

研究概要

1. 目的及び背景

生体内で様々な機能を持って働くタンパク質は、mRNA から翻訳された一本鎖状のポリペプチドが、立体構造をとることにより作られる。しかし、細胞内ではタンパク質が高濃度に存在するため、絡まり合い、凝集してしまうことも少なくない。分子シャペロンは、様々なストレス(熱, 化学物質など)により変性したタンパク質に結合することで、凝集を防ぎ、正しい立体構造をとるように手助けをしている。

Prefoldin は分子量 90 kDa からなる分子シャペロンの一種で、2つの α サブユニットと4つの β サブユニットからなるヘテロ6量体を形成している。真核生物と古細菌の細胞質中に存在し、真核生物では、Prefoldin はすべて異なるタンパク質から形成されているのに対して、古細菌では、Prefoldin は α サブユニットと β サブユニットの2種類のタンパク質によって形成されている。この違いは、両者の基質特異性の違いを反映していると考えられている。すなわち、真核細胞の Prefoldin は細胞骨格を構成するアクチンやチューブリンを基質として、それらの正しい立体構造形成に関与しているのに対して、古細菌の Prefoldin は、特異的な結合タンパク質が見つからないため、詳細な役割はわかっていないが、より一般的な分子シャペロンとして機能していると考えられている。真核生物および古細菌由来の Prefoldin はともに、GroupII 型のシャペロニンと共役して働くことが知られている。Prefoldin は合成直後のポリペプチドを捕らえて安定化し、その後シャペロニンに受け渡すことで、タンパク質のフォールディングを促進していると考えられている。

これまでに古細菌 *Methanobacterium thermoautotrophicum* と *Pyrococcus horikoshii* 由来の Prefoldin (それぞれ MtPFD, PhPFD とする) の結晶構造がそれぞれ 2.3 Å と 3.0 Å 分解能で明らかになっている。全体構造はともに似ており、 α サブユニット2個と β サブユニット4個からなるヘテロ6量体構造を形成している。その形は‘くらげ’のような形をしており、コイルドコイルからなる6本の足が2個の β バレルからなる頭から突き出ている。また、電子顕微鏡により決定された三次元構造により、Prefoldin が‘くらげ’の足によって変性タンパク質を捕らえる様子が明らかになっている。

一般的に古細菌は1種類の α サブユニットと1種類の β サブユニットの遺伝子を持っていることが知られているが、最近のゲノム解析により、超好熱古細菌 *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 は α サブユニット、 β サブユニットそれぞれ2種類の遺伝子を持っていることが明らかになった (α サブユニットとして Tk1005, Tk1121, β サブユニットとして Tk0643 と Tk1122)。これと近縁種である *Thermococcus* strain KS-1 においても、同様に α サブユニットとして Ts1005とTs1121を、 β サブユニットとして Ts0643とTs1122を持っていることが明らかになった。これらのサブユニットを用いて考えられる4種類のヘテロ6量体 (Ts1005-0643, 1005-1122, 1121-0643, 1121-1122) について、生化学的解析が行われ、*in vitro* においてすべてシャペロン活性を持つことがわかっている。しかし、それぞれのサブユニットが *in vivo* でどのような役割を持っているか、なぜ2種類のサブユニットが2つずつ存在しているのかはよくわかっていない。本研究では、我々は Ts0643 の結晶構造を 1.9 Å 分解能で決定した。その構造から Ts0643 はホモ4量体で分

子シャペロンとして機能していることが考えられ、活性測定の結果、Ts0643 の4量体はシャペロン活性を有していることが明らかになった。

2. 実験方法

最初に、精製された Ts1121-0643 複合体を用いて結晶化を行った。結果 1,2-propanediol を主な沈殿剤とする条件で、蒸気拡散法により大きさ $0.2 \times 0.2 \times 0.15 \text{ mm}^3$ の結晶を得た。この結晶を用いて、SPring-8 BL41XU において X 線回折実験を行い、 1.9 \AA 分解能の回折データを得た。また、同様の条件で得られた結晶を、 10 mM KAu(CN)_2 を含む沈殿剤溶液に 26 時間浸透させた後、同様に X 線回折実験を行い、 1.9 \AA 分解能の回折データを収集した。得られた回折データはプログラム HKL2000 を用いて処理を行った。位相決定は、金原子誘導体結晶による回折データを利用した SIRAS 法により行った。金原子位置の同定および初期電子密度の改善にそれぞれプログラム SOLVE, RESOLVE を用いた。得られた初期電子密度から、結晶中には Ts0643 しか含まれていないことが予想された。初期電子密度を用いて、Ts0643 の構造モデルの構築および精密化を行った。構造モデルの構築にはプログラム Coot を、精密化にはプログラム CNS を用いた。分解能 $50\text{-}1.9 \text{ \AA}$ における、最終構造モデルの結晶学的 R 値は 17.7% 、 R_{free} 値は 19.4% となった。データ収集および構造精密化の統計値は Table 1 に記載した。

今回得られた結晶中に、Ts0643 しか含まれていなかったことを確かめるために、Ts0643 のみで精製および結晶化を行った。結果、同条件で結晶が得られた。X 線回折実験の結果、同様の格子定数および空間群であり、分子置換法により得られた電子密度において、大きな違いはなかった。このことから、上記の結晶は Ts0643 のみが結晶化したものであることが示された。

3. 結果

Ts0643 は非対称単位中に1分子存在しており、結晶学的4回軸により4量体を形成している(Figure 1a,1b)。4量体はすでに明らかになっている MtPFD や PhPFD に見られた‘くらげ’のような形をしており、1個の β バレルから4本のコイルドコイルによって作られた足が伸びている。その足の長さは 70 \AA になっている。頭部分を構成する β バレルは8本の β シートによって構成され、それぞれのサブユニットが2本の β シートを提供している。

Ts0643 の4量体は、結晶学的2回軸により2量体を形成し、8量体を形成している(Figure 2)。4量体中のコイルドコイルの足は、他方の4量体の足と接触しており、その接触面においては、表面に多く存在するグルタミン残基同士によって水素結合が形成されている。また、リジン残基が向かい合う接触面には、結晶化に用いた沈殿剤に含まれるクエン酸が位置しており、2量体間の結合を助けている。Ts0643 の溶液中での多量体状態について、サイズ排除クロマトグラフィーによる分子量分析の結果、Ts0643 は緩衝液の組成により4量体または8量体を取りうるということがわかった。以上のことから4量体の2量体化は、特異的な結合ではない弱い会合により起こっていると考えられる。

Ts0643 の単量体構造は、N 末ヘリックス、 β ヘアピンリンカー、C 末ヘリックスの3つの領域に分けられる(Figure 1c)。 β ヘアピンリンカーは上述したように、4量体の形成に役立っている。N 末とC 末のヘリックスは逆平行のコイルドコイルを形成しており、‘くらげ’の足に相当する。これらのヘリックスには7残基ごとのアミノ酸からなるヘプタドリピートが存在している。ヘプタドリピートはコイルドコイルを形成する構造中に多く見られ、その配列は $(a.b.c.d.e.f.g.)_n$ と表せる規則性があり、a と d の位置に疎水性アミノ酸が現れる。

ここで Ile4 は d の位置に相当しコイルドコイルの形成を助けられていると考えられるが、結晶構造中では Met1-Ile4 はループ構造になっていた。MtPFDF や PhPFDF においてはこの領域はディスオーダーしている。このループ構造は、結晶構造中で他の分子と接触しているため、観測できたと考えられ、この構造は溶液中でとりうる構造の1つであると考えられる。

MtPFDF や PhPFDF に見られた6量体構造と比較すると、Ts0643 の4量体は、これらの6量体から α サブユニットが抜け落ちたような構造をとっている (Figure 3). そのため、全体の幅は 70 Å から 50 Å に短くなっている。Ts0643 を MtPFDF の β サブユニットと重ね合わせたところ、非常によく一致した (r.m.s.d 1.4 Å, C α 原子 92 個). しかし、 β ヘアピンで重ね合わせてみると、コイルドコイルの足の先端部分は全ての β サブユニットにおいて、重ならなかった (Figure 4). このようなコイルドコイル部分の構造の柔軟性は、古細菌の Prefoldin が様々な大きさの分子を捕らえるのに役立っていると考えられる。

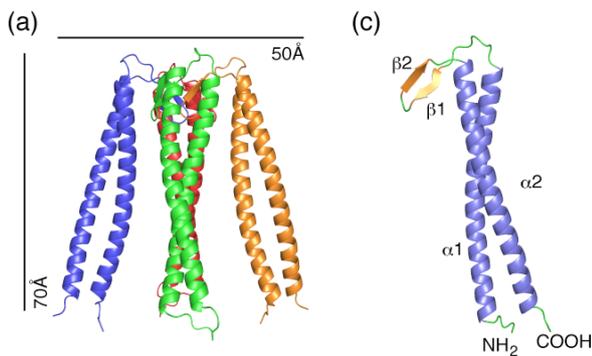


Figure 1. The "jellyfish-like" structure of Ts0643 tetramer complex

(a) The side view of Ts0643 tetramer generated by the crystallographic four-fold symmetry. The four subunits are colored blue, green, red and orange, respectively. (b) The top view of the Ts0643 tetramer complex. (c) The monomer structure of Ts0643.

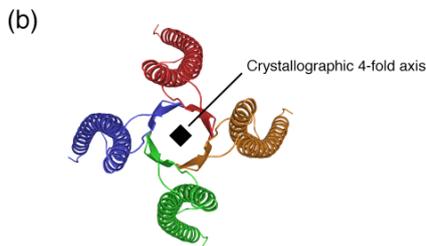
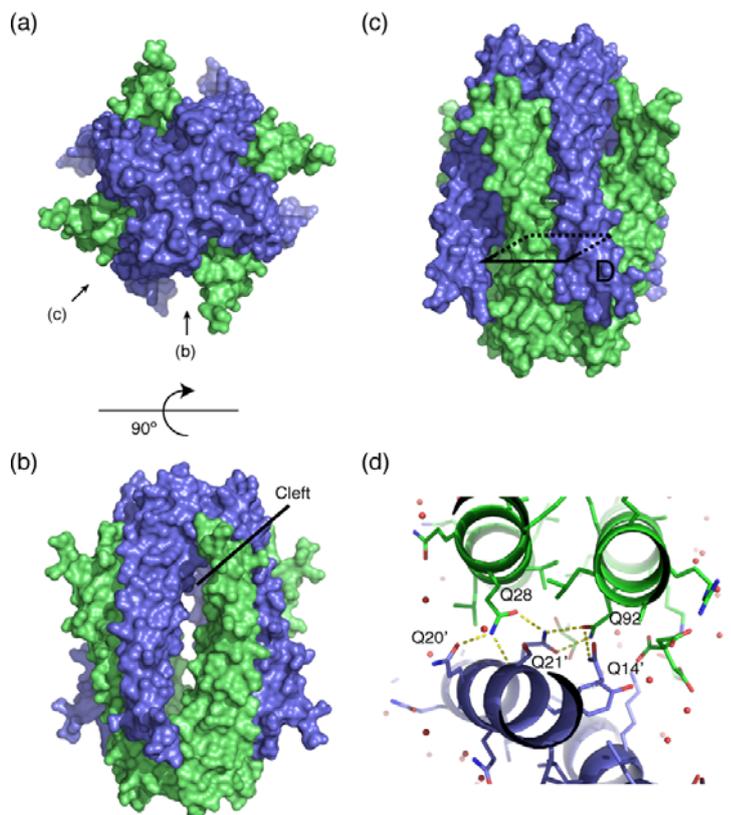


Figure 2. Surface representation of the dimer of the tetramer of Ts0643. Each tetramer is colored in green and blue. (a) The top view. (b) The side view. (c) Another side view. The structure is rotated 45° around the center axis of the tetramer from the panel (b) (d) The dimer interface. The marked area by the quadrilateral on panel (c) is drawn with the top view. The green and blue colors represent the same tetramers on panels (a)-(c).



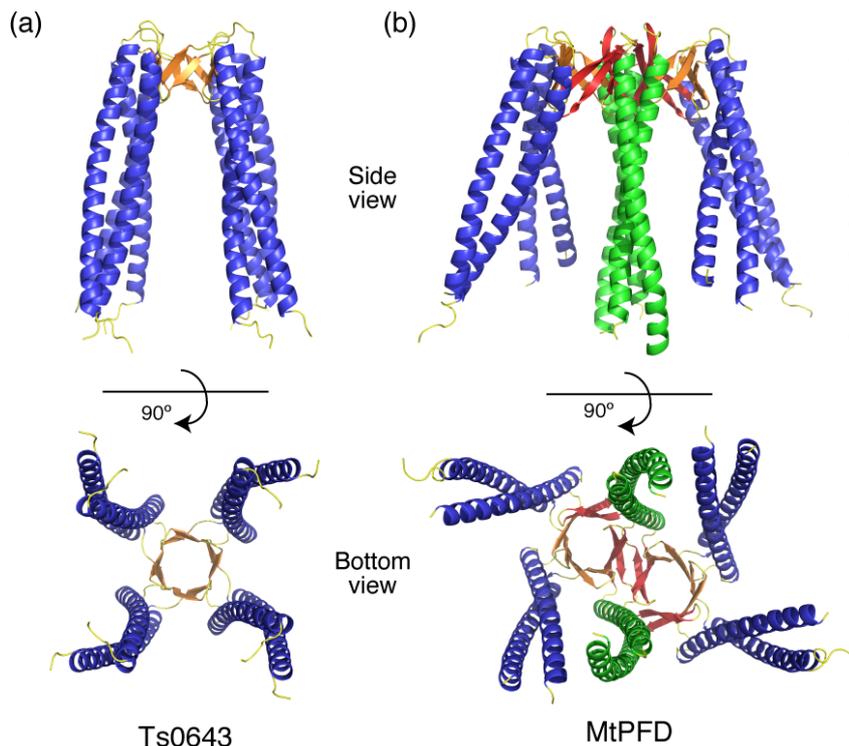


Figure 3. Comparison between the Ts0643 tetramer and the hexameric MtPFD

The side and bottom view of the (a) Ts0643 and (b) MtPFD. Ts0643 and MtPFD beta subunits are colored in blue (alpha helix) and orange (beta sheet). MtPFD alpha subunits are colored in green (alpha helix) and red (beta sheet). These figures were drawn at the same scale.

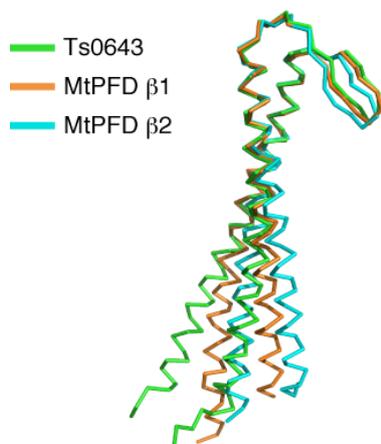


Figure 4. Superimposition of MtPFD beta subunits on Ts0643. The superimposition was performed on their beta hairpin linkers. Green shows Ts0643. Orange represents one beta subunit of MtPFD in the asymmetric unit. The other subunit of MtPFD is colored in cyan.

4. 考察

最近、古細菌の Prefoldin が様々な大きさの分子を基質として捕らえている様子が電子顕微鏡による三次元構造で報告された。この構造によると、基質の大きさに従って、Prefoldin と基質の接触面が変わっており、大きな分子(コナルブミン)に対しては、Prefoldin は6本の足全てで基質を捕らえていたが、小さな分子(リゾチーム)に対しては、 β サブユニットからのびる足2本で基質を結合していた。これまで、行われた生化学的解析においても、Prefoldin がシャペロン活性を持つためには、 α サブユニットよりも β サブユニットからのびるコイルドコイルの足の先端に存在する疎水性残基が重要であることが示されている。Ts0643 の4量体においても、基質の結合に関与すると考えられる疎水性残基がコイルドコイルの足の先に存在しており、溶液中にさらされている。本研究によって明らかになった Ts0643 の4量体構造を基にして行われた活性測定実験においては、Ts0643 の4量体は大きな分子(クエン酸合成酵素)に対してはシ

シャペロン活性を示さなかったが、小さな分子(インスリン)に対してはシャペロン活性を示した. MtPFD のような6量体構造と比較して Ts0643 は大きさが小さくなっており、このためクエン酸合成酵素のような大きな分子は捕らえられなかったと考えられる. しかしながら、小さな分子の凝集を抑制する活性を有しており、Ts0643 の4量体は *in vitro* において分子シャペロンとして機能することが示された. 近年のゲノム解析によると、古細菌のクレアーキア門や、古細菌の *Thermoplasma* において、Prefoldin の α サブユニットが遺伝子として存在していないことが報告されている. これらの古細菌においては、本研究で明らかになった β サブユニットの4量体構造が分子シャペロンとして機能しているのかもしれない.

Table1: Ts0643 Data collection, phasing and refinement statistics

Data collection		
Crystal	Native	Au
Resolution range ()	50-1.90 (1.97-1.90)	50-1.90 (1.97-1.90)
Number of reflections (total/unique)	104242 / 11352	234742 / 22239
Completeness (%)	96.4 (93.5)	99.8 (99.6)
$I/\sigma(I)$	43.2 (6.3)	42.4 (6.6)
R_{sym}^a (%)	3.8 (16.0)	4.3 (21.9)
Multiplicity	9.2 (5.1)	10.6 (6.8)
Space group	<i>I</i> 422	<i>I</i> 422
Cell parameters, a, b, c ()	70.6, 70.6, 114.4	71.2, 71.2, 114.5
Derivative		KAu(CN) ₂
Conc., Soaking time		10 mM, 26h
Phasing		
Resolution range ()		20-1.90
R_{iso} (%)		29.5
Phasing power ^b (centric/acentric)		0.90/0.88
Mean figure of merit ^c		0.43/0.73 (after DM)
Number of site		1
Refinement		
Resolution range ()	50-1.90	
Number of reflections work/free	10438 / 540	
$R_{\text{cryst}}/R_{\text{free}}^d$ (%)	17.7 / 19.4	
$R_{\text{cryst}}/R_{\text{free}}^d$ (%) (outer shell)	22.6 / 25.9	
r.m.s.d bonds/angle	0.007 / 1.18	
Ramachandran plot (%)	99.1 / 0.9 / 0 / 0	
Average <i>B</i> (protein/water/other)	27.0 / 40.5 / 38.5	
Mols / A.U.	1	1

Values in parentheses indicate statistics for the highest resolution shells.

^a $R_{\text{sym}} = \sum |I_i - \langle I \rangle| / \sum \langle I \rangle$, where I_i is the observed intensity and $\langle I \rangle$ is the average intensity over symmetry equivalent measurements.

^b Phasing power = $\langle F(H) \rangle / E$, where $\langle F(H) \rangle$ is the r.m.s. amplitude of the heavy-atom structure factor and E is the lack of closure error.

^c Mean figure of merit = $\langle \sum P(\alpha) \exp(i\alpha) / \sum P(\alpha) \rangle$, where $P(\alpha)$ is the phase probability at the angle α .

^d $R_{\text{cryst}} = \sum ||F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|| / \sum |F_{\text{obs}}|$. R_{free} is the same as R , but for a 5% subset of all reflections that were never used in crystallographic refinement.