

研 究 報 告 書

「過渡的複合体を介したシャペロンネットワークの分子機構解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 26 年 10 月～平成 30 年 3 月

研 究 者: 齋 尾 智 英

1. 研究のねらい

分子シャペロンはタンパク質のミスフォールディングや凝集を防ぐことによって、細胞内でのタンパク質の品質管理、特に新生タンパク質の折りたたみや輸送において重要な働きを担っている。タンパク質の折りたたみの失敗は細胞内に凝集体を蓄積させ、アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、パーキンソン病、ハンチントン病などの様々な疾病を引き起こす。これまで最もよく研究されてきた大腸菌のシャペロンシステムにおいては、翻訳された新生タンパク質はまず Trigger Factor (TF) によって認識され、凝集やプロテアーゼ分解などから保護される。新生鎖の多くはその後 DnaK, DnaJ, GroEL-ES, SecB などのシャペロンタンパク質に受け渡され、折りたたみを完了する。シグナル配列をもつ新生鎖は変性状態を保持したまま SecB, SecA へと受け渡され、細胞膜外または膜上へと輸送される。このようにタンパク質の折りたたみと輸送にはシャペロンを含む多くのタンパク質が協調的に機能しているが、その分子機構はほとんど理解されていない。特にその基質認識【基質タンパク質がどのようにシャペロンによって認識されるのか？】とネットワーク【複数のシャペロンがどのように連携し基質タンパク質の折りたたみや輸送を遂行するのか？】については特に知見が乏しい。その最大の理由は、シャペロン-基質またはシャペロン-シャペロンの動的で過渡的な相互作用が複合体での結晶構造解析を困難にしているからである。そこで本研究では高度安定同位体標識法、常磁性ランタニドプローブ法、緩和分散法を駆使した nuclear magnetic resonance (NMR) による立体構造解析・ダイナミクス解析を主体とし、isothermal titration calorimetry (ITC), multi-angle light scattering (MALS) といった物理化学的手法を組み合わせた包括的なアプローチによって、シャペロンの作用機序解明に取り組んだ。同時に、本研究での核となる常磁性ランタニドプローブ法を用いた NMR については、モデルタンパク質を用いた手法の高度化にも取り組んだ。

2. 研究成果

(1) 概要

細胞内に多種存在する分子シャペロンはタンパク質のミスフォールディングや凝集を防ぐことによって、細胞内でのタンパク質の品質管理、特に新生タンパク質の折りたたみや輸送において重要な働きを担っている。しかし立体構造を持たない変性状態の基質タンパク質と過渡的かつダイナミックに相互作用するというシャペロンの特性から、その作用機序、特に原子分解能での理解は限られている。本研究ではこれまで最もよく研究されてきた大腸菌のシャペロンシステムを対象とし、高分解能 NMR を主体とした構造解析・ダイナミクス解析によってシャペロンに対する普遍的な知見を得ることを目的として研究を推進した。本プロジェクトでは、(A) TF シャペロンによる基質認識機構の解明、(B) TF による基質の折りたたみ補助機構の解明、

(C) シャペロン間での連携機構の解明, (D) 手法の高度化, 特にランタニドプローブ法の高度化, の 4 点について重点的に研究を進めた. (A)については, モデル基質タンパク質として PhoA や MBP などを用い, TF との複合体立体構造解析や相互作用解析, ダイナミクス解析などによって, TF シャペロンによる変性状態の基質タンパク質の認識メカニズムを明らかにした. (B) では, TF が基質タンパク質の折りたたみを促進するメカニズムの解明を目指した研究を展開した. (C) では, シャペロン間での連携機構の解明に取り組んだ. (D) については, モデルタンパク質 MurD を用い, 溶液中のタンパク質の立体構造変化をバイアスなく詳細かつ迅速に解析する手法の確立と検証を行った.

(2) 詳細

リボソームによって合成された新生タンパク質は, 高次構造を持たない変性状態として細胞質に放出され, 一次配列に規定された天然状態へと折りたたまれる. シグナル配列を持つタンパク質の場合は, 細胞膜や細胞内小器官などへと輸送された後に折りたたまれる. このような, 新生タンパク質の輸送や折りたたみは生命の根幹をなす重要なステップであるにもかかわらず, その詳細なメカニズムは明らかにされていない. 特に, 「新生タンパク質がどのようにシャペロンによって認識されるのか?」, 「シャペロンがどのようにタンパク質の折りたたみを補助するのか?」, 「シャペロンがどのようにして共同的に機能しているのか?」などについては特に知見が乏しい. 基質タンパク

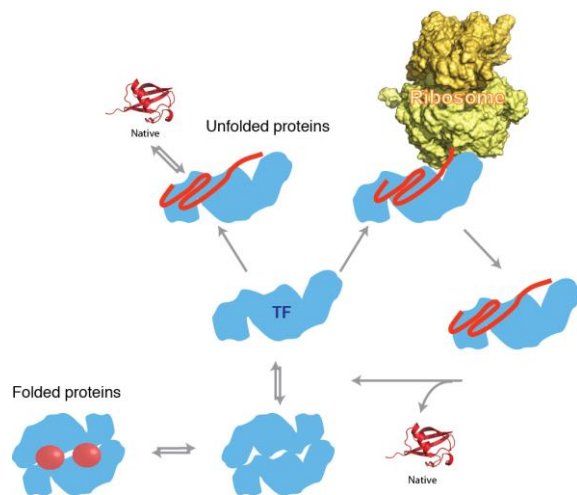


Fig. 1 TF シャペロンの多彩な機能

質との比較的弱くダイナミックな相互作用によって機能するシャペロンに対する立体構造解析が難しく, これまで有効な手法の欠如によって研究が進んでいなかった. 本研究では, 溶液 NMR 法を主体としたアプローチによって, シャペロンの動的構造解析に取り組んだ. さらに本研究では, シャペロン複合体に対するより高精度での立体構造解析を可能にするため, 常磁性ランタニドプローブ法を用いた NMR 法の高度化についても取り組んだ. これまで最もよく研究されてきた大腸菌のシャペロンシステムに注目し, 高分解能 NMR を主体とした構造解析・ダイナミクス解析によってシャペロンに対する普遍的な知見を得ることを目的として研究を推進した. ここでは特に TF シャペロン (Fig. 1) に着目し, 次の 4 点について重点的に研究を進めた.

- (A) TF シャペロンによる基質認識機構の解明
- (B) TF による基質の折りたたみ補助機構の解明
- (C) シャペロン間での連携機構の解明
- (D) 手法の高度化, 特にランタニドプローブ法の高度化

以下にそれぞれについての成果をまとめる。

(A) TF シャペロンによる基質認識機構の解明

変性状態の基質タンパク質 PhoA と TF との相互作用解析・立体構造解析によって、TF による基質認識機構の一端が明らかになっている。TF は疎水性アミノ酸によって構成される 4 箇所の基質結合サイトによって基質の複数の疎水性領域と結合することによって疎水性領域を互いに引き離した状態に保持し、凝集を抑制すると考えられた。本研究では、PhoA を用いた立体構造解析から得られた知見の普遍性を検証するために、MBP などを含む複数のタンパク質を用いた相互作用解析を行

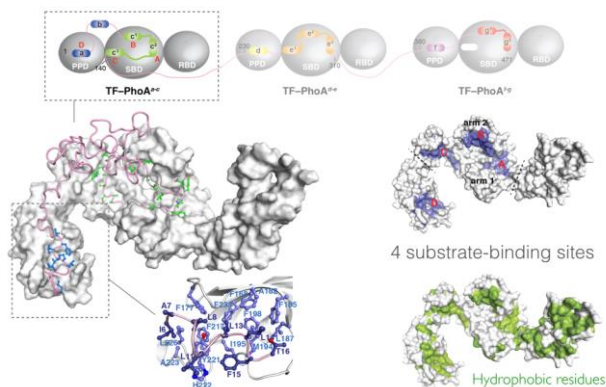


Fig. 2 TF による変性状態の基質タンパク質の認識機構. TF は 4 箇所の疎水性に富んだ基質結合サイトを用いて変性状態の基質の疎水性領域を保護することによって凝集を抑制する。

った。その結果、PhoA との相互作用解析・立体構造解析から決定された 4 箇所の基質結合サイト (Fig. 2) は複数の基質タンパク質との相互作用において共通して用いられていることが明らかになった。このように、TF は様々な配列をもつ基質タンパク質を幅広く認識することが明らかになった。解析の結果、TF の基質サイト上のアミノ酸側鎖は柔軟にそのコンフォメーションを変化させることによって様々なアミノ酸を受け入れていることが明らかになった。この柔軟性は、新生タンパク質の大部分と相互作用するという TF の機能上重要な性質であると考えられた。一方で、4 箇所の基質結合サイトは弱い結合特異性を有し、基質の配列によっては特定の基質結合サイトに結合することも明らかになるなど、シャペロンによる半選択的な基質認識について興味深い知見が得られた。

(B) TF による基質の折りたたみ補助機構の解明

シャペロンによる基質変性状態の基質タンパク質の認識については (A) にて理解が深まったが、基質とシャペロンとの相互作用がどのようにして基質タンパク質の折りたたみを助けるのかについてはほとんど理解が進んでいない。私たちは、シャペロンとの相互作用がどのように折りたたみの進行に寄与するのかを解明するため、相互作用解析、立体構造解析、ダイナミクス解析を行った。

(C) シャペロン間の連携機構の解明

シャペロンは単独で機能するのではなく、シャペロン間の相互作用を介したネットワークを形成することによって機能するが、その相互作用についてはほとんど明らかにされていない。本研究ではシャペロン間の相互作用解析・立体構造解析によって、複数のシャペロン間での共同性についてのメカニズム解明を目指した。

(D) ランタニドプローブ法の高度化

常磁性ランタニドイオンをタンパク質に固定することによって、タンパク質の NMR 信号からは、ランタニドイオンからの相対位置に依存した多様な常磁性効果が観測される。そのような常磁性効果はランタニドイオンから約 40 Å 以内という広範囲から観測されるため、その定量解

析によって長距離間の立体構造情報を取得することが可能である。この手法をシャペロンタンパク質の立体構造解析に応用するため、モデルタンパク質を用いた手法の高度化についても取り組んだ。マルチドメインタンパク質 MurD を用いた解析によって、リガンド結合に伴う柔軟な立体構造変化を迅速かつ定量的に解析することに成功した (Saio *et al.* 2015 Sci. Rep.). 溶液中のタンパク質の立体構造変化をバイアスなく迅速に解析する手法として、今後のさらなる発展が期待されている。

3. 今後の展開

本研究の推進によって、シャペロンによる動的・柔軟・かつ半選択的な基質認識認識について理解が深まり、シャペロンがどのようにして基質タンパク質の凝集を抑制するのかについても興味深い結果が得られている。さらにシャペロンによる折りたたみのメカニズムの一端が明らかになりつつあるなど、NMR を主体とした動的構造解析によってシャペロンの作用機序の核心へと迫る結果が得られている。今後のさらなる研究の継続によって、多くのシャペロンに共通する普遍的な作用機序が明らかになるなどさらなる発展が期待される。分子シャペロンは、新生タンパク質の折りたたみや輸送・分解といった新生鎖のプロセッシングに深く関与し、細胞の恒常性を保つという生命の根幹をなす重要なイベントにおいて重要な働きをする。そのため、本研究によってシャペロンの本質的な作用機序が明らかになることによって、タンパク質凝集体やアミロイド繊維との関連が指摘されるアルツハイマー病や ALS などの神経変性疾患に対する有効な治療薬の開発へとつながると期待される。さらに本研究の推進によって確立される、過渡的複合体に対する解析手法は、タンパク質輸送や分解など、過渡的複合体によって制御される多くの生体システムの解析に対する強力なツールを提供することになると期待される。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

研究期間開始後に米国から日本へと研究実施場所を変え、新たな環境での実験環境の整備から開始した。機器の選定や設置、実験環境の整備などには時間と労力を要したが、早急に研究環境を整備し、申請時の研究計画についてはおおむね順調に進行した。さらに、さがけ採択後に、領域内での共同研究を開始し研究を発展させるなど、バーチャル・ネットワーク型研究所としてのさがけの利点を最大限活用した研究活動を行った。さがけ内での連携によって多様な研究手法を相補的に組み合わせ、当初予想していなかった展開・成果が得られるなど、大きな発展が得られた。さがけの研究期間で確立した研究体制は、さがけの研究期間だけのものではなく、研究期間が完了した後にもさらに研究を発展させると期待される。さがけの研究成果によって、国際学会や国内有数の学会を含む多数の学会・シンポジウムにおいて招待講演を行うなど、本研究の成果は国内外から高く評価された。また、さがけ研究で得られた成果によって新たに競争的外部資金を獲得するなど、研究を大きく発展させた。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

新生タンパク質に結合するトリガーファクター(TF)を取り上げ、その基質認識機構とシャペロンタンパク群との相互作用について NMR 等の物理化学的手法による解明を目指した。PhoA を基質として用い TF 上の4箇所の基質結合サイトを見出し、それらは複数の基質に対しても用いられることを示し、基質認識の幅広さを担っていることを明らかにした。さらに、PhoAとTFの相互作用の詳細解析を行っており、ダイナミックな変化を追うことに成功し、論文文化に向け準備している。他のさきがけ研究者との共同研究も進展している。また、ランタニドプローブ法の高度化にも取り組み、論文発表した。タンパク質立体構造形成の普遍的メカニズムを解明しつつあり、重要な成果が得られつつあると評価できる。

5. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. Saio T, Ogura K, Kumeta H, Kobashigawa Y, Shimizu K, Yokochi M, Kodama K, Yamaguchi H, Tsujishita H, Inagaki F. Ligand-driven conformational changes of MurD visualized by paramagnetic NMR. *Sci Rep*. 2015, 5, 16685. doi: 10.1038/srep16685.
2. Imai M, Saio T, Kumeta H, Uchida T, Inagaki F, Ishimori K. Investigation of the redox-dependent modulation of structure and dynamics in human cytochrome *c*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016, 469, 978–84. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.12.079.

(2)特許出願

研究期間累積件数:0 件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

A. 著作物

1. Saio T, Inagaki F. Structural Study of Proteins by Paramagnetic Lanthanide Probe Methods. *Springer*, In: Experimental approaches of NMR spectroscopy –Methodology and application to life science and materials science–, Chapter 8, *in press*.
2. 斉尾智英 トリガーファクターシャペロンによる動的基質認識の構造基盤. *生化学*, 2016, 88, 406–610.
3. Saio T, Inagaki F. Structural biology with advanced NMR technique. Springer, In: Advanced Methods in Structural Biology, Chapter 17, 2016, 315–340.

B. 主要な国際学会発表

【招待講演】

1. The 5th International Symposium on Drug Discovery and Design by NMR, 横浜, “Visualizing conformational changes of MurD by paramagnetic lanthanide probe”, 2016 年 8 月
2. JST CREST-PRESTO joint international symposium Structural Biological Dynamics: From Molecules to Life with 60 trillion Cells, Tokyo, “Structural insight into multitasking molecular chaperone Trigger Factor”, 2015 年 11 月
3. 6th Asia-Pacific NMR Symposium, Hong Kong, “Structural insight into multitasking

molecular chaperone Trigger Factor”, 2015 年 8 月

【一般発表】

4. The 42nd Naito Conference In the Vanguard of Structural Biology: Revolutionizing Life Sciences, 札幌, “Structural basis for the foldase activity of dimeric molecular chaperone Trigger Factor”, 2016 年 10 月 (ポスター)
5. 27th International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems (ICMRBS), 京都, “Structural basis for the foldase activity of Trigger Factor chaperone”, 2016 年 8 月 (ポスター)

C. 主要な国内学会発表

【招待講演】

1. 第 17 回 日本蛋白質科学会年会, 仙台, “Exploring conformational equilibria of a multi-domain protein MurD by paramagnetic lanthanide probe in NMR and EPR”, 2017 年 6 月
2. 第 53 回日本生物物理学会年会, 金沢, “Dynamic Recognition of Unfolded Proteins by the Trigger Factor Chaperone as Characterized by NMR”, 2015 年 9 月

【一般発表】

3. 第 38 回日本分子生物学会 第 88 回 日本生化学会大会 合同大会, 神戸, “NMRによって明らかにするトリガーファクターシャペロンの分子機構”, 2015 年 12 月 (口頭 + ポスター)
4. 第 54 回 NMR 討論会, ”ランタニドプローブ法を用いたマルチドメインタンパク質の構造推移解析”, 2015 年 11 月 (口頭)
5. 第 42 回 生体分子科学討論会, ”NMR ランタニドプローブ法による MurD の構造推移解析”, 2015 年 6 月 (口頭)

D. プレスリリース

1. タンパク質の立体構造変化を迅速に解析する手法を開発 ~新規薬剤開発への展開へ期待~ (2015 年 11 月 20 日) https://www.hokudai.ac.jp/news/151120_cris_pr.pdf