

構造生物学研究センター活動報告

平成 25 年 5 月 1 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」に関わる研究を進めている。

伊藤維昭グループ (1) 翻訳伸長アレスト

(2) タンパク質合成

嶋本伸雄グループ (1) ナノインデンテーション

(2) 転写複合体

(3) tmRNA

津下英明グループ (1) アルギニン ADP リボシル化

(2) インフルエンザウィルス RNA ポリメラーゼ

(3) スフィンゴミエリナーゼ

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

(2) 小胞体関連分解に関与する新規タンパク質群

(3) タンパク質品質管理における小胞体レドックスネットワーク

(4) モヤモヤ病原因遺伝子 *mysterinn*

吉田賢右グループ (1) ヒト ATP 合成酵素の阻害因子 IF1

(2) シャペロニン

2012 年度、これらの研究を活発に進め、計 25 報の国際査読論文として発表した。

キーワード：翻訳伸長アレスト，転写複合体，アルギニン ADP リボシル化，分子シャペロン，ATP 合成酵素

構造生物学研究センターは、5 つの研究グループによって構成される。以下に 2012 年度の研究成果について報告する。

* 京都産業大学総合生命科学部

伊藤維昭グループ

1) 翻訳伸長アレストの解析：

試験管内での無細胞タンパク質合成反応を駆使した実験と生きた菌体を用いた遺伝解析を組み合わせることで、MifM や SecM の合成途上鎖とリボソームは、生物種毎に異なる個別性の高い方式で相互作用することを示してきた。各生物は、それらのプロテオームに適合するようにリボソームトンネルを進化させてきたのかもしれない。リボソームが立ち止まる mifM mRNA 上の位置を詳細に決定する実験を進めた結果、MifM は SecM などのこれまでに知られているアレストペプチドとは異なり、連続した4箇所ほどの複数の箇所で翻訳伸長アレストを起こしていることを見だし、このアレストには、以前に同定したトンネル狭窄部位付近と相互作用するアミノ酸残基に加えて、リボソーム活性中心に近く配置される酸性アミノ酸の連なりが必要とされることを示した。合成途上鎖はアミノ酸が1残基付加される毎にリボソームトンネル内を動くため、リボソームのペプチド転移活性を阻害するような相互作用は伸長の特定のステージで一回しか起こらないと考えられてきた。しかし、MifM の翻訳が何回も立ち止まることがわかり、トンネルの中での polypeptidyl-tRNA は直鎖状に延びた状態にあるとは限らない可能性などが浮上した。MifM を翻訳するリボソームが立ち止まることによって mRNA の二次構造がほぐれ、下流の膜組込み因子 YidC2 の翻訳が促されるのだが、MifM はたち止まりを何回も起こすことによって、YidC2 が翻訳される時間を確保しているものと考えられる。

2) 翻訳アレストの解除に関わるエレメント：

MifM と同様に SecM は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 自体が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 SecA の翻訳低下をもたらす。Sec 装置の活性が低下するとアレストが持続し、SecA の翻訳上昇をもたらす。SecM の翻訳アレストが膜透過反応に伴い解除される機構は、この制御の焦点である。分泌装置による「引っ張り力」がアレスト解除に関与するとの説があるが、我々は SecM のアレスト解除には引っ張り力に加えて、SecM 自体が持つ特異的アミノ酸配列が関与することを見だし、解析を進めている。

3) タンパク質合成の実像：

我々は細胞内の合成途上鎖 (polypeptidyl-tRNA) の全体像を“nascentome”と呼ぶことを提唱し、nascentome メンバーが tRNA を共有結合していることを利用した合成途上鎖の選択的検出方法を開発した。大腸菌の個々のプロテオームメンバーが辿る合成途上状態のことを“sub-nascentome”と名付け、パルスチェイス in vivo 実験と精製因子を用いる in vitro 翻訳によって、各タンパク質がどのような合成途上状態を示すのかを調べる取り組みを始動した。既に、一時的な pausing を伴って翻訳されるタンパク質が予想以上に多数存在することを突きとめつつある。

発表論文

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

Chadani, Y., Ito, K., Kutsukake, K. and Abo T. (2012) ArfA recruits RF2 to rescue stalled ribosomes by peptidyl-tRNA hydrolysis in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 86, 37–50

嶋本伸雄グループ

1) Nanoindentation

10nm 程度の先端を持つナノ針を押しつけて、そのへこみから物質の分子構造を解析するのが、nanoindentation である。われわれは、ダイヤモンド表面に DNA をシラン膜を介して共有結合させることに成功していたが (Lamgmuir 25, 203 (2009)), その共有結合の様子の研究と、AFM を用いた nanoindentation の分野の進展をまとめて、我々の成果の学問上の位置を明らかにした。ダイヤモンドの (100) 面の欠陥格子点の single dangling bond を通して、シラン膜がダイヤモンドと共有結合し、その共有結合の密度を、シラン膜の溶媒の誘電率によって制御出来ることを示した (成果論文 1)。

2) abortive initiation を行う転写複合体のモデルの提案

転写開始時に、2-15 塩基程度の短い RNA が放出される abortive initiation は、転写伸長の機構である Two Pawl Ratchet Model (Brownian Ratchet と俗称される) との関係は不明であり、まだモデルすら提出されてなかった。

そこで、abortive initiation をおこなう複合体 Moribund complex について、我々の得ている σ -70 転写開始因子の protein footprinting, ExoIII DNA footprinting, Permanganese DNA footprinting の結果を総合し、Backtracking や σ -70 との結合が弱くなっていることをもとに、分子モデルを提案した。

3) tmRNA の新機能の発見：

tmRNA の欠損 ($\Delta ssrA$) と合成致死の遺伝子を分離した。いずれもシャペロン、ペプチダーゼ系の AAA+protease 遺伝子であった。生存には tmRNA が関わる過程と、AAA+protease 過程とが並列していることを意味する。この致死性は、アミノ酸添加で相補されることから、AAA+protease による protein turning over が生存に必須であることが示唆された。このように、大腸菌の増殖や生存に関わる新概念が得られつつある。

発表論文

Shcherbakova, K., Hatakeyama, A., Amemiya, Y., and Shimamoto, N. (2012) Nanoindentation as a Tool to Clarify the Mechanism Causing Variable Stiffness of a Silane Layer on Diamond, in “Nanoindentation in Materials Science” ed. Nemecek, J. 161–78, Intech Open Access, in press (査読有)

津下英明グループ

1) 初めてのアルギニン ADP リボシル化反応を捉える。

ウェルシュ菌のアクチン特異的モノ ADP リボシル化毒素である Ia はアクチンのアルギニン 177 を特異的に ADP リボシル化する。ADP リボシル化の反応機構を知るためには、毒素と基質タンパク質複合体の構造を知る事は重要である。非水解性の NAD アナログ β TAD を用いた、 β TAD-Ia-actin の結晶構造のみが知られていたが、本来の基質である NAD^+ および反応後の ADP リボシル化された構造についてはわかっていなかった。今回、アポ Ia-actin の結晶を作成し、これへのソーキングから NAD^+ -Ia-actin と Ia-ADP-ribosylated (ADPR)-actin の結晶構造を高い分解能で明らかにした。これは、ADP リボシル化反応の前と後の構造となる。その反応機構は我々が以前に提唱した strain-alleviation (緊張と緩和) model をさらに、裏づける結果となった。すなわち、 NAD^+ から Sn1 反応により、ニコチンアミドが切断したオキソカルベニウムカチオン中間体ができ、Ia にその ADP 部分を保持されたまま N リボース部分の回転移動が起こり第 2 の中間体を経て、アクチンのアルギニン 177 に近づくと考えられる。これにより ADP リボシル化の修飾反応が起きると考えられる。この ADP リボシル化反応機構は、アクチンを標的とした毒素以外でも、RhoA を標的とした毒素 C3、さらにはヒトのモノ ADP リボシル化酵素およびポリ ADP リボシル化酵素 (PARP) でも見られるかもしれないと考えている。

2) インフルエンザウィルス RNA ポリメラーゼの発現系の検討

特に、PB2 のサブユニットで発現系を検討している。既に構造解析を行っている、E627K の変異を含む、C 末端ドメインに続き、H1N1 型のミドルドメインで発現、結晶化に成功した。

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) 徳島文理大学との共同研究により、スフィンゴミエリナーゼのサイドエッジのマグネシウム結合が膜結合に重要な知見を得た。また東京工業大学、日本女子大学との共同研究により、新規ペルオキシダーゼ DyP の基質結合の結晶構造を明らかにした。

発表論文

- Yoshida T, Tsuge H, Hisabori T, Sugano Y. Crystal structures of dye-decolorizing peroxidase with ascorbic acid and 2,6-dimethoxyphenol. *FEBS Lett.* **586** (24) : 4351-6. (2012)
- Oda M, Hashimoto M, Takahashi M, Ohmae Y, Seike S, Kato R, Fujita A, Tsuge H, Nagahama M, Ochi S, Sasahara T, Hayashi S, Hirai Y, Sakurai J. Role of sphingomyelinase in infectious diseases caused by *Bacillus cereus*. *PLoS One.* **7** (6) : e38054. (2012)
- Oda M, Takahashi M, Tsuge H, Nagahama M, Sakurai J. Role of side-edge site of sphingomyelinase from *Bacillus cereus*. *Biochem Biophys Res Commun.* **422** (1) : 128-32. (2012)

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

Hsp47 は線維化疾患と密接にかかわっており、肝硬変、肺線維症などの発症とともに、発現が劇的に上昇する (J. Clin. Invest., 1994)。Hsp47 の発現を抑えると、病状に改善が見られることをすでに報告しており (Lab. Invest., 1998)、他の研究室でも追試されている (Nature Biotech., 2008)。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治療に使うことを目的として、その化合物の探索を、通産省の産総研と協力して行ってきた。その成果として、Hsp47 とともに、コラーゲンの分泌に必須のプロリン水酸化を担う P4H (prolyl 4-hydroxigenase) をも阻害する興味深い化合物 Col003 を得ることができ、特許を出願した。Col003 は Hsp47 および P4H に直接結合することによって、小胞体内でプロコラーゲンとの結合を阻害し、コラーゲンの分泌を抑制する。

2) 小胞体関連分解に関与する新規タンパク質群の機能解析

ミスフォールドタンパク質の糖鎖を認識して分解へまわす EDEM1、ミスフォールドタンパク質のジスルフィド結合を還元開裂し、ERAD を促進する還元酵素 ERdj5 に関して研究を進めている。昨年、X 線結晶解析に成功し報告した。さらに非糖タンパク質の分解にも研究を展開し、糖タンパク質の分解経路が、カルネキシン (分子シャペロン) \Rightarrow EDEM1 \Rightarrow ERdj5 \Rightarrow BiP (分子シャペロン) であるのに対して、非糖タンパク質の場合は、BiP \Rightarrow ERdj5 \Rightarrow BiP という経路をとることを明らかにした。細胞に ER ストレスがかかり、大量の糖タンパク質が変性して、EDEM/ERdj5 経路が飽和してしまった際に、非糖タンパク質分解経路 BiP/ERdj5 経路が駆動される。即ち、BiP/ERdj5 経路は、ストレス存在下のバックアップシステムとして機能していることが明らかになった。

3) タンパク質品質管理における小胞体レドックスネットワークの意義

小胞体には 20 種類を超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、酸化反応の起点になり、次々に酸化反応を引き起こすという事実を見出した。さらに主要な酸化酵素 Ero1a の活性化機構を NMR などの手法を用いて明らかにした。

4) モヤモヤ病原因遺伝子 *mysterin* の機能

モヤモヤ病の原因遺伝子としてクローニングした *mysterin* は、分子量約 600kDa という巨大な分子であった。しかも、この分子はオリゴマーを作り、巨大なタンパク質分解酵素プロテアソーム以上の大きさになることを明らかにした。*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

- 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* in press
- T. Fujimori, Y. Kamiya, K. Nagata, K. Kato & N. Hosokawa: Endoplasmic reticulum lectin XTP3-B inhibits endoplasmic reticulum-associated degradation of a misfolded $\alpha 1$ -antitrypsin variant. *FEBS J.* in press
- 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.* In press
- M. Yagi-Utsumi, S. Yoshikawa, Y. Yamaguchi, Y. Nishi, E. Kurimoto, Y. Ishida, T. Homma, J. Hoseki, Y. Nishikawa, T. Koide, K. Nagata and K. Kato: NMR and mutational identification of the collagen-binding site of the chaperone Hsp47. *PLoS ONE* 7(9): e45930 (2012)
- K. Hisatomi, H. Mukae, N. Sakamoto, Y. Ishimatsu, T. Kakugawa, S. Hara, H. Fujita, S. Nakamichi, H. Oku, Y. Urata, H. Kubota, K. Nagata and S. Kohno: Pirfenidone inhibits TGF- β 1-induced over-expression of collagen type I and heat shock protein 47 in A549 cells. *BMC Pulm Med.* 12: 24 (2012)
- Y. Ishikawa, J. A. Vranka, S. P. Boudko, E. Pokidysheva, K. Mizuno, K. Zientek, D. R. Keene, A. M. Rashmir-Raven, K. Nagata, N. J. Winand and H. P. Bachinger: The mutation in cyclophilin B that causes hyperelastosis cutis in the American Quarter Horse does not affect peptidyl-prolyl cis-trans isomerase activity, but shows altered cyclophilin B-protein interactions and affects collagen folding. *J. Biol. Chem.* 287(26): 22253-22265 (2012)
- T. Ono, T. Miyazaki, Y. Ishida, M. Uehata and K. Nagata: Direct in vitro and in vivo evidence for interaction between Hsp47 protein and collagen triple helix. *J. Biol. Chem.* 287(9): 6810-6818 (2012)
- Y. Masago, A. Hosoya, S. Kawano, A. Nasu, J. Toguchida, K. Fujita, H. Nakamura, G. Kondoh and K. Nagata: Molecular chaperone Hsp47 is essential for cartilage and endochondral bone formation. *J. Cell Sci.* 125(5): 1118-1128 (2012)

吉田賢右グループ

1) ヒト ATP 合成酵素の阻害因子 IF1 の役割

ミトコンドリアには、ATP 合成酵素の阻害因子 IF1 が存在する。これは細菌や葉緑体にはない小さなタンパク質であり、ATP 合成酵素に結合してその ATP 加水分解活性を阻害することが、*in vitro* の実験からわかっている。実際の細胞で、IF1 がどのような状況でどんな作用をするのか、調べた論文がいくつか発表されているが、矛盾した結果があり、定説がない。それは、一過性のノックダウン細胞を使っているがゆえの結果の不安定性である、と考えて、ずっと IF1 のノックダウン状態の続く細胞をつくって調べた。その結果、IF1 ノックダウン細胞では次のことが観察された。細胞中の ATP 濃度が少し下がる、ミトコンドリアの膜電位が少し上昇する、過酸化物が少し増える。しかし、細胞の増殖やグルコースの消費やミトコンドリアの ATP 合成は影響を受けない。以前に報告されたミトコンドリアの形態の変化は認められない。ミトコンドリアが $\Delta\mu\text{H}^+$ を失うと、ATP 濃度が急降下するが 10 分ほどで回復する(野生型細胞は急降下が見られない)。虚血とグルコース除去という条件では、正常細胞も死んでしまうが、IF1 ノックダウン細胞は正常細胞よりも少し早く死ぬ。したがって、IF1 は ATP 濃度の維持に役立っているものの、細胞の生存にそれほど決定的な影響を及ぼさない、と言える。

2) シャペロニンの作用機構

空洞内の変性タンパク質は native 構造を形成する直前まで GroEL と相互作用していること、一部のタンパク質は、空洞から外に(フタである GroES が結合しているにもかかわらず)逃げ出すことを明らかにした。この新しい作用機構を tethering mechanism と名付けて、このメカニズムに照らして過去の GroEL 研究で重要とみなされているいくつかの論文内容を検討したところ、多くの訂正が必要であることを見出した。

発表論文

- Usukura E, Suzuki T, Furuie S, Soga N, Saita E, Hisabori T, Kinoshita K Jr, Yoshida M. Torque generation and utilization in motor enzyme F₀F₁-atp synthase : half-torque F₁ with short-sized pushrod helix and reduced atp synthesis by half-torque F₀F₁. *J Biol Chem*. 2012 Jan 13 ; 287 (3) : 1884-91.
- 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.
- Mizuno S, Nakazaki Y, Yoshida M, Watanabe YH. Orientation of the amino-terminal domain of ClpB affects the disaggregation of the protein. *FEBS J*. 2012 Apr ; 279 (8) : 1474-84. doi : 10.1111 /j.1742-4658.2012.08540.x. Epub 2012 Mar 16
- 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.
- 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(o)F(1)-ATP synthase expressed in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif.* 2012 Apr ; 82 (2) : 396-401. Epub 2012 Feb 20.
- Fujikawa M, Imamura H, Nakamura J, Yoshida M. Assessing actual contribution of IF1, inhibitor of mitochondrial FoF1, to ATP homeostasis, cell growth, mitochondrial morphology, and cell viability. *J Biol Chem.* 2012 May 25 ; 287 (22) : 18781-7. Epub 2012 Apr 9
- 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.
- 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.
- 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
- 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.
- Nojima T, Konno H, Kadera 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.

Study Reports from Structural Biology Research Center

Masasuke YOSHIDA

Abstract

There are five groups in Structural Biology Research Center to proceed the project, “Protein synthesis and quality control”.

Koreaki Ito: Translation arrest, Protein synthesis / Nobuo Shimamoto: Nanointegration, Transcriptional complex, tmRNA / Hideaki Tsuge : Arginine ADP-ribosylation : Infuenza Virus RNA polymerase, Sphingomyelinase / Kazuhiro Nagata: Collagen Chaperon Hsp47, Endoplasmic reticulum quality control: The responsible gene of moyamoya disease (mysterinn) / Masasuke Yoshida: Inhibitor of human ATPase (IF1), Chaperonin

We proceeded these studies and published 25 manuscripts in international journals.

Keywords : Translation arrest, Trasnscription complex, Arginine ADP-ribosylation, Molecular Chaperone, ATP synthase