

構造生物学研究センター活動報告

平成 27 年 4 月 21 日受付

吉 田 賢 右 *

要 旨

構造生物学研究センターは、以下にまとめる 5 つの研究グループによって構成され、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いる。

- 伊藤維昭 グループ (1) タンパク質膜組込装置 YidC の反応機構の解明
 (2) SecM の翻訳アレスト解除に重要な新規エレメントの同定
- 嶋本伸雄 グループ (1) 大腸菌の生存戦略のナノバイオロジー：100S リボソームの新しい役割
 (2) 最も効率が高くローコストのクローニング技術
- 津下英明 グループ (1) ADP リボシル化された RhoA の結晶構造
 (2) *Aeromonas sobria* 由来のセリンプロテアーゼ ASP とそのシャペロンの構造と生化学研究
- 永田和宏 グループ (1) コラーゲン特異的分子シャペロン Hsp47 の機能解析
 (2) 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：小胞体恒常性維持の解明
 (3) 新規小胞体膜因子によるオートファジーの負の制御機構の解析
 (4) Moyamoya 病原因遺伝子 *mysterin* の機能
- 吉田賢右 グループ (1) 分子シャペロンの作用機構
 (2) ATP 合成酵素の作用機構

2014 年度は、これらの研究を進めて、計 22 報の論文を国際誌に発表をした。

キーワード：翻訳アレスト, 100S リボソーム, シャペロン, 小胞体におけるタンパク質品質管理, ATP 合成酵素

以下に 2014 年度の研究の詳細について報告する。

伊藤維昭 グループ

- (1) タンパク質膜組込装置 YidC の反応機構の解明

新生膜タンパク質が膜に組み込まれる過程で、基質となる膜タンパク質の親水的な細胞外領域が疎

* 京都産業大学研究機構

水的な細胞膜を透過し、反対側へと移行するためには、そのエネルギー的な障壁を乗り越えるための何らかの機構が必要である。タンパク質膜透過装置 Sec 複合体は、膜に新生ポリペプチド鎖の通り道であるチャンネル（孔）を形成することで、この問題を克服している。Sec 複合体とは別のタイプの膜組込装置である YidC もやはり、二量体を形成してチャンネル構造をとると提唱されていたが、共同研究先の東大・濡木理教授、奈良先端大・塚崎智也准教授らによって解かれた YidC の X 線結晶構造は、予想に反して、以前提唱されていた YidC の二量体チャンネルモデルとは相容れないものであった。すなわち、YidC は、膜貫通領域で、膜内に「溝」のような構造を作り、その溝は、細胞質側に大きく口を開けているものの、細胞外側に対しては閉じていた。これでは、仮に二量体を形成したとしても、膜を貫通するチャンネルを形成するのは難しいことが予想された。さらに、その溝の内側には親水性アミノ酸残基が多くあり、塩基性に偏っていた。一方、我々は以前、YidC の活性をモニタリングする因子として MifM を発見し、それを利用し、枯草菌細胞で、YidC によるタンパク質膜組込活性を簡便にアッセイするレポーター系を構築していた。そこで、この系を利用し、枯草菌 YidC ホモログ (SpoIIIJ)、および、基質膜タンパク質である MifM をターゲットとした変異解析を行った。その結果、YidC の親水的な溝の内部にある塩基性アミノ酸残基アルギニンと、基質の細胞外領域および膜内領域にある酸性残基の重要性を見出し、他の生化学的解析とも併せて、それらの中で生じるであろう静電的相互作用が、タンパク質の膜挿入の駆動力になっていることを提唱するに至った。

構造・生化学・遺伝学的解析を組み合わせたこの一連の共同研究は、YidC が、「チャンネルに依存しない新規の反応機構」を利用してタンパク質の膜組込を行っていることを示すこととなった。

(2) SecM の翻訳アレスト解除に重要な新規エレメントの同定

以前、伊藤らが見出した、大腸菌においてタンパク質の分泌活性をモニタリングする「働く翻訳途上鎖」である SecM は、C 末端付近の「アレストモチーフ」を介してリボソームと相互作用することで、翻訳アレストを起こす。その翻訳アレストは、SecM の N 末端にある分泌シグナルが、Sec 膜透過装置によって認識され、SecM が膜透過されると、おそらくはその時に生じる「引っ張り力」によって解除される事が示唆されていた。ところが、今回、アレストモチーフと分泌シグナルに挟まれた中央領域内に、翻訳アレスト解除に必要と思われる第 3 のエレメントが存在することが、SecM の変異解析から明らかとなった。本研究では、伊藤研大学院生・中森健太氏を中心となって実験を遂行した。

発表論文

- D. Sohmen, S. Chiba, N. Shimokawa-Chiba, A. Innis, O. Berninghausen, R. Beckmann, K. Ito, D. Wilson: Structure of the *Bacillus subtilis* 70S ribosome reveals the basis for species-specific stalling. *Nat. Commun.* 6,6941 doi: 10.1038/ncomms 7941 (2015)
- N. Shimokawa-Chiba, K. Kumazaki, T. Tsukazaki, O. Nureki, K. Ito, S. Chiba: A hydrophilic microenvironment required for the channel-independent insertase function of YidC. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 112, 5063-5068 (2015)

- *S. Chiba, K. Ito: MifM monitors total YidC activities of *Bacillus subtilis* including that of YidC2, the target of regulation. *J. Bacteriol.* 197, 99-107 (2015)
(*corresponding author)
- K. Nakamori, S. Chiba, K. Ito: Identification of a SecM segment required for export-coupled release from elongation arrest. *FEBS Lett.* (2014) 588, 3098-3103.
- *K. Kumazaki, *S. Chiba, M. Takemoto, A. Furukawa, K.I. Nishiyama, Y. Sugano, T. Mori, N. Dohmae, K. Hirata, Y. Nakada-Nakura, A.D. Maturana, Y. Tanaka, H. Mori, Y. Sugita, F. Arisaka, K. Ito, R. Ishitani, T. Tsukazaki, O. Nureki: Structural basis of Sec-independent membrane protein insertion by YidC. *Nature* (2014) 509, 516-520.
(* 同等貢献)

嶋本伸雄 グループ

(1) 大腸菌の生存戦略のナノバイオロジー：100S リボソームの新しい役割

大腸菌も他の生物と同様、培養し続けると死ぬ。このような死に抗して出来るだけ生存できたものが、現在生存している種である。しかし、この死/生存の機構は、全く研究されたことがない。多くの遺伝子の機能が関連する細胞生物学の複雑現象だからである。大腸菌では 2/3 の遺伝子の機能が推定出来る現在、我々は tmRNA の研究を手がかりにして、まず tmRNA 等 9 つの protease/ chaperon が必須であることが発見できた。驚いたことに、これらの致死性は、栄養レベルの 20 アミノ酸で相補された。従って、タンパク質分解によってアミノ酸が補われる protein turnover が役割をもつ可能性が示された (文献)。

リボソームはアミノ酸のソースとして細胞内で最大であり、定常期で RMF により 70S リボソームが 2 量体 90S を形成し、HPF が安定な 100S を形成する現象が知られている。しかし、この 100S は、protein turnover に関係するのかわ、関係するならばいつリボソームは分解するのか、リボソーム分解を促進するのか阻害するのか、リボソーム分解は inclusion body を経由するのかどうか、が不明であった。

そこで昨年発明した抗退色 GFP B maggio を染色体の *rpsJ* に protein fusion した株を上記新クロニング法で作製、各ステージでの存在形態を、アガロースゲル電気泳動、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動、SDS による inclusion body からの抽出、しょ糖密度勾配超遠心で分析し、生死の index である Colony Forming Unit と比較した。その結果、リボソームタンパク質は、リボソームとして原形質に存在するか、中間状態にとどまらずに速やかに分解されるかのどちらかで、inclusion body での蓄積は少なかった。また、100S 形成を阻害する RpsB-GFP 株、RpsJ-GFP Δ *rmf* 株、psJ-GFP Δ *hpf* 株では、リボソームはアガロース電気泳動では不均一な移動度を示し、分解かその前段階を示した。また、CFU の減少も早期に起こった。つまり、100S 形成はリボソームを保護し、100S の形成は生存を促進する。一方、100S の分解が阻害されている RpsJ-GFP Δ *yfiA* 株でも、同様な CFU の早期減少が観測されたので、100S 自体が生存を促進するのではなく、100S 形成と分解の適切なタイミングが生存を促進する。また 100S 形成の時間経過は、ppGpp による stringent control に

より形成され始めるが、最大は stringent control よりずっと遅い定常期後期の 18 時間であり、定常期が終了する 24 時間までには、完全に終了している。

これらの結果は、100S は定常期前半に起こるタンパク質の分解からリボソームを保護し、定常期後半に解離・分解して供給源としてアミノ酸のホメオスタシスを実現し、減衰期に備えるという機構を示している。

(2) 最も効率が高くローコストのクローニング技術

クローニングとプラスミド作成の方法は、ここ 40 年来、制限酵素による切断とリガーゼによる連結からほとんど進歩が無かった。非常に数多い改良法が発明されたが、効果が低かったり、手間が多すぎたり、高価で有ったり、必要な DNA 量が大きかったりして、従来法を変えるまでには至らなかった。ところが 2010 年以後、非常に大きな進歩があり、シームレスクローニングと呼ばれる、制限酵素を全く用いない方法が広がり、非常に安価で高効率を持つ方法も発明された。高価な酵素を多量に使う方法も、実際にはそれほど酵素を必要としないことが、我々や本学部の他研究室の協力で判明した。そこで、いくつかの方法をさらに発展させ、改良を行った。現在最も優れたプラスミド作製法は、1) fusion PCR, 2) Gibson Assembly 3) SLiCE であり、長短補い合う関係にある。1) は最も簡単であるが、予定通り行かないことがある。2) は、繰り返し配列があるときでも有効で、最も一般的で、高効率の方法である。3) は、他法で PCR が困難な場合に有効な高効率法である。

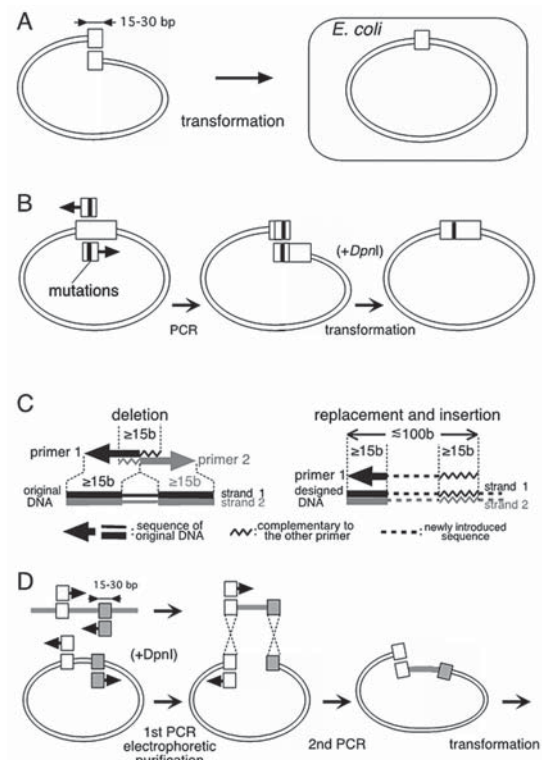


図1. リガーゼを用いない fusion PCR. A. 同一塩基配列をもつ線状 DNA を形質転換するだけで良い。B. Fusion PCR を利用した変異の導入。DpnI は大腸菌内で作られたベクターを切断してバックグラウンドを下げる。C. 様々な場合のプライマーの設計法 D. 長い DNA の挿入法。

発表論文

Nakayama, H., and Shimamoto, N. (2014). Modern and simple construction of plasmid: Saving time and cost. *J. Microbiol.* 52, 891-897.

嶋本伸雄, RNA ポリメラーゼの動きを理解する トピック 1 分子生物学, 原田慶恵, 石渡信一 (編) 化学同人

津下英明 グループ

(1) ADP リボシル化された RhoA の結晶構造

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長らく研究を行っている。イオタ毒素-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 (PNAS 2008, PNAS 2013)。さらに現在 C3 exoenzyme の結晶構造解析を進めている。C3 は RhoA のアスパラギン (Asn41) を特異的に ADP リボシル化することが知られている。1987 年に発見された C3 は、その特異性から Rho GTPase の機能を探るツールとして多くの生化学の研究室で使われ、RhoA, Rac1, Cdc42 の機能分担がわかってきた。Rho GTPase はその GTP 結合型と GDP 結合型で、switchI,II の構造が変化し、シグナル伝達スイッチとして働く。現在まで、C3 が Asn41 を修飾した ADP リボシル化 RhoA は、未修飾の RhoA と比べて大きな構造変化を伴うのかどうか、不明であった。昨年度の 4 回生 (江村) が、C3 が修飾した ADP リボシル化 RhoA の結晶構造解析を行い、その修飾された構造を高い分解能で明らかにした。結果は GTP, GDP 型ともに未修飾の構造と比べて大きな構造変化はなかった。ADP リボシル基は一部の電子密度は確認できたが、ゆらぎのために全体を見ることはできなかった。この研究により、「ADP リボシル化 RhoA は Guanine nucleotide exchange factor (GEF) や GDP-dissociation inhibitor (GDI) との結合に影響を及ぼすが、これは RhoA の switchI,II の構造変化によるものでなく、修飾 ADP リボシル基の直接の影響と考えられる」と結論した。この研究は、生命資源環境学科の卒業研究発表会で最優秀賞を受賞した (平成 26 年 2 月) (第 87 回日本生化学会年会ポスター発表)。

(2) *Aeromonas sobria* 由来のセリンプロテアーゼ ASP とそのシャペロンの構造と生化学研究

既知のセリンプロテアーゼは必ずその N 末端にプロ配列を持ち、これがプロ配列以降に続く触媒ドメインのフォールディングに必須の役割を担っている。その一方で ASP はプロ配列を持たず、その代わりに ORF2 という別のタンパク質がフォールディングに必須であることが示唆されていたが、その詳細なフォールディング機構は分かっていなかった。そこで我々はまず、ASP と ORF2 の複合体の構造を X 線結晶構造解析により決定した。その結果、ORF2 と ASP の結合様式は既知のセリンプロテアーゼとプロ配列の結合様式に非常に似ていることが明らかになった。さらに生化学実験により、ORF2 の N 末端、C 末端共に ASP のフォールディングに大きな影響を及ぼしていることを明らかにした。最終的に、ASP と ORF2 のように触媒ドメインとプロ配列に相当するドメインが別のタンパク質として発現されるセリンプロテアーゼはグラム陰性菌に広く存在し、新たなファミリーを形成していることを示した (JBC 論文投稿中)。

発表論文

Tsurumura T, Qiu H, Yoshida T, Tsumori Y, Tsuge H. Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of a surface mutant of the middle domain of PB2 from human influenza A (H1N1) virus. *Acta Crystallogr F*

Struct Biol Commun. 70 (Pt 1): 72-5. (2014)

Tsurumura T, Tsuge H. Substrate selectivity of bacterial monoacylglycerol lipase based on crystal structure. *J Struct Funct Genomics.* 15 (3): 83-9. (2014)

Tsuge H, 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. (2014)

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)

永田和宏 グループ

(1) コラーゲン特異的分子シャペロン Hsp47 の機能解析

肝硬変を代表とする線維化疾患は主要な細胞外マトリックスの一つであるコラーゲンの異常な蓄積を特徴とする。慢性的な線維化においては、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。今回、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 (K. Kawasaki et al., *J. Biol. Chem.*, 2015)。

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)。今回、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。今回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。

(2) 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。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 (R. Ushioda et al., *Science* 2008; M. Hagiwara et al. *Mol. Cell* 2011; R. Ushioda et al. *Mol. Biol. Cell* 2013)。

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受し、SERCA2 との複合体形成を調節していることを明らかにした (論文投稿準備中)。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。

また本年度から 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た。

(3) 新規小胞体膜因子によるオートファジーの負の制御機構の解析

オートファジーは細胞内の大規模分解系の一つであり、恒常的に細胞内に生じる不良タンパク質や細胞小器官のクリアランスに大きく寄与している。近年、オートファジー分解に必要な膜成分が小胞体とミトコンドリアのコンタクトサイト (MAM) から生じることが報告され、MAM がオートファジーにおいて重要な役割を持つことが明らかになってきた。我々は小胞体膜に局在する新規タンパク質をクローニングし、さらにそれが MAM に局在している結果を得た。また興味深いことに、この新規タンパク質の細胞内発現量を抑制するとオートファジーが亢進し、反対に発現量を増加させると、オートファジーが顕著に抑制された。さらに、この新規因子の機能ドメインは小胞体内腔側に位置している。これは、オートファジーの過程を MAM において負に制御し、かつ小胞体内腔側の環境がオートファジーを制御する上で重要な役割を果たしていることを強く示唆するものである。今後、この新規因子のさらなる機能解析を行うことで、オートファジーの制御における新たな小胞体の概念を提案していきたい。

(4) Moyamoya 病原因遺伝子 *mysterin* の機能

Moyamoya 病の原因遺伝子としてクローニングした *mysterin* は、分子量約 591kDa という巨大なタンパク質をコードしていた。しかも、この分子はリボソームに近い大きさの巨大オリゴマーを作り、ダイニンやプロテアソームに類似の ATP アーゼ型メカノエンザイムとして細胞内の物理的な過程に寄与しているであろうことを明らかにした (D. Morito et al., *Sci. Rep.* 2014)。また、ゼブラフィッシュを用いたノックダウン実験により、*mysterin* が血管ガイダンスや神経筋発生に必須であり、しかもその機能には *mysterin* のユビキチンリガーゼ活性や ATP アーゼ活性が重要であることを明らかにした (投稿中)。現在、さらに結合タンパク質探索や細胞内機能同定などを含めて、機能解析を行っている。

発表論文

- A. Kitamura, K. Nagata & M. Kinjo : Conformational analysis of misfolded protein aggregation by FRET and live-cell imaging techniques. *Int. J. Mol. Sci.* 16 (3): 6076-6092 (2015)
- K. Kawasaki, R. Ushioda, S. Ito, K. Ikeda, Y. Masago & K. Nagata: Deletion of the Collagen-specific Molecular Chaperone Hsp47 Causes Endoplasmic Reticulum Stress-mediated Apoptosis of Hepatic Stellate Cells. *J Biol Chem.* 290 (6): 3639-3646 (2015)
- E. Avezov, T. Konno, A. Zyryanova, W.Chen, R. Laine, A.Crespillo-Casado, E. Melo, R. Ushioda, K. Nagata, CF Kaminski, HP Harding & D Ron: Retarded PDI diffusion and a reductive shift in poise of the calcium depleted endoplasmic reticulum. *BMC Biol.* 13 (1): 2 (2015)
- 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 Reports* 24 (4): 4442 (2014)
- T. Kakugawa, S. Yokota, Y. Ishimatsu, T. Hayashi, S. Nakashima, S. Hara, N. Sakamoto, H. Kubota, M. Mine, Y. Matsuoka, H. Mukae, K. Nagata & S. Kohno: Serum heat shock protein 47 levels are elevated in acute interstitial pneumonia *BMC Pulmonary Medicine* 14: 48 (2014)
- Y. Honzawa, H. Nakase, M. Shiokawa, T. Yoshino, H. Imaeda, M. Matsuura, Y. Kodama, H. Ikeuchi, A. Andoh, Y. Sakai, K. Nagata, T. Chiba : Involvement of interleukin-17A-induced expression of heat shock protein 47 in intestinal fibrosis in Crohn's disease. *Gut* 63 (12): 1902-1912 (2014)
- T. Rammig, H. G. Hansen, K. Nagata, L. Ellgaard, C.Appenzeller-Herzog : GPx8 peroxidase prevents leakage of H2O2 from the endoplasmic reticulum *Free Radical Biol Med.* 70: 106-116 (2014)
- T. Olszak, J. F. Neves, C. M. Dowds, K. Baker, J. Glickman, N. O. Davidson, C-S. Lin, C. Jobin, S. Brand, K. Sotlar, K. Wada, K. Katayama, A. Nakajima, H. Mizuguchi, K. Kawasaki, K. Nagata, W. Müller, S.B. Snapper, S. Schreiber, A. Kaser, S. Zeissig & R. S. Blumberg : Protective mucosal immunity mediated by epithelial CD1d and IL-10. *Nature* 509: 497-502 (2014)
- A. Kitamura, N. Inada, H. Kubota, G. Matsumoto, M. Kinjo, R. I. Morimoto & K. Nagata: Dysregulation of the Proteasome Increases the Toxicity of ALS-linked Mutant SOD1. *Genes to Cells* 19 (3): 209-224 (2014)
- 潮田亮, 永田和宏 : レドックス制御による細胞内タンパク質の品質管理. 実験医学 (羊土社) Vol.32, No.14 2201-2207 (2014)

吉田賢右 グループ

(1) 分子シャペロンの作用機構

A) シャペロニン (GroEL-GroES) 空洞内の疎水性残基の役割

変性タンパク質はシャペロニン空洞内に閉じ込められてフォールディングする。これまで空洞内に閉じ込められた変性タンパク質は空洞と相互作用しないと想定されてきたが、実際には変性タンパク質はGroELサブユニット界面、およびGroEL-GroESサブユニット界面の疎水性残基と相互作用する (Motojima (2010) EMBO J)。シャペロニンによるタンパク質フォールディングにおける疎水性残基の役割を調べるため、シャペロニン空洞表面に露出する疎水性残基に注目して研究を行った。疎水性残基のうち、GroES (Y71), GroEL (Y203), GroEL (F281), あるいはGroEL (Y360) をシステムに変えると大腸菌の生育速度が低下した。これらの変異を2つ組み合わせることで大腸菌の生

育速度は大幅に低下した。一方, GroEL C 末端の疎水性領域を親水性にしても大腸菌の生育にほとんど影響を与えなかった。さらに代表的なシャペロニンの基質タンパク質についてフォールディング援助効果を比較したところ, GroEL (F281C/Y360C) 変異体ではフォールディング速度が著しく減少し, さらに空洞内に閉じ込められた変性タンパク質のほとんどが空洞内でフォールディングする前に空洞外に escape することがわかった。これらの結果から, シャペロニン空洞の疎水性残基には, 変性タンパク質を空洞内に留める効果と, フォールディングを促進する効果の 2 つがあることが示唆された (第 14 回日本蛋白質科学会年会ポスター発表)。

B) Hsp90 による Hsp70 シャペロンシステムの援助

真核細胞においては Hsp90 と Hsp70 系 (Hsp70+DnaJ +GrpE) の協力はよく知られているが, 最近, 原核細胞から精製された Hsp90 においても Hsp70 系と協同してタンパク質フォールディング援助を行うことが報告された (Genest (2012) PNAS)。これは, Hsp90 が無くても大腸菌のストレス耐性は野生型とほとんど変わらないという知見と整合しない。上記の実験は, Hsp90 と Hsp70 系の濃度, 塩濃度, とともに細胞内よりもずっと低い条件のもとでの結果である。そこで, 両者の濃度を細胞内の濃度と同じ程度にして, フォールディング援助を検討したところ, Hsp90 の有無にかかわらず, Hsp70 系だけでフォールディング援助できることがわかった。Hsp70 系の濃度, 塩濃度, を下げると, フォールディング速度は大きく減少する。そこに Hsp90 を加えるとフォールディングが速くなる。したがって, Hsp90 は Hsp70 系の活性が, Hsp70 系の濃度, 塩濃度変化に影響されないように最適化していることが明らかとなった。

C) Hsp90 によるフォールディング援助が必要な大腸菌タンパク質のスクリーニング

大腸菌 Hsp90 はあるタンパク質 (Cas3) の効率的な発現に必要であることが報告されている。発現に Hsp90 が必要な大腸菌タンパク質を同定するために, Hsp90 欠失した大腸菌と欠失していない大腸菌において約 4000 種類の大腸菌タンパク質を発現させ (大腸菌遺伝子ライブラリー ASKA clone を利用), Hsp90 の存在によって発現が上昇するタンパク質の同定を行った。このうち約 100 種類のタンパク質の効率的な発現に Hsp90 が必要であることを発見した。研究 B, C の結果は第 87 回日本生化学会大会にて口頭発表を行い, 実験を担当した元島 - 宮崎優子が若手優秀賞を受賞した。

(2) ATP 合成酵素の作用機構

A) ヒト F1-ATPase の回転機構の解析

ヒト F1 の回転触媒機構を明らかにする為に, 顕微鏡 1 分子観察法と生化学的手法を用い分析を行った。その結果, ヒト F1 の ATP 加水分解駆動の回転には, 1 回転辺り 9 点の短い停止 (dwell) が存在し, ATP1 分子あたりの回転角度である 120° には, 3 点の停止が存在する事が判明した。この 3 つの dwell は 0° , 65° , 90° に存在し, ATP 結合が 0° , 生成物リン酸 (一つ前の turnover で発生したリン酸) の解離が 65° , ATP 加水分解が 90° にそれぞれ対応している事が明らかになった。この回転モデルは, 現在までに 20 以上報告されているウシ由来 F1 の結晶構造の多くをうまく説明する事

ができ、いままで困難であった F1 の回転触媒機構を構造に基づいて議論する事が可能となった。

B) IF1 によるヒト F1 の阻害機構の分析

F1 の蛋白生阻害因子である inhibitory factor-1 (IF1) の阻害機構の分析を顕微鏡 1 分子解析により行った。その結果, IF1 は, F1 の回転を ATP 加水分解待ちの 90° で停止させることが明らかになった。興味深い事に, 阻害に陥っている F1 の回転子を外力 (磁場) により ATP 加水分解方向に強制回転させようとしても回転子は回らないが, 逆の ATP 合成方向には回転できる事が見いだされた。また, この ATP 合成方向への強制回転により, 高い効率で IF1 による阻害が解除される事が判明した。この結果は, IF1 は ATP 加水分解反応のみを阻害し, ATP 合成反応は阻害しないという生化学的分析結果をうまく説明する。つまり, ATP 加水分解方向へは ATP 加水分解により発生したトルクがかかっても回転できずに阻害から解除できないが, ATP 合成時には F_o からの ATP 加水分解とは逆方向の回転トルクにより回転でき, その回転により阻害が解除されると解釈できる。IF1 以外にも resveratrol や piceatannol 等のポリフェノール等の生活習慣病の改善を引き起こす天然物による F1 の機能阻害も同時に分析を行った。

C) ウシ F1-ATPase の発現・分析システムの確立と機能解析

上記のようにヒト F1 を使って様々な分析を行ってきたが, 現在利用できる F1 の結晶構造データはほとんどがウシ F1 であり, ヒト F1 は未決定であるため, ヒト F1 の構造-機能相関には限界があった。そこでウシ F1 の分析システムを新規に確立し, 詳細な構造機能相関分析を行う事を試みた。まず, ウシ total RNA から F1 を構成している 5 種のサブユニットと 2 種類の分子シャペロンの遺伝子をクローニングし, 大腸菌の発現ベクターに導入した。様々な培養・精製条件を検討した結果, ウシ F1 を大腸菌内で発現させ, 精製する手法の確立に成功した。次に, ウシ F1 の回転子に 2 つの cystein 残基を導入し, ヒト F1 と同様に顕微鏡 1 分子観察により回転観察を行った。その結果, ウシ F1 はヒト F1 と同様に毎秒約 630 回転で高速に回転する事が判明した。現在, その回転機構の分析を行っている。また, 今後ウシ F1 の回転及びその調節機構の分析を行う為に, 得られた組換え体ウシ F1 を用いた結晶構造解析を試みている。現在すでに結晶が得られているので, 順次構造解析を行っている予定である。もしこの組換え体ウシ F1 の結晶構造解析のシステムが確立すれば, 生化学的解析・顕微鏡回転観察・結晶構造解析の手法を併せて用いる事により, 詳細にその分子機構の解明が行えると考えられる。

発表論文

Motojima, F. (2015) How do chaperonin folds proteins? *Biophysics* 11, 93-102

Suzuki T*, Tanaka K, Wakabayashi C, Saita E, Yoshida M* (2014) Chemo-mechanical coupling of human mitochondrial F1-ATPase motor. *Nature Chem Biol*, 10, 930-936,

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.

Kiota 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, Toshida M, Noji H, Kitakaze M, Komuro I, Asano Y, Takashima S* (2014) Evaluation of intra-mitochondrial ATP levels identifies G0/G1 switch gene 2 as a positive regulator of oxidative phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 111 (1), 273-8.

Study reports from Structural Biology Research Center

Masasuke YOSHIDA

Abstract

Five research groups constitute Structural Biology Research Center and are studying the mechanism of “protein synthesis and quality control”.

Koreaki Ito: translation arrest/ Nobuo Shimamoto: Life and death of E.coli/ Hideaki Tsuge: Structural studies of infectious factors/ Kazuhiro Nagata: protein control in endoplasmic reticulum/ Masasuke Yoshida: chaperonin, ATP synthase

Five research groups are actively studying these topics and published 22 papers in international journals.

Keywords : translation arrest, 100S ribosome, chaperon, protein quality control in endoplasmic reticulum, ATP synthesis