

研究課題別評価

1 研究課題名： 蛋白質の「配列－構造－安定性」関連の系統的解析

2 研究者氏名： 高野和文

3 研究のねらい：

蛋白質は、そのアミノ酸配列に起因して特異的な立体構造を形成するが、そのメカニズムはまだ明らかにはなっていない。本研究では、この課題に対して、直接実験で「配列と構造」の関係を構築することで新たな知見を得ることを試みる。具体的には、ある10残基程度のアミノ酸配列を蛋白質の種々の環境に導入し、その配列がどのような因子に規定され立体構造を形成するのかを調べる。

4 研究成果：

(1) アミロイド性配列の構造特性

アルツハイマー病やプリオン病をはじめとする様々なヒトの病気では、蛋白質が条件により α 構造から β 構造へと変化し、繊維状の凝集体を形成することが病気の原因であるといわれている。そこでアルツハイマー病における老人班の主成分であるアミロイド β ペプチド($A\beta_{1-42}$)の線維化に重要と考えられている Tyr10-Val24 ($A\beta_{10-24}$)と Lys28-Ala42 ($A\beta_{28-42}$)の領域の配列をRNaseHIIIのC末端領域の種々の部位に導入した変異体を作製し、そのX線結晶構造解析を行った。 $A\beta_{1-42}$ は凝集しやすいという特性から水溶液中での構造はまだ明らかになっていない。作製した変異体のうち、変異体 RNaseHIII₁₋₁₉₇- $A\beta_{28-42}$ について結晶構造を得ることができた。その結果、RNaseHIII₁₋₂₁₂(WT)では α ヘリックス構造を形成しているC末端領域が、変異体 RNaseHIII₁₋₁₉₇- $A\beta_{28-42}$ では逆平行 β シート構造を形成していた(図1)。この結果は、水溶液中の $A\beta_{1-42}$ において、 $A\beta_{28-42}$ が β 構造を形成していることを示唆している。この $A\beta_{28-42}$ の構造は、水溶液環境下における $A\beta_{1-42}$ の初めての原子レベルでの構造である。さらに、作製した変異体のアミロイド線維形成能の測定などから、図2に示すような $A\beta_{1-42}$ の水溶液環境下における構造変化のモデルが提案できた。

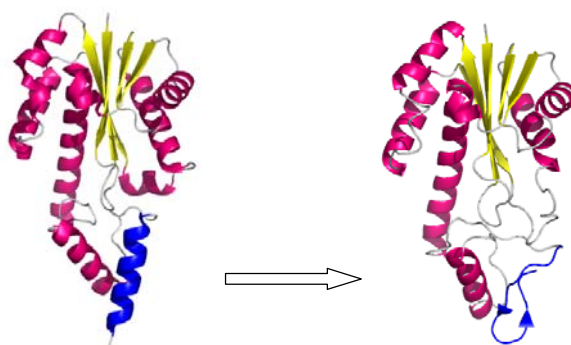


図1 RNaseHIII₁₋₂₁₂(WT)(左)とRNaseHIII₁₋₁₉₇- $A\beta_{28-42}$ (右)の構造

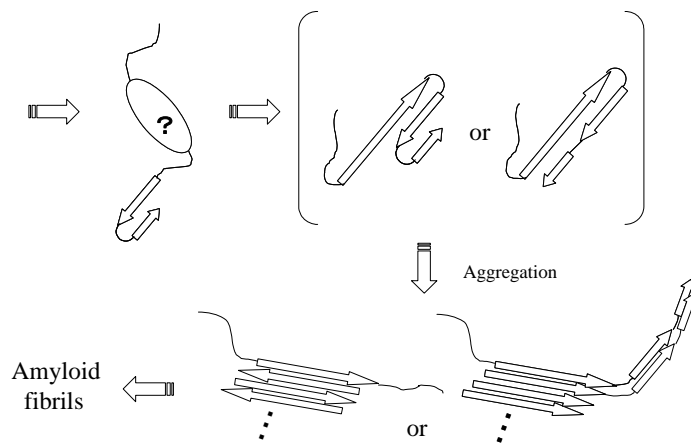


図2 Aβ₁₋₄₂の水溶液環境下における構造変化モデル

(2) カメレオン配列の構造特性

同じアミノ酸配列でありながら蛋白質の立体構造中で異なる二次構造を形成する配列は、「カメレオン配列」と呼ばれている。そこで天然蛋白質中に見出されたカメレオン配列の一つ「TQDMINKST」を他の蛋白質のC末端領域の種々の部位に導入した変異体を作製し、そのX線結晶構造解析を行った。その結果、このカメレオン配列は、他の蛋白質の二次構造上に導入した場合、同様の二次構造を形成した。一方、二次構造以外の部位に導入した場合は、構造を形成していなかった。これらの結果は、天然蛋白質中に見出されたカメレオン配列が、他の環境においても環境に依存して構造を形成すること、さらにその形成には配列上隣接した二次構造が必要なことが明らかになった。このことから、蛋白質の構造構築原理に、構造の「接触感染」現象があることを見出した。

5 自己評価:

当初予定していたほどの量と質の実験データを得ることができなかった。しかし、蛋白質の立体構造の構築原理の解明に向けた直接的なオリジナルな実験研究にあえて一から取り組み、アミロイドペプチドの構造を初めて明らかにした点や、構築原理に新しい現象を見出した点などは、常法の研究により得られる成果とは異なる意義のある成果を得ることができた。

6 研究総括の見解:

蛋白質設計に関する分野においては重要な研究である。アミロイド性配列については一定環境下における構造と配列の関係を把握し成果を挙げたが、カメレオン配列については何をすることが重要なのかの位置づけが今ひとつ明確にならなかったように思う。なお、本来の研究からは外れるが、関連研究者との結晶化ベンチャー(創晶)立ち上げを本人が主導し成功に導いている。さきがけ研究のひとつのあり方を見ている気がする。

7 主な論文等:

論文

1. Takano K, Endo S, Mukaiyama A, Chon H, Matsumura H, Koga Y, Kanaya S. (2006) Structure of amyloid β fragments in aqueous environments. FEBS J. 273, 150–158.

研究課題評価

1 研究課題名: シャペロニンの役割の解明による効率的なタンパク質折りたたみ法の確立

2 研究者氏名: 田口 英樹

3 研究の狙い:

Anfinsen のドグマで知られるように、タンパク質の折れたたみは他からのエネルギーを必要としない自発的に進行するプロセスである。しかし、細胞内の多くのタンパク質の折れたたみにはシャペロンが必要である。さらには、必須のシャペロンであるシャペロニン GroEL の場合、ATP の加水分解まで必要である。はたして、シャペロニンはタンパク質の折れたたみに対していったい何をしているのだろうか。逆に、シャペロニンに折れたたみが助けられるタンパク質(基質タンパク質)の性質とはどのようなものであろうか。本研究では、シャペロニンと基質タンパク質双方をさまざまな手法で解析し、シャペロニンによるタンパク質折れたたみの全容解明を目指した。

4 研究成果:

(1) シャペロニンの反応サイクル ダブルタイマー機構

大腸菌のシャペロニンはダブルリング構造の GroEL と補助因子 GroES からなる分子量 90 万におよぶタンパク質複合体である。GroEL は ATP 存在下で大きく構造変化したのちに GroES と結合し、大きな空洞を形成する。その空洞には基質となる変性タンパク質が閉じ込められて、その「ゆりかご」の中で凝集の危険から免れた基質タンパク質は折れたたみを完了することが知られている。このシャペロニンの機能(GroEL と GroES の結合・解離、変性 GFP のシャペロニン空洞内での折れたたみ)を1分子イメージングで解析し、さらには ATP 加水分解活性の速度論解析なども行った結果、我々は GroEL の反応サイクルは二つの独立したステップが連続して起こる「ダブルタイマーモデル」に従うことを提案した(図1)。

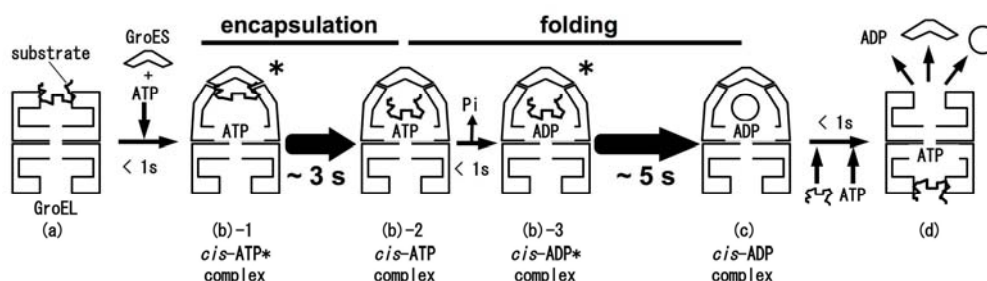


図1 シャペロニン GroEL-GroES の反応サイクルモデル

また、このサイクルにおいて基質タンパク質がどのように構造変化していくのか調べるために、シャペロニンの基質としてよく用いられる Rubisco タンパク質に部位特異的に2種類の蛍光色素を導入して分子内蛍光共鳴エネルギー解析もおこなった。

(2) 基質タンパク質を空洞内に閉じ込めたシャペロニン複合体を用いた研究

(a) 基質タンパク質を閉じ込めたシャペロニン複合体の立体構造

GroEL の ATPase サイクルが変性タンパク質によって大きく加速されること、比較的大きなタンパク質の空洞内での折れたたみはかなり窮屈になることなどから、GroEL 自身が基質タンパク質の折れたたみに何らかの作用を及ぼしているのではないかと予想されている。まず、基質タンパク質を空洞に含んでいる GroEL-GroES 複合体の立体構造はどうなっているのだろうか。好熱菌の GroEL-GroES 複合体は安定で、精製中も複合体が解離しないので、細胞内でシャペロニンの基質タンパク質を含んだまま精製できる。その立体構造を決定したところ、興味深いことに GroES が結合している GroEL の頂点ドメインだけが大きく歪んでおり、特徴的な七回対称から大き

く崩れていることがわかった。X線結晶解析では基質タンパク質の電子密度は見えていないが、生化学的な解析からは歪みの見えた GroEL リングは基質タンパク質を含んでいるので、基質タンパク質の存在が歪みを生じさせたのではないかと考えている。

(b) in vivo で空洞に入る基質タンパク質の同定

上記の好熱菌 GroEL-GroES 複合体には多くの種類の基質タンパク質が含まれている。そこでプロテオーム的な手法で基質タンパク質の同定を行い、シャペロニンの空洞内に入る23種類の基質蛋白質のリストを作った。

(c) 基質タンパク質を閉じ込めるのに必須の残基

好熱菌 GroEL-GroES 複合体には大腸菌の複合体では見つかっていなかった GroEL と GroES の接触部位が存在していた。この接触部位の中の保存された疎水性残基を親水性に置換した GroEL をもつ大腸菌は生育できないことから、この残基の重要性が確認できた。また、in vitro でその変異をもつ GroEL は基質タンパク質を GroEL-GroES の空洞内に閉じ込めることができないことがわかった。

(3) 必須因子のみからなる無細胞タンパク質合成系(PURE システム)を用いたシャペロニン

GroEL の役割解明

in vitro で GroEL がタンパク質の折れたたみを助ける実験では、既に天然構造を取っているタンパク質を尿素や熱などで変性させて用いるので、翻訳後できてきた新生ポリペプチドの折れたたみのようすを調べることはできない。シャペロニンが新生ポリペプチドのフォールディングの際、どのようにはたらいているのかを調べるために、最近開発された必須因子からなる無細胞タンパク質合成系(PURE システム)を用いた。PURE システムは通常用いられる細胞抽出液を用いた無細胞タンパク質合成系とちがひ、シャペロンをまったく含まない。そこで、翻訳の際に GroEL がどのように影響するかを純粋に調べることが可能である。PURE システムでさまざまなタンパク質を翻訳させたところ、GroEL-GroES があるときに可溶性が大きく上昇するタンパク質が存在した。また、これまで、GroEL は翻訳後に折れたたみを助けると信じられてきたが、我々の結果からは、翻訳に共役して、つまりリボソームから新生ポリペプチドが解離する前から GroEL は関与して、折れたたみを助けることを見いだした。さらに、PURE システムだけでなく、大腸菌内においても GroEL は翻訳途中のリボソームに新生ポリペプチドを介して結合していることも見いだした。

5 自己評価

以上のように本研究により、シャペロニン GroEL の作用機構の理解が大きく深まったと考える。特に従来あまり顧みられることがなかった基質タンパク質が存在するところで GroEL がどのようにはたらくか、構造がどうなっているのかに関して大きな進展があった。

これまで GroEL の研究は in vitro の研究が先行しており、細胞内で実際にどうはたらいているのかは意外なほどわかっていない。本研究で明らかになった空洞内に入る細胞内基質タンパク質のリストや新生タンパク質の折れたたみにおけるシャペロニンの役割は、今後 GroEL が細胞内でどのようにはたらいているかを知るための重要な知見になると考える。

また、本研究では十分に追究できなかったが、折れたたみが非常に困難なタンパク質がなぜシャペロニンの空洞内では折れたたむのかについて今後研究を進めていきたい。シャペロニンがないと折れたたみが進行しないように見えるタンパク質では、シャペロニンが積極的にタンパク質を「折りたたんで」いる可能性も示唆されてきている。もし、そうであるならば、シャペロニンはどのような作用を基質タンパク質に及ぼすのであろうか。今後も研究を進めていき、究極的にはシャペロニンを有効に用いて効率的なタンパク質折りたたみ法を確立したいと考えている。

6 研究総括の見解

シャペロニン複合体の反応サイクル機構解明や、基質タンパク質が存在する場での GroEL の役割や構造解明に大きな進展があった点、評価している。特にシャペロニンの働きをタンパク質

物性のレベルで考えられるようにしたことは大きな成果といえる。この分野では世界をリードする研究者であり、今後の研究進展が非常に期待できる。

7 主な論文等:

論文

1. Ueno, T.*, **Taguchi, H.***, Tadakuma, H., Yoshida, M., Funatsu, T. [* equally contributed] “GroEL mediates protein folding with a two successive timer mechanism” *Mol. Cell* **14**, 423-434 (2004)
2. Shimamura, T., Koike-Takeshita, A., Yokoyama, K., Masui, R., Murai, N., Yoshida, M., **Taguchi H.**, Iwata, S. “Crystal structure of the native chaperonin complex from *Thermus thermophilus* revealed unexpected asymmetry at the *cis*-cavity.” *Structure* **12**, 1471-1480 (2004)
3. **Taguchi, H.**, Tsukuda, K., Motojima, F., Koike-Takeshita, A., Yoshida, M. “BeF_x stops chaperonin cycle of GroEL/GroES and generates a complex with double folding chambers” *J. Biol. Chem.* **279**, 45737-45743 (2004)
4. Ying, B.-W. **Taguchi, H.**, Kondo, M., Ueda, T. “Co-translational involvement of the chaperonin GroEL in the folding of newly translated polypeptides” *J. Biol. Chem.* **280**, 12035-12040 (2005)
5. Koike-Takeshita, A., Shimamura, T., Yokoyama, K., Yoshida, M., **Taguchi, H.** “Leu-309 plays a critical role in the encapsulation of substrate protein into the internal cavity of GroEL.” *J. Biol. Chem.* **281**, 962-967 (2006)

(邦文総説)

- 1 小池あゆみ、田口 英樹 「分子シャペロン」(分担)in タンパク質科学—構造・物性・機能(化学同人) 291-302 (2005)
- 2 田口 英樹 「シャペロニン GroEL の作用機構:ATP と変性蛋白質の役割」生物物理 印刷中
- 3 田口 英樹、イン・ベイウエン、上田卓也 「翻訳時のシャペロンのはたらき」タンパク質社会学 実験医学別冊 23, 2248-2253 (2005)
- 4 河田 康志、田口 英樹、吉田 賢右 「シャペロニン GroEL の作用機構」蛋白質核酸酵素 **49**, 847-852 (2004)
- 5 上野 太郎、田口 英樹 「GFP1分子の折れたたみ観察から GroEL の機能を探る」実験医学 **22**, 90-91 (2004)