないアミノ酸が特異性に関わっていると考え, RhoA でこれらのアミノ酸を変異させると大きく活性が下がった (図 2B)。一方基質とならない Cdc42 にこれらの 4 重変異を加えることにより, 良い基質とすることに成功した。重要な 4 つのアミノ酸は Trp58, Glu54, Glu40, Val43 であった (図 2C)。

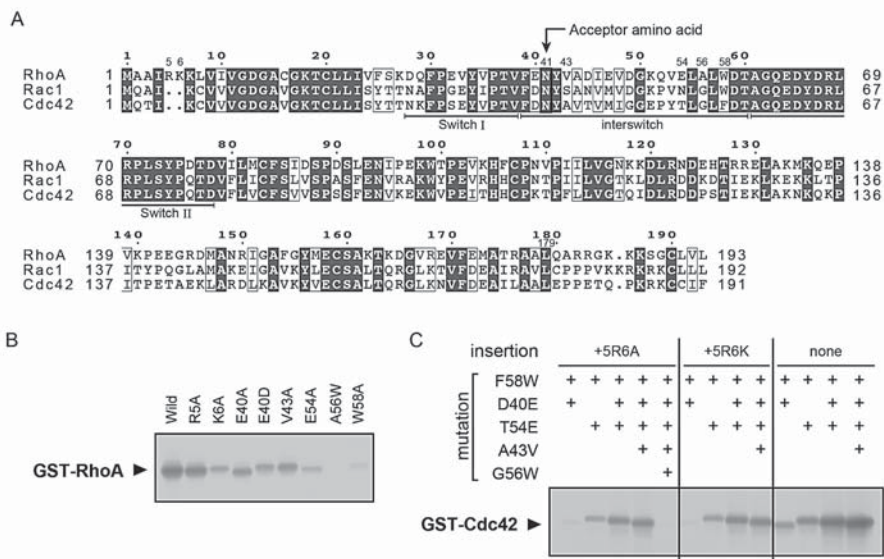


図 2 C3 の RhoA に対する特異性 (A) Rho GTPase のアミノ酸配列の比較, (B) C3 の RhoA 変異体に対する ADP リボシル化活性, (C) C3 の Cdc42 に対する ADP リボシル化活性

ARTTループがADPリボシル化される基質アミノ酸の特異性を決める

IaとC3はどちらも似た構造を持つADPリボシル化毒素であるが、その基質はアクチンのArg177とRhoAのAsn41である。毒素には共通したADP-Ribosylation Turn Turn loop (ARTT loop)があり、最初のターンに存在する疎水性側鎖が基質RhoAの認識をし、次のターンに存在するQXEのグルタミンが修飾されるRhoA Asn41の認識に関わりと予測されていた。一方IaではEXEであり、最初のグルタミン酸が修飾されるアクチンのArg177の認識に関わり、すなわち、修飾アミノ酸に選別は、このように行われていると予測されていたが、その実験的な証明はされていなかった。C3-RhoAの複合体構造は、Gln (QXE)がRhoA Asn41と水素結合を形成して、特異的な認識をし、さらに、この近傍にNADHのNC1が存在していることを明らかにした(図3)。また最初のターンに存在する疎水性側鎖Tyr180がRhoAの疎水性領域に結合している様子も初めて明らかにした。この関係はADPリボシル化にとって理想的な関係であると考えられる(3) RhoAのC3による認識領域がわかったことで、この点変異体を作り、活性消失を確認した。また、基質とはならないCdc42 (RhoAと似たsmall GTPase)の点変異体を作り、4重変異体によりADPリボシル化の良い基質することに成功した。

今後の研究で明らかにすべき点

既に解析に成功した、Ia-アクチンでは、ADPリボシル化反応の前と後での複合体結晶構造を明らかにした。今後明らかにした複合体構造をIa-アクチンとC3-RhoAで詳細に比べることにより、さらなるADPリボシル化毒素の基質認識と反応機構の共通の知見がわかってくると考えている(図4)。Ia-アクチンでは、提唱されている「ARTTループがADPリボシル化される基質アミノ酸の特異性を決める」すなわちEXEの前者のグルタミン酸がアクチンのArg177を認識する構造は得られていない。また、Arg177がのるアクチンのβシート部分は構造が固く、このArgが動くことは考えにくい。考えられるのはIaのEXEが反応の過程で動き、この認識に働いているのかもしれない。今後、時分割での結晶構造解析を更に進めることで、そのような過渡的状態でのスナップショットが得られるかもしれないと考えている。

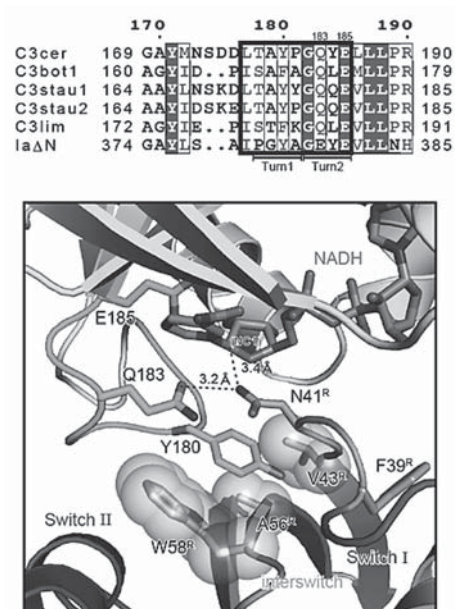


図3 ARTTループとその周辺環境および相互作用

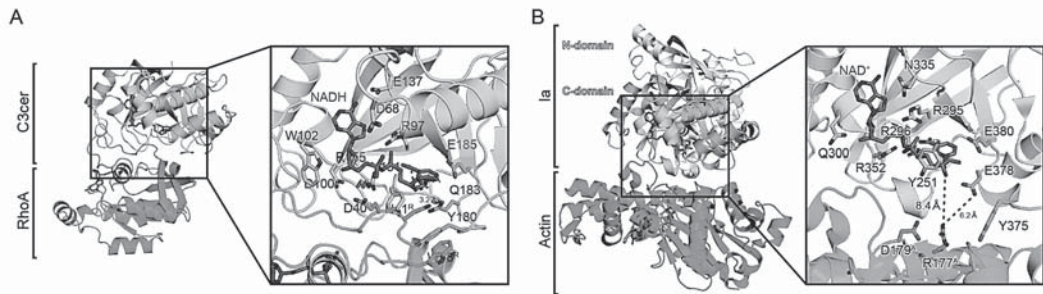


図4 C3-RhoA (A) と Ia-actin (B) 複合体構造の比較, 拡大図はそれぞれの NAD (H) および標的アミノ酸周辺を示す

謝辞

本研究を進めるにあたり, 細菌毒素研究の共同研究を続けている, 徳島文理大学 薬学部 永浜政博教授, 櫻井純教授 および 新潟大学 歯学部 小田真隆准教授に感謝の意を表す。

本研究は私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「タンパク質の生成と管理」および新学術領域研究「細胞シグナリング複合体によるシグナル検知・伝達・応答の構造的基礎」(研究課題番号: 23121529, 25121733) およびの助成を受けた。

また C3-RhoA 複合体結晶の X 線回折データ測定は私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「タンパク質の生成と管理」で整備した, 単結晶 X 線回折装置 (RIGAKU R-AXIS4 (MICRO7HFM)) が使用された。

参考文献

- (1) [Tsuge H.](#), Nagahama M., Oda M., Iwamoto S., Utsunomiya H., Marquez VE., Katunuma N., Nishizawa M. and Sakurai J.
Structural basis of actin recognition and arginine ADP-ribosylation by *Clostridium perfringens* iota toxin.
Proc Natl Acad Sci U S A. 105 (21):7399-404. (2008)
- (2) [Tsurumura T.](#), Qiu H., Tsumori Y., Oda M., Nagahama M., Sakurai J. and [Tsuge H.](#)
Arginine ADP-ribosylation mechanism based on structural snapshots of iota-toxin and actin complex.
Proc Natl Acad Sci U.S.A. 110 (11):4267-4272. (2013)
- (3) [Tsuge H.](#) and [Tsurumura T.](#)
Reaction Mechanism of Mono-ADP-Ribosyltransferase Based on Structures of the Complex of Enzyme and Substrate Protein.
Curr Top Microbiol Immunol. 384:69-87. (2015)
- (4) 鶴村俊治, 津下英明
修飾酵素と基質タンパク質の反応前後における複合体結晶の作製と構造に基づく反応機構—ウエルシュ菌イオタ毒素 Ia によるアクチンの修飾機構—
日本放射光学会誌 Vo. 27, No. 5, p233-240. (2014)

- (5) Toda A., Tsurumura T., Yoshida T., Tsumori Y. and Tsuge H.
Rho GTPase Recognition by C3 Exoenzyme Based on C3-RhoA Complex Structure.
J Biol Chem. 7;290 (32):19423-32. (2015)
- (6) Tsuge H., Yoshida T. and Tsurumura T.
Conformational plasticity is crucial for C3-RhoA complex formation by ARTT-loop.
Pathog Dis. 73 (9) (2015)

Study reports from Structural Biology Research Center

Masasuke YOSHIDA

Abstract

Five research groups (Masasuke Yoshida, Kazuhiro Nagata, Koreaki Ito, Nobuo Shimamoto, Hideaki Tsuge) constitute Structural Biology Research Center and are studying the mechanism of “protein synthesis and quality control”. Research period is five years from 2011 to 2015. We summarize and report each research project. We published 76 papers in international journals.

Keywords : chaperon, quality control in endoplasmic reticulum, nascentome, tmRNA, X-ray crystallography