

構造生物学研究センター活動報告

平成 26 年 4 月 30 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) タンパク質膜挿入因子 YidC の構造と機能の解析
 (2) 翻訳アレストの解除機構
 (3) 翻訳伸長プロファイリング
 (4) 熱ショック転写因子 σ^{32} の制御機構

- 嶋本伸雄 グループ (1) 超抗退色性 GFP B-maggio
 (2) 大腸菌の生存戦略のナノバイオロジー
 (3) 転写のナノバイオロジー

- 津下英明 グループ (1) ADP リボシル化毒素と標的分子複合体の構造生物学
 (2) インフルエンザウィルス RNA ポリメラーゼの構造生物学
 (3) ポリ ADP リボシル基分解酵素の構造と機能の解析
 (4) セリンプロテアーゼのシャペロンの機能と複合体構造

- 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
 (3) 小胞体レドックスネットワーク
 (4) Moyamoya 病原因遺伝子 *mysterinn*

- 吉田賢右 グループ (1) 大腸菌 GroEL の作用機構
 (2) ヒト F₁ モーターの回転触媒機構
 (3) 細菌 F₁ モーターの化学・力学共役の仕組み
 (4) ATP 合成酵素の阻害因子 IF1 の役割

2013 年度、これらの研究を進めて、計 33 報の論文を国際誌に発表した。

キーワード：翻訳アレスト、転写複合体、アルギニン ADP リボシル化、大腸菌の死、シャペロニン

* 京都産業大学総合生命科学部

以下に 2013 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) タンパク質膜挿入因子 YidC の構造と機能

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、膜タンパク質を膜に挿入させる 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 の翻訳を誘導する制御因子であり、*yidC2* 遺伝子の upstream 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ミノ酸配列 (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。この間、立ち止まったり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。すなわち、アレストの時間が長いほど YidC2 の発現量が上昇する。アレストは MifM 合成途上鎖が SpoIIIJ による膜組込み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。本年度は、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。その結果、YidC の活性に重要なアミノ酸残基を同定した。そして、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の、新たなメカニズムを提唱した。

(2) 翻訳アレストの解除機構

翻訳伸長アレストを起こすことによってタンパク質分泌駆動因子 SecA の翻訳調節を行う SecM は、それ自身シグナル配列をもつ分泌タンパク質であり、その合成途上鎖が Sec 装置による膜透過反応を受けるとアレストが解除されるというフィードバック制御を受ける。SecM の翻訳アレストが膜透過反応に伴い解除される機構に、SecM 合成途上鎖のうち、リボソームの外でリボソームに近接した部位にある 10 残基のアミノ酸配列が必要とされることを見出した。アレストの制御にはシグナル配列とアレスト配列以外に SecM の中央領域が関与することが明らかとなった。

(3) 翻訳伸長プロファイリング

翻訳伸長における減速や一時停止がどの程度一般的に起こっているのかを明らかにするため、合成途上鎖 (“nascentome” と呼ぶことを提唱) が末端に共有結合で連結した tRNA をもつことを利用した実験方法を開発し、網羅的解析を行っている。既に、大腸菌の遺伝子 1,000 個以上の翻訳を、パル

スチェイス in vivo 実験と精製因子を用いる in vitro 翻訳実験で同時並行的に調べた。その結果、多くのタンパク質の合成が合計 4000 箇所近くに及ぶ部位で減速するという予想外の事実が明らかになった。In vivo と in vitro での違いや共通性からそれらを分類し、翻訳減速の原因を探っている。

(4) 熱ショック転写因子 σ^{32} の制御機構

客員研究員の由良博士が中心となった日米共同研究により、大腸菌において熱ショック（ストレス）応答遺伝子の転写を司る σ^{32} タンパク質が、SRP 経路によって細胞膜に局在化すること、そのことがタンパク質恒常性（proteostasis）の維持に重要であることを見出した。

発表論文

- 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 for Sec-independent membrane protein insertion by YidC. *Nature*, in press (*These authors contributed equally to this work)
- Mio, K., Tsukazaki, T., Mori, H., Kawata, M., Moriya, T., Sasaki, Y., Ishitani, R., Ito, K., Nureki, O. and Sato, C. (2013) Conformational variation of the translocon enhancing chaperone SecDF. *J. Struct. Funct. Genomics*, 10.1007/s10969-013-9168-4
- Lim, B., Miyazaki, R., Neher, S., Siegele, D.A., Ito, K., Walter, P., Akiyama, Y*, Yura, T* and Gross, C.A*. (2013) Heat shock transcription factor σ^{32} co-opts the signal recognition particle to regulate protein homeostasis in *E. coli*. *PLoS Biol.* 11 (12), e1001735. DOI: 10.1371/journal.pbio.1001735 (*Corresponding authors)
- Ito, K. and Chiba, S. (2013) Arrest peptides: *cis*-acting modulators of translation. *Annu. Rev. Biochem.* 82, 171-202 (Review)
- Akiyama, Y., and Ito, K. (2013) HtpX peptidase. pp. 683-685, *Handbook of Proteolytic Enzymes 3rd ed.* (ed. Rawlings, N. D. and Salvesen, G.) Academic Press (Review)
- Hizukuri, Y., Ito, K., and Akiyama, Y. (2013) RseP Peptidase. pp. 1545-1550, *Handbook of Proteolytic Enzymes 3rd ed.* (ed. Rawlings, N. D. and Salvesen, G.) Academic Press (Review)

嶋本伸雄 グループ

(1) 超抗退色性 GFP B-maggio

GFP を利用した 1 細胞生物学の研究中に、いくつかの GFP 変異体を作製したところ、偶然、光退色が今までの GFP より、百倍以上遅い GFP が出来ていた（客員研究員の所属する堀場製作所と共同で特許申請中）。明るさは従来の最高水準の GFPuv4 と同程度であり、多く発現されるタンパク質では染色体での gfp fusion で画像化が可能である。最大の長所は、光退色が Venus に比べて、in vitro で 110 倍 in vivo で 250 倍遅いことである。本命画像で焦点合わせが出来る様になり、1 分子の追跡は数分可能となった。また、多量体化で蛍光が赤色に変化する特徴がある。

(2) 大腸菌の生存戦略のナノバイオロジー

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、この問題に挑戦した。合成致死性を用いた遺伝学の結果、幸運なことに、生存を維持する機構には tmRNA を必須因子として含むものが発見された。また、最低もう1つ並行する経路があり、少なくとも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。各々の遺伝子の単独欠損株の死滅経過曲線から、可能な機構を絞り込むことが出来る。意外なことに短命にする protease 遺伝子も発見され、この遺伝子が進化上保存されて居るのは、集団としての生存機構かという興味深い問題に発展している。さらなる発展には、1細胞生物学が必要であり、大腸菌1細胞へのタンパク質のナノインジェクション技術の実用化を並行して進めていたことが成功につながりつつある。

(3) 転写のナノバイオロジー

RNA ポリメラーゼは、あらゆる物理的、化学的、生物学的分析手段が試みられた分子機械である。大きな未解決問題は次の通りである。(1) プロモーターとの結合のジレンマ：結合は、転写開始時に2本鎖DNAをほどくために強くなければならないにも関わらず、RNA伸長時には下流に移動できるほど弱くなければならない。(2) Abortive 転写の意義：なぜ転写開始時に短いRNAを多量に作るエネルギーの浪費をするのか？(3) シグマ70の謎：多くの生化学的手段では、転写開始因子シグマ70がポリメラーゼから解離することが示されるのに、FRETはなぜ異なる解釈がなされているのか。(4) DNA sliding：プロモーター領域を長大な染色体DNAからどうやって探し出すのか。200近い文献を引用して整理し、混乱の主因は、ブランド雑誌に掲載された1分子FRET等の”有名実験”で、実験手段の適用限界を超えたり、過剰に単純化したモデルを導入した誤った解釈であることを明らかにした。その上で、実験的証拠で裏付けをもつ abortive 転写の新機構として、backtracking model を提唱した。この model は、1-3の問題の解答を与え得る。また、ブラウン運動に、速度論や遷移状態理論を導入することの誤りを明確にして、正確な物理学の上に解釈を行うべきことを指摘した (Chem Rev)。また、この考えを発展させ、米国NCIのM.Kashlevのグループと共同して、転写の pause とその生理的意義を論じた (Transcription)。

発表論文

Shimamoto N. Nanobiology of RNA polymerase: Biological Consequence of Inhomogeneity in Reactant, Chem. Rev. 113, 8400-22

Imashimizu M, Shimamoto N, Oshima T, Kashlev, M. Transcription elongation: Heterogenous tracking of RNA

polymerase and biological Implications. Transcription 5

津下英明 グループ

(1) ADP リボシル化毒素とそのヒト標的分子複合体の構造生物学：

様々な病原微生物は ADP リボシル化毒素 (ADPRT) を分泌して、ホストのタンパク質を修飾し、ホストのシグナル伝達系に影響を与える。この反応機構の詳細を明らかにすべく、様々な反応状態での結晶構造解析を進めてきた。そして、初めてのアルギニン ADP リボシル化反応を捉え、「イオタ毒素-アクチン複合体結晶構造解析から示唆されるアルギニン ADP リボシル化の反応機構」として、2月4日発刊の米国科学アカデミー紀要に報告した。またこの論文は、同雑誌で Klaus Aktories により Commentary として紹介された。「一連の ADP リボシル化複合体の結晶構造解析とそこで提唱した Strain-alleviation model (緊張と緩和モデル) は、毒素が引き起こす ADP リボシル化の理解だけでなく、様々な働く内在性の ADP リボシル化酵素の分子反応の理解につながる事であり、画期的な発見である。」

(2) インフルエンザウィルス RNA ポリメラーゼの構造生物学：

インフルエンザ A ウィルスによって 1918 年に発生したスペインかぜは世界的流行 (パンデミック) を引き起こし、1000 万以上の死者を出した。鳥に感染したウィルスが変異してヒトへの感染が起これると考えられる。この強毒性の獲得にインフルエンザの持つ RNA ポリメラーゼのいくつかのアミノ酸の変異が重要である事がわかってきた。RNA ポリメラーゼ複合体 (PB2, PB1, PA) の全体構造の解明を目的として研究を進めてきた。インフルエンザウィルス RNA ポリメラーゼの PB2 サブユニットは宿主 mRNA の cap 構造を認識し取り込む cap snatching 機構を持つ。このドメインの結晶構造を cap のあるなしで解析し、今までとは異なる 7methyGTP の結合機構を明らかにした。また、この解析した結晶の N 末端部分は α ヘリックスを持つが、cap の結合によりこの部分がほどける性質を持つ。これらの結果を PLoS ONE に報告した。

(3) ポリ ADP リボシル基分解酵素の構造と機能の解析

ポリ ADP リボシル化は、高等動物で重要なシグナル伝達のための修飾である。ポリ ADP リボシル化酵素 PARP は DNA の損傷に伴い、自身およびヒストンをポリ ADP リボシル化する。これに対してポリ ADP リボシル基分解酵素 (PARG) はポリ ADP リボシル基を分解する。PARP と同様に PARG も、抗がん剤の標的と考えられ、その構造解析が期待されている。ヒト PARG の活性ドメインの発現に成功し、結晶を得た。結晶解析できるか、検討中である。

(4) セリンプロテアーゼのシャペロンの機能と複合体構造

Aeromonas sobria 由来のセリンプロテアーゼの構造は 2008 年に JBC に報告しているが、今回、そ

の external シャペロンの機能と複合体構造を明らかにし、現在論文投稿中である。また日本女子大学、島根大学との共同研究により、新規ペルオキシダーゼ DyP の生化学と構造研究を行っている。

発表論文

Tsurumura T, Qiu H, Tsumori Y, Oda M, Nagahama M, Sakurai J, 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)

Tsurumura T, Qiu H, Yoshida T, Tsumori Y, Hatakeyama D, Kuzuhara T, Tsuge H.

Conformational Polymorphism of m (7) GTP in Crystal Structure of the PB2 Middle Domain from Human Influenza A Virus. *PLoS One.* 8 (11):e82020 (2013)

Tsuge H and Tsurumura T. Crystal structure analysis of ADP-ribosylating enzyme and substrate protein complex *Photon Factory Activity Report* 2012 #30 (2013) B

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の治療において、コラーゲンの生合成に必須である Hsp47 は重要な創薬ターゲットとなっている。肝臓が障害を受けると、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され、増殖し、サイトカインやコラーゲンを分泌することで肝臓の修復に寄与する。修復後、増殖した肝星細胞はアポトーシスによりその数を減少させ、肝臓は通常の状態に戻ることが知られている。慢性的な線維化においては、肝星細胞はコラーゲンを過剰に産出し、線維化を進行させる。当研究室では、Hsp47 とプロコラーゲンとの相互作用を阻害する化合物を線維化疾患の治療に使うことを目的とし、その化合物の探索を行い、既に化合物を得ている（特許出願済み）。実際に Hsp47 の機能を阻害した時の、肝星細胞のターンオーバーを調べる事は、線維化疾患治療戦略を考える上で極めて重要である。

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、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。これによる小胞体ストレスは確認されなかったが、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ている可能性が示唆された。今後、Hsp47 阻害剤を用いた解析を進めていく予定である。

(2) 小胞体におけるタンパク質品質管理

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という予備的なデータを得ている。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も制御し、そのクロストーク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。

(3) 小胞体レドックスネットワーク

小胞体には 20 種類を越えるオキシドレダクターゼ (酸化還元酵素) が存在する。酸化還元反応は、一連の電子伝達経路から成るが、プロテオミック解析 (特に相互作用解析を主としたインターラクトーム解析) と酸素電極による酸化反応の解析、表面プラズモン (SPR) を用いた相互作用解析などを駆使して、小胞体における一連の酸化反応のカスケードを明らかにした。中でも Ero1a および PDI という 2 つの酸化酵素および酸化還元酵素がハブ複合体を作って、小胞体での酸化反応における最上流起点になっているという事実を見出した (K. Araki *et al.*, *J. Cell Biol.*, 2013)。またこのような酸化酵素ネットワークによって、小胞体内環境が酸化的に保たれることが、正常なタンパク質分泌のために必須であるが、このようなレドックス恒常性が、神経変性疾患や老化により低下することを見出した。神経変性疾患や老化においては細胞質ゾルのタンパク質恒常性が低下することが知られているが、これが膜を越えて小胞体内腔に影響を及ぼしていることは驚くべきことであり、現在そのメカニズムの解明に取り組んでいる。

(4) Moyamoya 病原因遺伝子 mysterin

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 という巨大な分子であった。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。また、Mysterin をゼブラフィッシュでノックダウンすると、血管のガイダンスに異常が起こることが明らかになり、病態との関わりの上で重要な発見となった。現在、さらに結合タンパク質などを含めて、その機能解析を行っている。

発表論文

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* 17 February (2014)
- T. Ramming, 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)
- T. Kakugawa, S. Yokota, Y. Ishimatsu, T. Hayashi, S. Nakashima, S. Hara, N. Sakamoto, Y. Matsuoka, H. Kubota, M. Mine, H. Mukae, K. Nagata & S. Kohno : Serum heat shock protein 47 levels in patients with drug-induced lung disease. *Respiratory Research* 14:133 (2013)
- 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)
- R. Ushioda, J. Hoseki & K. Nagata : Glycosylation-independent ERAD pathway serves as a backup system under ER stress. *Mol. Biol. Cell.* 24 (20) :3155-3163 (2013)
- 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)
- 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 exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis. *Cell Stress and Chaperones* 18:581-590 (2013)
- T. Fujimori, Y. Kamiya, K. Nagata, K. Kato & N. Hosokawa : Endoplasmic reticulum lectin XTP3-B inhibits endoplasmic reticulum-associated degradation of a misfolded α 1-antitrypsin variant. *FEBS J.* 280 (6) :1563-1575 (2013)
- M. F. Abdul-Wahab, T. Homma, M. Wright, D. Olerenshaw, T. R. Dafforn, K. Nagata & A. D. Miller : The pH sensitivity of murine hsp47 binding to collagen is affected by mutations in the breach histidine cluster *J. Biol. Chem.* 288 (6) :4452-4461 (2013)

吉田賢右 グループ

(1) 大腸菌 GroEL の作用機構

X線結晶構造や生化学的実験から、シャペロニン (GroEL/GroES) は変性タンパク質をその親水性空洞に閉じ込めてフォールディングを援助することが明らかとなっている。そしてシャペロニンは

変性タンパク質を空洞内に隔離することで変性タンパク質同士の結合による不可逆な凝集体形成を阻害し、閉じ込められた変性タンパク質は自由にフォールディングすると考えられてきた (Anfinsen cage モデル)。私たちは、一度空洞内に閉じ込められた変性タンパク質のある割合が継続的に空洞外へ漏れ出してくることを発見した。現在のシャペロニンの作用機構の教科書的なモデルでは変性タンパク質は完全に空洞内に閉じ込められている。しかし、空洞内フォールディングの中間状態では、空洞内の変性タンパク質はそのポリペプチドの一部が空洞の外へはみだしているらしい。実際、この中間状態の存在は、溶液に加えた抗基質タンパク質抗体が空洞内に入っている変性タンパク質に結合して、空洞内のフォールディングの進行を停止させることで確かめられた。変性タンパク質は空洞内にわずかに露出する疎水性のサブユニット界面近傍のシステインとジスルフィド架橋を形成し、変性タンパク質はこの領域と疎水性相互作用していると考えられた。また、疎水性を減少させた GroEL 変異体はフォールディングが遅くなり、疎水性相互作用がフォールディングの促進に働く可能性が示唆された。上の研究から、本当の空洞内フォールディングを観察するには、空洞外に漏れ出たポリペプチドの自発的フォールディングを差し引く必要があることも示された。例えばマルトース結合タンパク質変異体 DMMBP は全て空洞内でフォールディングするとされていたが、実際は 90% も空洞外でフォールディングしていた。空洞内負電荷による水和水の安定化がフォールディングを促進するとした説はこの誤った実験結果に基づいており、否定された。また、confinement モデルを裏付けるとされた約 10 倍のフォールディング速度上昇は、タンパク質変性に用いたグアニジン塩酸が自発的フォールディングを遅くすることが原因であり、尿素変性の場合、2 倍程度しか促進されないことを見出した。

(2) ヒト F_1 モーターの回転触媒機構

今までに細菌の ATP 合成酵素およびその部分複合体である F_1 モーターの回転特性については、よく解析されてきた。それによると、ATP が F_1 に結合すると、ローターである γ サブユニットは 80° 回転する。 80° の位置で、ATP 加水分解が起こり、リン酸の解離が起こり、 40° 回転し、 120° の回転となる。これが全生物にとって共通なのか、ミトコンドリアの F_1 モーターの回転を解析する必要がある。しかし、これはこの 15 年間、世界の誰もできなかった。今回、私たちは 1 分子観察によって、ヒトの F_1 モーターの回転を見ることができた。その結果は、以下の通りだった。ATP が F_1 に結合すると、 γ サブユニットは 65° 回転する。そして先に加水分解されて F_1 上に残っていたリン酸が解離して 65° から 90° まで回転する。 90° の位置で、ATP 加水分解が起こり、 30° 回転し、 120° の回転となる。このように、細菌とミトコンドリアでは、 F_1 の停止角度が違っている。また、阻害因子である IF1 は、回転を 90° の位置で停止させることがわかった。

(3) 細菌 F_1 モーターの化学・力学共役の仕組み

細胞の中のエネルギー状態 (ATP 濃度, プロトン濃度勾配, など) はいろいろ変わる。いろいろ

変わっても、ATP合成酵素は、ATP濃度⇔プロトン濃度勾配のエネルギー変換効率をいつでも100%近い効率でおこなうことが求められているし、実際にそうしている。どうしてそんなことが可能か。細菌のF₁のローターに磁気微粒子を付着し、外部磁場によってゆっくりと強制的に回すと、それに逆らって少し遅れながら、あるいは少し先に回転するのが観察される。これはF₁のトルクによるものであり、この方法で360°のトルクの大きさを求められる。その結果、ATPが存在すると、トルクは、0°、40°、80°でジャンプして漸減するのこぎりの刃のようなパターンを120°ごとに繰り返していた。ATP濃度が高ければ、0°のジャンプのタイミングが0°よりも早まり、のこぎりの刃は高くなり、回転のエネルギーは大きくなる。このようにして、高いATP濃度（大きな ΔG_{ATP} ）はロスなく回転の機械的なエネルギーに変換される。

(4) ATP合成酵素の阻害因子IF1の役割

ミトコンドリアのATP合成酵素（およびF₁）のATP加水分解活性を阻害する調節因子としてIF1が知られている。IF1がないと、ミトコンドリアのクリステ構造ができにくいとか、アポトーシスが起きやすい、とか報告がある。私たちはIF1遺伝子を完全に欠損したマウスを作成した。予期に反して、このマウスは調べた限りではまったく健康であり、正常なマウスと区別がつかない。IF1に代わる調節因子が存在するのか、あるいは、ATP合成酵素は制御される必要がないのか、検討が必要な事態となった。

発表論文

- 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
- Hara S, Nojima T, Seio K, Yoshida M, Hisabori T. DNA-maleimide: an improved maleimide compound for electrophoresis-based titration of reactive thiols in a specific protein. *Biochim Biophys Acta*. 2013 Apr;1830 (4): 3077-81
- Nishida N, Yagi-Utsumi M, Motojima F, Yoshida M, Shimada I, Kato K Nuclear magnetic resonance approaches for characterizing interactions between the bacterial chaperonin GroEL and unstructured proteins.. *J Biosci Bioeng*. 2013 Aug;116 (2): 160-4.
- 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).
- 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.
- 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*. 2014 Feb;19 (2): 153-60.
- 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.
- Kang SJ, Todokoro Y, Yumen I, Shen B, Iwasaki I, Suzuki T, Miyagi A, Yoshida M, Fujiwara T, Akutsu H. Active-site structure of the thermophilic *foc*-subunit ring in membranes elucidated by solid-state NMR. *Biophys J*. 2014 Jan 21;106 (2): 390-8
- Morino M, Suzuki T, Ito M, Krulwich T. E. (2014) Purification and functional reconstitution of a seven-subunit Mrp-type Na⁺/H⁺ antiporter, *J Bacteriol*, 196 (1), 28-35.

Study reports from Structural Biology Research Center

Masasuke YOSHIDA

Abstract

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

Koreaki Ito: translation arrest/ Nobuo Shimamoto: Life and death of E.coli/ Hideaki Tsuge: virus RNA polymerase structure, ADP-ribosyl transferase/ Kazuhiro Nagata: protein quality control in endoplasmic reticulum/ Masasuke Yohsida: chaperonin, ATP synthase

Five groups are actively studying these topics and published 33 papers in international journals.

Keywords : translation arrest, transcription complex, ADP-ribosylation, live and death of E.coli, chaperonin