極限環境微生物学会 研究奨励賞受賞研究

Journal of Japanese Society for Extremophiles (2009), Vol. 8, 15-19

Iizuka R

Looking back on my research life

Laboratory of Bio-Analytical Chemistry, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan.

Corresponding author: Ryo Iizuka, iizuka@mol.f.u-tokyo.ac.jp

Phone: 03-5841-4761, Fax: 03-5802-3339

Received: May 17, 2009 / Accepted: May 21, 2009

研究奨励賞を受賞して -これまでの研究生活を振り返る-

東京大学 大学院薬学系研究科 生体分析化学教室 飯塚 怜

はじめに

細胞内のタンパク質の構造形成は、分子シャペロンと呼ばれる一群のタンパク質によって制御されている。分子シャペロンの主要なメンバーであるシャペロニン、変性タンパク質と結合し、ATP 依存的にその正常なフォールディングを介助する。アミノ酸配列の相同性からシャペロニンは、バクテリア型（バクテリア・ミトコンドリア・葉緑体に存在）と真核細胞型（古細菌・真核細胞の細胞質に存在）に大別される。真核細胞型シャペロニンは、バクテリア型シャペロニンに必須の補因子を持たないこと、プレフォルディングと呼ばれる補助シャペロンと協調的に機能することから、そのタンパク質フォールディング機構には高い関心が寄せられてきた。しかしその機構に関する理解は未だに進んでいない。筆者は学部4年次から現在に至るまで、超好熱性古細菌 *Thermococcus* sp. strain KS-1 (*T. KS-1*) 由来のシャペロニン、超好熱性古細菌 *Pyrococcus horikoshii* OT3 および *T. KS-1* 由来プレフォルディングを用いて、真核細胞型シャペロニンによるタンパク質フォールディング機構に関する研究を行ってきた。この度の研究奨励賞の対象となったのは、この一連の研究である。僭越ながら本稿では、これまで行ってきた研究を、投稿論文には記載できないエピソードを踏まえながら、紹介させて頂く。

学部4年一修士課程：敗者復活戦の気持ちで始めた研究

超好熱性古細菌のシャペロニンとの出会いは、突然であった。筆者が養王田正文先生（東京農工大）の研究室に配属になって最初に始めた仕事は、*P. horikoshii* 由来の Lon protease と V-type ATPase の回転モータ部分を大腸菌で組換え発現させることであった。研究室に入りたてで実験に不慣れであったため基本操作の失敗を繰り返し、発現系すらなかなか完成させられずにいた。仕事を始めて2ヶ月が経過したある日、養王田先生から「吉田君（吉田尊雄さん、現在 JAMSTEC）が就職するかもしれないから、その仕事を引き継ごう。君なら、習ってきたことをこっちにトランスファーできるだろうから」と言われ、夜行バスで釜石の海洋バイオテクノロジー研究所へと赴いた。当時吉田さんは、丸山正先生（現在、JAMSTEC）のもとで *T. KS-1* のシャペロニンの研究を行っていた。夜行バスで釜石に辿り着いたその朝から、シャペロニンの精製がスタート。タンパク質を扱うのは、学生実験を除けばこの時が初めてで、言われるがまま、朝から夜中近くまで作業すること5日。なんとかシャペロニンの精製方法と活性測定法をマスターし、研究室に戻った。そして敗者復活戦の気持ちで、卒業研究の仕事を始めた。

T. KS-1 シャペロニンには、 α , β の2つのサブユニットが存在する。吉田さんは博士課程の時に、各サブユニットを大腸菌で組換え発現させると、単独で

シャペロニンに特徴的なオリゴマー構造を形成し、ATP加水分解活性を示すことを明らかにしていた。不思議なことに、 β サブユニットのホモオリゴマー（以下、 β シャペロニンと呼ぶ）にはタンパク質をフォールディングする活性が認められたのに対し、 α サブユニットのホモオリゴマー（ α シャペロニン）はその活性を示さなかった¹¹⁾。後に、 α サブユニットの発現系には2箇所点変異が入っており、その遺伝子産物は65番目のグリシン（Gly-65）がシステインに、125番目のイソロイシンがスレオニンに置換していることが分かった。これらの変異を元に戻した、すなわち野生型の α シャペロニンは、タンパク質フォールディング活性を示した¹²⁾。 α サブユニットの65番目のグリシンに相当するアミノ酸残基は、他の真核細胞型シャペロニンにおいても非常によく保存されており、*T. KS-1* シャペロニンのフォールディング活性発現の際、Gly-65が重要な役割を担っていると予想された。そこで、Gly-65を改変したシャペロニンの活性を調べることから、Gly-65の役割についての検討することが卒業研究のテーマとなった。この変異体解析から、65番目のアミノ酸残基がアラニンより大きくなると、ATPase活性、変性タンパク質との結合活性を有するものの、ATP依存的なタンパク質フォールディング活性が失われることを見出した。 α シャペロニンの結晶構造¹⁰⁾と対応させて考えると、Gly-65はATP加水分解の活性残基に隣接しており、ATPの結合あるいは加水分解に続いて、Gly-65周辺で構造変化が起こると予想された。このためタンパク質フォールディング活性の発現には、65番目の残基は立体的に自由度の大きいグリシンまたはアラニンでなければならないと考えられた。以上の結果を卒業論文としてまとめ、修士課程に進学してからはこの結果の再現性を確認するなどし、投稿論文として発表した²⁾。

修士課程ー博士課程：ひょんなことから始まった研究

修士・博士課程では、Gly-65変異体には認められない構造変化の実体に迫りたいと考え、シャペロニンの構造変化に関する研究を始めた。好酸好熱性古細菌 *Thermoplasma acidophilum* 由来のシャペロニンの結晶構造解析から、真核細胞型シャペロニンには、頂上ドメインの先端に Helical protrusion と呼ばれる特有の領域が存在し、これがシャペロニン中央の空洞に覆いかぶさることでフタの役割を果たしていること（Built-in lid）（Fig. 1）、そしてその開閉はATPの結合・加水分解により制御されていることが示唆されていた¹⁾。だが、研究者や生物種により得られている結果は様々であり、実際の反応機構との関連性や構造変化機構については不明な点が多かった。そこで、*T. KS-1* α シャペロニンのヌクレオチドによ

りもたらされる構造状態を検討することから、その問題に取り組むことにした。

「フタが閉じれば、シャペロニンの空洞内に変性タンパク質が閉じ込められる。空洞内に閉じ込められた変性タンパク質は、プロテアーゼを作用させても分解されないはず。これを指標にすれば、シャペロニンの構造状態が分かるはずだ」、このような作業仮説のもと実験を始めることにした。予想に反し、共存させるヌクレオチドの種類によって、野生型 α シャペロニンのプロテアーゼ感受性が大きく異なる結果が得られた。これに対し、前述の Gly-65 変異体（ α G65C, α G65S）は、ヌクレオチドの種類を変えてもプロテアーゼ感受性に違いは認められなかった。添加するプロテアーゼの量や種類を変えてみても同じ結果が得られ、これは大発見ではないかと感じた。シャペロニンのどの部位がプロテアーゼで分解されているのか、それを調べてみたところ、Helical protrusion が非常に分解を受けやすいことが分かった。また Helical protrusion のプロテアーゼ耐性は、シャペロニンと ATP が結合した際に（加水分解が起こる以前に）、もたらされることを突き止めた。さらに Buffer 条件をコントロールすることで、シャペロニンの Lid が閉じた状態にロックしてみたところ、Helical protrusion の切断は阻害された。「ATP の結合によりシャペロニンに大きな構造変化が起こり、Helical protrusion のプロテアーゼ感受性が変化するのではないか。プロテアーゼ感受性が高いのは、Helical protrusion からなるフタが開いた状態で、感受性が低いのはフタが閉じた状態ではないか」と考えた。加えて、Helical protrusion にトリプトファンを導入し、ヌクレオチド依存的にその蛍光スペクトルがどのように変化するかを調べたところ、プロテアーゼ分解実験と全く同じ結果が得られた。古細菌のシャペロニンの構造状態を、Helical protrusion の動きと対応付けて明確に議論することができたのはこれが初めてであったので、この成果をまとめ、*Journal of Biological Chemistry* 誌へ投稿した。時をほぼ同じくして、真核細胞由来のシャペロニンを用いて筆者と同様の結果を示した論文が *Cell* 誌に掲載された⁸⁾。この論文が追い風となり、筆者の論文は大きなクレームがつくことなくアクセプトされた³⁾。

「Helical protrusion はやはり、真核細胞型シャペロニンの空洞にフタとして機能するのであろう。これがなくなったら、真核細胞型のシャペロニンはどうなるのだろうか？」次にこの疑問を解決すべく、 α シャペロニンの Helical protrusion を遺伝子工学的に欠損させた変異体を作成し、その機能解析を行うことにした。ちょうどこの仕事が軌道に乗り始めた頃、養王田先生が参画していた特定領域研究（タンパク質の一生）の班会議で、桑島邦博先生（当時は東大、現在は岡崎統合バイオサイエンスセンター）と伊野

部智由さん（当時は東大、現在は Northwestern 大）と昼食を共にすることになった。桑島先生と伊野部さんは、バクテリア型シャペロニンの分子機構を X 線小角散乱法や速度論的な手法により解析を行っていて、真核細胞型シャペロニンについて強い関心を抱いていた。互いにすぐ意気投合し、筆者が行っていた Helical protrusion 欠損変異体の構造状態を X 線小角散乱法により詳細に調べる運びとなった。この共同研究が実を結び、Helical protrusion がほんの少

しでも欠損すると、ATP と結合してもフタが閉じた構造には転換せず、タンパク質フォールディング活性も失われることが分かった。また、変性タンパク質との結合に必要な部位であると考えられていた Helical protrusion が、その結合にほとんど関与しないことを明らかにした⁴⁾。この研究成果をまとめた論文は、度々シャペロニンのレビューに引用されており、シャペロン研究に重要な足跡を残すことができたのではないかと感じている。

Fig. 1 *Thermoplasma acidophilum* 由来シャペロニンの結晶構造

(A) α サブユニットの構造。赤道（赤色）、中間（青色）、頂点（緑色）の3つのドメインからなる。真核細胞型シャペロニンの頂点ドメインの先端には、Helical protrusion（黄色で表示）と呼ばれる特有の領域が存在する。(B) シャペロニンの全体構造。原子分解能で構造が決定されているのは、両側のリングが閉じた構造だけである。(C) 上から見たシャペロニンの構造。2種類のサブユニット（緑色： α サブユニット、黄色： β サブユニット）が交互に並んで8量体のリングを形成している。各サブユニットの Helical protrusion 同士が相互作用することで、シャペロニン中央の空洞にフタをする。

学部4年生～博士課程：もう1つの研究

真核細胞型シャペロニンは、プレフォルディンと呼ばれる補助シャペロンと協同的にタンパク質のフォールディングを介助しているということが示唆されていた。プレフォルディンの役割は、変性タンパク質を捕捉してその凝集を防ぎ、真核細胞型シャペロニンに引き渡すことであると考えられていたが (Fig. 2)、タンパク質の受け渡し機構など、その協調作用については不明な点が多かった。筆者は、*T. KS-1* シャペロニンと *P. horikoshii* 由来プレフォルディン (*Ph* プレフォルディン) を用いて、両者の協調作用機構に関する研究にも携わっていた。

筆者が学部4年生の1月に、3年生の授業の非常勤講師として招かれていた上田宏先生（東大）と出会った。その出会いは突然で、上田先生が授業で使う OHP を講義室に運ぶよう、養王田先生に命じられたのがきっかけである。学外の先生の話の聞けるチャンスはそうそうないと思い、その授業を聴講することにした。その中で、Biacore に関する話に興味を

覚え、タンパク質間相互作用を解析するのに非常に優れたツールだと感じた。そしてこれを用いれば、シャペロニンとプレフォルディンの相互作用を詳しく調べられるのではないかと考えた。授業が終わるや否や、上田先生と養王田先生にお願いして、Biacore を用いた実験の承諾を得た。修士課程への進学を控えた春休みに、上田先生の研究室にお邪魔して直々に Biacore の操作法をご教授頂いた。予備的な実験ではあったが、*T. KS-1* α シャペロニンと *Ph* プレフォルディンの相互作用を示すシグナルとして現れ、自分の直感が正しかったと感じた。結果を養王田先生に見せたところ、大変気に入ったようで、研究室で Biacore を購入することになった。そして、当時養王田研の助手だった大河内美奈さん（現在、名古屋大）と悪戦苦闘しながら、*T. KS-1* α シャペロニンと *Ph* プレフォルディンの相互作用カイネティクスを明らかにした⁹⁾。この実験系はその後両者の相互作用部位の同定に大いに役立った^{9,14)}。

筆者の初めての学会発表は、修士1年の6月に行

われた蛋白質科学会であった。この学会で、養王田先生の出身研究室の後輩である座古保さん（当時は早稲田大、現在は理化学研究所）と出会った。当時座古さんは、前述の上田先生の指導のもと学位を授与し、博士研究員として船津高志先生（当時は早稲田大、現在は東大）の研究室に異動したばかりであった（船津先生は、世界で初めて溶液中の蛍光 1 分子を可視化した人であり、蛍光 1 分子イメージングの大家である）。研究テーマを模索していた座古さんに、養王田先生がシャペロニンとプレフォルディンの協調作用解析を共同研究として行うことを提案した。そしてその 3 ヶ月後、「Ph プレフォルディンが捕捉した変性タンパク質を *T. KS-1* α シャペロニンに送り届け、シャペロニンがそれをフォールディングする」過程を 1 分子レベルで可視化することを目指し、船津研との共同研究が始まった。研究開始当初は、Ph プレフォルディンがガラス基板に激しく吸着することで、実験は難航した。いつからかこれを逆手に取り、以下に示す方法から Ph プレフォルディンと基質タンパク質の相互作用解析を行うことになった。Ph プレフォルディンと蛍光標識した変性タンパク質の混合溶液を経時的にサンプリングして、Ph プレフォルディンをガラス基板上に吸着させる。これを、全反射型蛍光顕微鏡により蛍光観察を行う。これにより、ガラスに吸着した Ph プレフォルディンに捕捉されている変性タンパク質に由来する蛍光のみが観察されることになる。この系を利用し、Ph プレフォルディンと蛍光標識した変性タンパク質の解離定数を求めることができた。また Ph プレフォルディンと変性タンパク質の混合溶液に、過剰量の蛍光標識していない変性タンパク質を添加し、同様の操作を行うことで、Ph プレフォルディンと変性タンパク質の解離速度定数を求めることができ、Ph プレフォルディンと基質タンパク質の結合がダイナミ

ックな平衡状態にあると分かった。さらに興味深いことに、この混合溶液に *T. KS-1* α シャペロニンを添加すると、変性タンパク質の解離速度が約 5 倍速くなることが分かった。この勢いに乗り、1 分子レベルで Ph プレフォルディンが捕捉した変性タンパク質が一方向的に *T. KS-1* α シャペロニンへと受け渡されることを示す結果を得た¹³⁾。

Fig. 2 真核細胞型シャペロニンとプレフォルディンの協調作用機構モデル

ポストドク時代：これまでよりも 1 段階進んだ研究

学位取得後は 1 年半養王田研に残り、博士論文を書きながら進めていた仕事を完成させた。真核細胞型シャペロニンは両側のリングが対称的に機能すると考えられていたが、*T. KS-1* α シャペロニンが ADP 及びフッ化ベリリウム存在下において片側のリングが閉じた非対称な構造体を形成することを見出し、新たな反応サイクルモデルを提唱した⁵⁾。また *Thermococcus kodakaraensis* のゲノム情報をもとに、*T. KS-1* のプレフォルジン遺伝子を新規にクローニング、その遺伝子産物を機能解析することから、*T. KS-1* 内で複数のプレフォルジン複合体が存在し、機能しうることを世界に先駆けて明らかにした（立命館大・今中忠行先生および関西学院大・藤原伸介先生との共同研究⁶⁾。さらに三木邦夫先生（京

大）との共同研究により、*T. KS-1* プレフォルジン β サブユニットの結晶構造を決定した。これまでに報告されているプレフォルジンの結晶構造に比べ、変性タンパク質及びシャペロニンとの結合に関与する部位の構造を詳細に決定するに成功した⁷⁾。

2006 年 4 月に日本学術振興会特別研究員 (PD) に採用され、以前共同研究の際にお世話になった船津先生の研究室に異動した。*T. KS-1* シャペロニンの機能を 1 分子レベルで詳細に捉えることを目指し、50 °C という高温条件下における 1 分子蛍光イメージングを、世界で初めて実現した。また蛍光色素 1 分子の偏光検出を行える観察系を確立し、 α シャペロニンの Helical protrusion の開閉を 1 分子レベルで可視化することに成功した。これは、反応サイクル中のシャペロニンの構造変化を 1 分子レベルでリアル

タイムに検出した最初の報告であり、古細菌のタンパク質をはじめとする高温 1 分子研究のマイルストーンとなると考えている（投稿準備中）。そして、現在に至る。

最後に

この度は、研究奨励賞を頂き、大変光栄に存じます。今後もこの賞を励みに、日々の研究に勤しんで参りたいと思っております。本研究は、東京農工大学 大学院工学府 養王田研究室、ならびに東京大学 大学院薬学系研究科 生体分析化学教室において遂行されました。ご指導、ご鞭撻、そして何より自分の考えを即実践できる自由な研究環境を与えて頂いた養王田正文教授、ならびに船津高志教授に厚く御礼申し上げます。また本研究を遂行するにあたり、非常に多くの方々にご協力を賜りました。その全ての皆様に心より、感謝致します。

References

- 1) Ditzel, L., Lowe, J., Stock, D., Stetter, K. O., Huber, H., Huber, R. and Steinbacher, S. (1998) Crystal structure of the thermosome, the archaeal chaperonin and homolog of CCT. *Cell* 93, 125-138
- 2) Iizuka, R., Yoshida, T., Maruyama, T., Shomura, Y., Miki, K. and Yohda, M. (2001) Glycine at the 65th position plays an essential role in ATP dependent protein folding by archaeal group II chaperonin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 289, 1118-1124
- 3) Iizuka, R., Yoshida, T., Shomura, Y., Miki, K., Maruyama, T., Odaka, M. and Yohda, M. (2003) ATP binding is critical for the conformational change from an open to closed state in archaeal group II chaperonin. *J. Biol. Chem.* 278, 44959-44965
- 4) Iizuka, R., So, S., Inobe, T., Yoshida, T., Zako, T., Kuwajima, K. and Yohda, M. (2004) Role of the helical protrusion in the conformational change and molecular chaperone activity of the archaeal group II chaperonin. *J. Biol. Chem.* 279, 18834-18839
- 5) Iizuka, R., Yoshida, T., Ishii, N., Zako, T., Takahashi, K., Maki, K., Inobe, T., Kuwajima, K. and Yohda, M. (2005) Characterization of archaeal group II chaperonin-ADP-metal fluoride complexes: Implications that group II chaperonins operate as a "two-stroke engine". *J. Biol. Chem.* 280, 40375-40383
- 6) Iizuka, R., Sugano, Y., Ide, N., Ohtaki, A., Yoshida, T., Fujiwara, S., Imanaka, T. and Yohda, M. (2008) Functional characterization of prefoldin complexes from a hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus* sp. strain KS-1. *J. Mol. Biol.* 377, 972-983
- 7) Kida, H., Sugano, Y., Iizuka, R., Fujihashi, M., Yohda, M. and Miki, K. (2008) Structural and molecular characterization of the prefoldin β subunit from *Thermococcus* strain KS-1. *J. Mol. Biol.* 383, 465-474
- 8) Meyer, A. S., Gillespie, J. R., Walther, D., Millet, I. S., Doniach, S. and Frydman, J. (2003) Closing the folding chamber of the eukaryotic chaperonin requires the transition state of ATP hydrolysis. *Cell* 113, 369-381
- 9) Okochi, M., Nomura, T., Zako, T., Arakawa, T., Iizuka, R., Ueda, H., Funatsu, T., Leroux, M. and Yohda, M. (2004) Kinetics and binding sites for interaction of prefoldin with group II chaperonin: contiguous non-native substrate and chaperonin binding sites in archaeal prefoldin. *J. Biol. Chem.* 279, 31788-31795
- 10) Shomura, Y., Yoshida, T., Iizuka, R., Maruyama, T., Yohda, M. and Miki, K. (2004) Crystal structures of the group II chaperonin from *Thermococcus* strain KS-1: Steric hindrance by the substituted amino Acid, and inter-subunit rearrangement between two crystal forms. *J. Mol. Biol.* 335, 1265-1278
- 11) Yoshida, T., Yohda, M., Iida, T., Maruyama, T., Taguchi, H., Yazaki, K., Ohta, T., Odaka, M., Endo, I. and Kagawa, Y. (1997) Structural and functional characterization of homo-oligomeric complexes of α and β chaperonin subunits from the hyperthermophilic archaeum *Thermococcus* strain KS-1. *J. Mol. Biol.* 273, 635-645
- 12) Yoshida, T., Yohda, M., Iida, T., Maruyama, T., Taguchi, H., Yazaki, K., Ohta, T., Odaka, M., Endo, I. and Kagawa, Y. (2000) Structural and functional characterization of homo-oligomeric complexes of α and β chaperonin subunits from the hyperthermophilic archaeum *Thermococcus* strain KS-1. [Corrigendum] *J. Mol. Biol.* 299, 1399-1400
- 13) Zako, T., Iizuka, R., Okochi, M., Nomura, T., Ueno, T., Tadakuma, H., Yohda, M. and Funatsu, T. (2005) Facilitated release of substrate protein from prefoldin by chaperonin. *FEBS Lett.* 579, 3718-3724
- 14) Zako, T., Murase, Y., Iizuka, R., Yoshida, T., Kanzaki, T., Ide, N., Maeda, M., Funatsu, T. and Yohda, M. (2006) Localization of prefoldin interaction sites in the hyperthermophilic group II chaperonin and correlations between binding rate and protein transfer rate. *J. Mol. Biol.* 364, 110-120