研究報告書

《まえがき》

分子シャペロン・ATP 依存性プロテアーゼの基質認識機構

Substrate Recognition Mechanisms of Molecular Chaperones and ATPdependent Proteases

(推薦:由良 隆 京都大学名誉教授)

研究代表者 金沢大学 金森正明 Kanazawa University Masaaki Kanemori

共同研究者 金沢大学 福森義宏 Kanazawa University Yoshihiro Fukumori

《本文》

〈研究日的〉

リボソームにより合成されたタンパク質が機能を発揮するためには、正しい立体構造をとらなければならない。タンパク質の立体構造はアミノ酸配列により決定されるが、合成直後の変性状態から正常な立体構造をとるために、多くのタンパク質が分子シャペロンと呼ばれる一群のタンパク質の助けを必要とする。最終的な立体構造に到達したタンパク質において、疎水性アミノ酸はタンパク質の内部に集合する傾向があるが、合成中は周囲の環境にさらされることになる。分子シャペロンは、合成途中にある変性状態のタンパク質の疎水性領域に結合して不適切な疎水結合を阻害すると考えられている。ATP 加水分解のエネルギーを利用して分子シャペロンが基質タンパク質から解離した後、タンパク質の折畳みが開始する。折畳みに失敗したタンパク質は、分子シャペロンと再び結合して折畳みをやり直すか、もしくはATP 依存性プロテアーゼにより分解される。ATP 依存性プロテアーゼは、分子シャペロンと同様に、変性状態のタンパク質を認識して結合する「分子シャペロンと同様に、変性状態のタンパク質を認識して結合する「分子シャペロンと同様に、変性状態のタンパク質を認識して結合する「分子シャペロンと同様に、変性状態のタンパク質を認識して結合する「分子シャペロンと同様に、変性状態のタンパク質を認識して結合する「分子シャペロン

SUMMARY

The E. coli heat shock transcription factor, 0³², is a very unstable protein, can be degraded by several ATP-dependent proteases, and its stability is subjected to dynamic regulation by molecular chaperones, such as DnaK and DnaJ. To gain new insights into the substrate recognition mechanisms of these proteolytic machinaries including chaperones, we have isolated several 032 mutants with markedly increased stability in vivo. The mutants obtained were found to contain one or more amino acid changes in region 2.1, one of the highly conserved regions among bacterial o factors. One mutant, with a halflife of more than 10 min (>10-fold higher than the wild type), contained two amino acid changes (L47Q and L55Q) in this region, whereas two other mutants, A50S and I54A, exhibited half-lives of about 5 and 10 min, respectively. Besides longer half-life, they all showed higher transcriptional activity and produced several-fold higher levels of heat shock proteins as comapred to the wild type. These results suggest the interesting possibility that part of region 2.1 of σ^{32} protein is involved in interaction with some proteolytic machinery, and that certain amino acid residues of this region are required for modulating activity as well as metabolic stability of σ^{32} .

様の活性」を持つ。個々の分子シャペロンや ATP 依存性プロテアーゼの基質 認識に関する情報はかなり蓄積しているが、分子シャペロン間や ATP 依存性 プロテアーゼ間、さらには分子シャペロンーATP 依存性プロテアーゼ間の基質認識機構の比較はほとんどなされていない。

分子シャペロンや ATP 依存性プロテアーゼが結合するとされている変性状態のタンパク質の構造は不安定で変化しやすい。そのような変性タンパク質を用いて、分子シャペロンや ATP 依存性プロテアーゼの基質認識機構を解析するのは困難であるが、大腸菌の転写開始因子の一つである σ^{32} は、転写開始因子としての活性を持つ正常に折り畳まれた状態で、複数の分子シャペロンや ATP 依存性プロテアーゼに認識される性質を持つ、非常にユニークなタンパク質である。本研究は、分子シャペロンや ATP 依存性プロテアーゼと結合できなくなった変異型 σ^{32} を分離して変異部位を決定し、分子シャペロンや ATP 依存性プロテアーゼの基質認識機構を比較することを目的とする。基質認識機構の比較は、進化の過程でよく保存された分子シャペロンや ATP 依存性プロテアーゼという生命の維持にとり重要な基本因子の作用機構の解明につながるだけでなく、細胞内でのタンパク質の立体構造形成に関する情報の提供を通して、人為的に細胞内でタンパク質を合成させるような研究への貢献が期待される。

〈経渦、成果〉

大腸菌の転写開始因子の1つである σ^{32} は、一群の熱ショックタンパク質 (DnaK や GroEL など)をコードしている熱ショック遺伝子群 (熱ショックレギュロン)の転写に必要とされる。 σ^{32} は半減期約1分と細胞内で素早く分解されるタンパク質であり、複数の ATP 依存性プロテアーゼ (FtsH、HsIVU、ClpAP、Lon)が σ^{32} の分解を担っている。さらに、分子シャペロンである DnaK や DnaJ をコードする遺伝子の変異株中では σ^{32} が分解されにくくなることから、これらの分子シャペロンも σ^{32} の分解に必要と考えら

れている。精製したタンパク質を用いた実験において分子シャペロンは σ^{32} と直接結合するから、細胞内での σ^{32} の素早い分解にも σ^{32} と分子シャペロンの結合の必要性が強く示唆される。したがって、細胞内で分解されにくくなった変異型 σ^{32} を分離すれば、分子シャペロンや ATP 依存性プロテアーゼの基質認識機構を比較するための有力な材料となることが期待される。このような考えに基づき、細胞内で分解されにくい変異型 σ^{32} の分離を開始した。

不正確な複製が起こる条件下で PCR を行い、 σ 32 をコードしている rpoH遺伝子のコーディング領域を増幅してランダムに変異を導入した。得られた 増幅断片を発現ベクターであるpTrc99A上のtrcプロモーター下流に挿入し、 大腸菌 KY1612 株を形質転換した。KY1612 株は rpoH 遺伝子を欠失してお り、 σ^{32} が合成されないため20℃より高温で増殖できない。また、 σ^{32} の 転写開始因子活性を調べるためのレポーター遺伝子として、KY1612 株は染 色体上に groE 熱ショックプロモーターに lacZ 遺伝子をつないだ融合遺伝子 を持つ。外から rpoH 遺伝子を導入して活性を持つ σ 32 が合成されると、groE熱ショックプロモーターから lacZ 遺伝子の発現を上昇させ、lacZ 遺伝子産 物であるβ-ガラクトシダーゼが合成される。β-ガラクトシダーゼ活性が高い ほど、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-D-ガラクトピラノシドを含んだ 寒天培地上で大腸菌は青いコロニーを形成する。PCR によりランダムに変異 を導入した rpoH 遺伝子を KY1612 株に入れ、30 \mathbb{C} で形成されたコロニー の中で青さの程度が高いものを選択すれば、細胞内のσ³²が増加した大腸菌 が得られると期待される。活性を持つ変異型 σ 32 を選択するので、変異によ り著しく立体構造が変化した σ^{32} はこの段階で排除される。一次スクリーニ ングとしてこのような実験を行い、約2000個の形質転換体より55個 の候補が得られた。pTrc99A 発現ベクターが持つ trc プロモーターは、イソ プロピル-β-D-チオガラクトピラノシド(IPTG)依存性であるが、IPTG を 含まない培地で適当量のσ³² が合成されるので、一次スクリーニングに用い た培地には IPTG を添加しなかった。

抗 σ^{32} 血清を用いたイムノブロッティングにより、得られた 5 5 株のうち増殖が非常に悪い 3 株を除いて細胞中の σ^{32} 量を調べると、期待通り σ^{32} の増加が見られたのは 2 7 株であった。熱ショックタンパク質の増加を指標にして σ^{32} の活性を調べると、 2 7 株のうち 1 5 株においては σ^{32} の増加に見合った熱ショックタンパク質の増加が見られず、変異により分解されにくくなった可能性はあるが、同時に立体構造の変化も予想されるため候補から除外した。

残り12株のうち多くのものは増殖が悪く、 σ^{32} の安定性を調べるパルスーチェイス実験が困難であった。 σ^{32} の増加が増殖阻害を引き起こしていることが予想されたので、変異型 σ^{32} をコードしている rpoH 遺伝子をプロモーター活性を弱めた pTrc99A 上の trc プロモーター下流に挿入した。それらのプラスミドで野生株(MC4100)を形質転換し、放射性メチオニンを用いたパルスーチェイス実験を行い、細胞内の変異型 σ^{32} の安定性を調べた。野生型と比較して10倍以上の安定化が見られた変異型 σ^{32} を合成している大腸菌2株からプラスミドを調製してtpoH遺伝子のDNA配列を決定したところ、どちらも tpoH 遺伝子に複数のアミノ酸置換を引き起こす変異が存在した。サブクローニングと部位特異的変異導入を行い、安定化を引き起こすアミノ酸置換を決定した結果、47番目のロイシンと55番目のロイシンが同時にグルタミンに置換したとき(この変異型 σ^{32} を「L47QーL55Q」と呼ぶことにする)、 σ^{32} が10倍以上安定化し、50番目のアラニンがセリンに置換(A50S)したとき、 σ^{32} は約5倍安定化することがわかった。

47番目から55番目のアミノ酸配列をみると、53番目がロイシン、54番目がイソロイシン、55番がロイシンと疎水性アミノ酸が連続しており、分子シャペロンやATP 依存性プロテアーゼへの親和性が高い領域であると予想された。そこで、これらの3つのアミノ酸残基をそれぞれアラニンに置換した変異型 σ^{32} を作製し、パルスーチェイス実験を行い安定性を調べた。 $L53A(53番目のロイシンがアラニンに置換した変異型<math>\sigma^{32}$)の半減期は野

生型とほとんど変わらず、L55Aはわずかに(2倍ほど)安定になった。 しかしながら、I54Aの半減期は野生型の約10倍と非常に安定化し、 σ^{32} の安定性の調節におけるこの領域の重要性が確認された。

以上のような実験の過程で、安定化した変異型 σ^{32} を合成している大腸菌は、同量の野生型 σ^{32} を合成している大腸菌と比較して、著しく熱ショックタンパク質(DnaK や GroEL)の量が増加していることを発見した。培地中の IPTG 濃度を変えることにより trc プロモーターから発現する rpoH 遺伝子の転写量を変化させる実験において、I 5 4 A の場合、野生型と比較して σ^{32} 量は 3 分の 1 程度であるにもかかわらず、DnaK や GroEL は逆に 3 倍ほど増加していた。このことは、4 7 番目から 5 5 番目のアミノ酸残基のうちいくつかのものは、 σ^{32} の素早い分解に関与するだけでなく、 σ^{32} の活性調節にも関与することを示唆する。

<考察>

細胞内で安定化する変異型 σ^{32} をいくつか分離することに成功した。このうちの3つの変異型 σ^{32} は、47番目から55番目の間のアミノ酸残基に変異を持っていた。この領域は、真正細菌の転写開始因子においてよく保存されている領域2.1の前半部分に当たる。さらに、同じ変異により σ^{32} の転写開始因子としての活性が上昇することも観察した。分子シャペロンである DnaK や DnaJ は、それらをコードする遺伝子の変異株を用いた実験から、細胞内の σ^{32} の素早い分解に必要とされることがわかっている。また、これらの分子シャペロンが σ^{32} の転写開始因子としての活性を調節していることも報告された。これらのことを考え合わせると、領域2.1の前半部分は分子シャペロンと相互作用する領域である可能性が高い。合成オリゴペプチドを用いて DnaK や DnaJ が基質タンパク質と結合する際、どのようなアミノ酸を好むかが調べられ、DnaK は3ないし5個の疎水性アミノ酸(特にロイシンやイソロイシン)が中央部分に連続して存在し、両端に正の電荷を持つ

塩基性アミノ酸(リシンやアルギニン)を含むオリゴペプチドに親和性が高いこと、一方、DnaJ は疎水性アミノ酸(特に芳香環を持つアミノ酸であるフェニルアラニン、トリプトファン、チロシン)が6個ほど連続して存在するオリゴペプチドに親和性が高いことが示された。このような観点から、領域2.1の前半部分を見ると、53番目がロイシン、54番目がイソロイシン、55番目がロイシンであり、51番目にリシンが存在するので、この領域は DnaK の結合部位である可能性が高い。現在、47番目から52番目のアミノ酸において、電荷を持つアミノ酸は反対の電荷を持つアミノ酸に、電荷を持たないアミノ酸でアラニン以外のものはアラニンに、アラニンはセリンに置換して安定性に及ぼす影響を調べている。

以前より、領域 2. 1 は RNA ポリメラーゼとの結合部位であることが示唆されてきた。変異型 σ^{32} の転写開始因子としての活性が増加していることと、RNA ポリメラーゼと結合した σ^{32} はプロテアーゼにより分解されにくいことを考え合わせると、今回得られた変異型 σ^{32} は、その変異のために分子シャペロンや ATP 依存性プロテアーゼとの親和性が低下したのではなく、RNA ポリメラーゼとの親和性が増加したことにより安定化した可能性がある。しかしながら、今回の現象は領域 2. 1 内の複数の変異において観察されており、複数箇所のアミノ酸置換により RNA ポリメラーゼとの親和性が同じように増加するということは考えにくい。 σ^{32} の安定化と RNA ポリメラーゼ への結合の関係を調べるため、現在、RNA ポリメラーゼとの結合に必要と考えられている他領域のアミノ酸置換変異を 1 5 4 A に導入した変異型 σ^{32} を作製している。

今後は精製したタンパク質を用いた実験も行い、タンパク質間の相互作用を調べ、さらに分子シャペロンや ATP 依存性プロテアーゼの基質認識機構に迫りたい。

〈研究発表〉

口頭発表

金森正明、堀越弥奈、福森義宏;大腸菌熱ショック転写因子 σ 32 の安定変異体の分離、第25回日本分子生物学会年会、2002、12、横浜