

# 論文内容の要旨

## 論文題目 再構築型無細胞タンパク質合成系を用いた タンパク質凝集の網羅的解析

氏名 丹羽 達也

### 【緒言】

リボソーム上で合成された新生タンパク質は、その全てが簡単に固有の構造を取れるわけではなく、分子シャペロンの助けがなければ固有の立体構造へと辿り着けずに凝集してしまうものも少なくない。ところが、どのようなアミノ酸配列を持つタンパク質が凝集しやすいのか、またどのような配列が分子シャペロンによって認識されやすいのか、などについてはほとんど理解されていない。そこで本研究では、大腸菌の全てのタンパク質を再構築型の無細胞タンパク質合成系である PURE system で合成し、合成時におけるタンパク質の凝集のしやすさ、分子シャペロンの凝集抑制効果について網羅的・統計的に解析し、凝集やフォールディングとタンパク質の性質との関係について調べた。

### 【実験手法】

大腸菌の全タンパク質を PURE system で発現させるために、大腸菌の全遺伝子(ORF)を網羅したライブラリである ASKA ライブラリを用いた。具体的な方法としては、まずライブラリの各クローンから精製したプラスミドを元に PCR 反応によって各 ORF を増幅させ、次にそれを PURE system に加えて翻訳反応を行った。翻訳反応後の溶液 (Total) と、それを遠心分離した後の上清 (Sup) に含まれる翻訳産物をそれぞれ SDS-PAGE によって分離・定量し、それらの量比を可溶率として定義し、凝集しやすさの指標とした。実験手順の模式図を図 1 に示した。

はじめに PURE system の標準的な条件、すなわち分子シャペロンを含まない条件にて、全てのタンパク質 (4,132 個) について実験を行った。次いで、可溶率が低かったものについて、大腸菌の細胞質内で働く主要な 3 種の分子シャペロン (Trigger Factor、GroEL/ES、DnaK/DnaJ/GrpE) をそれぞれ加えた PURE system を用いて再び可溶率の評価を行い、各シャペロンによる可溶化の度合いを凝集抑制効果として評価した。

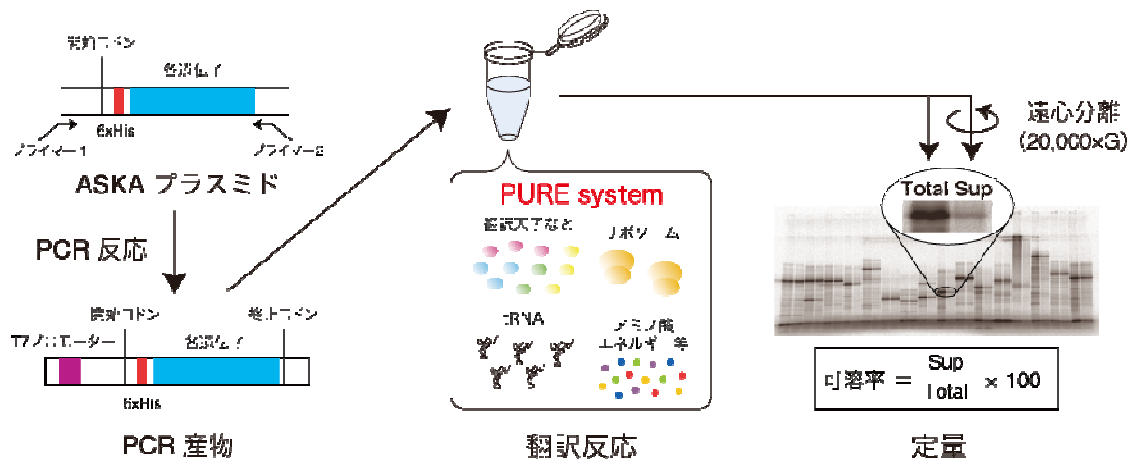


図1 実験手順の模式図

## 【結果】

### ・分子シャペロンが存在しない条件におけるタンパク質凝集の網羅的解析

分子シャペロンを含まない PURE system によってライブラリの全遺伝子について凝集評価実験を行ったところ、約7割 (3,173 個) について PURE system によるタンパク質の合成量および可溶性を定量することができた。残りの3割については、タンパク質の合成が見られない、SDS-PAGE の際に分離がうまくできない等の理由で定量することができなかった。

定量できたものについて、可溶性の分布をヒストグラムで調べたところ、可溶性の低い部分と高い部分にそれぞれ山を持つ二峰性になることがわかった (図 2a)。この二峰性は、タンパク質の合成量と相関しないこと、また内膜タンパク質などを除いた細胞質のタンパク質だけでも変化しないことから、タンパク質には凝集しやすい集団と可溶性の高い (凝集しにくい) 集団が存在する、ということが明らかとなった。以降の解析のために、細胞質のタンパク質のみを対象として可溶性 30%以下の集団を Agg、可溶性 70%以上の集団を Sol と定義した。

タンパク質の物理化学的な性質と凝集特性の相関を調べるために、タンパク質の分子量と等電点についてヒストグラムと散布図による比較を行った (図 2b,c)。これらの結果より、分子量が小さいもの、等電点が高い (5~7) ものは可溶性が高い傾向にあることが示された。またアミノ酸組成について調べたところ、負電荷を持つアミノ酸 (Asp、Glu) の割合と芳香環を持つアミノ酸 (Phe、Tyr、Trp) で Agg と Sol で分布に有意な差がみられた。一方、正電荷を持つアミノ酸 (Lys、Arg、His) や疎水性アミノ酸 (Val、Leu、Ile、Phe) の割合では差を見出せなかった。疎水性に関しては、ヒドロパシープロットという、アミノ配列の局所的な疎水性を調べるアルゴリズムを用いて可溶性との相関を調べることも行ったが、凝集しやすい集団と可溶性の高い集団の間に有意な差はみられなかった。

さらに、立体構造と凝集特性との関係を調べるために、タンパク質の二次構造 ( $\alpha$ ヘリックスや $\beta$ シートなど) のトポロジーによって立体構造を分類している SCOP データベースによる分類を利用した。SCOP データベースは class、fold、superfamily、family という4つの階層構造になっており、その中の fold という階層でタンパク質を分類し、各 fold 中の Agg、Sol の割合を調べた (図 3a)。これより、例えば c94 (Periplasmic binding protein-like II) という fold では、凝集しやすいものが8割以上を占めているのに対し、c47 (Thioredoxin fold) では可溶性の高いものが7割以上を占めているなど、凝集しやすい fold、可溶性の高い fold が存在するということがわかった。

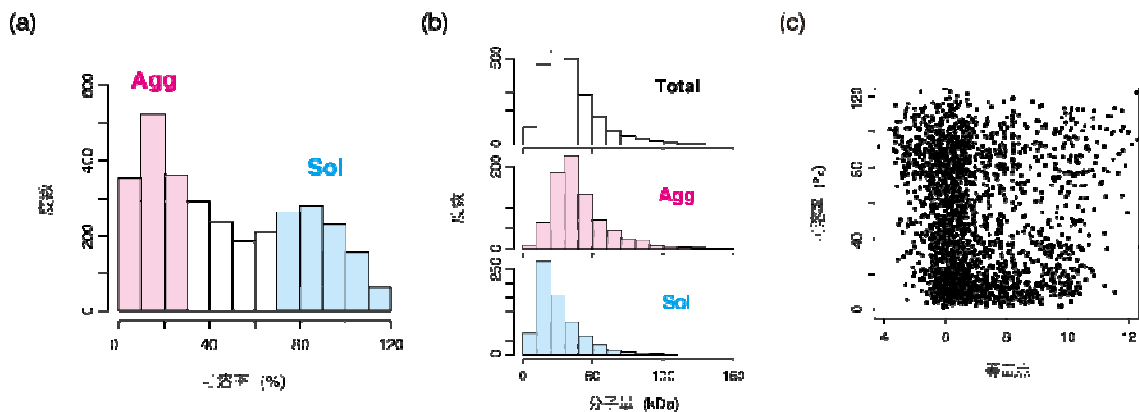


図2 (a) 可溶性の分布 (b) Agg、Sol それぞれの分子量の分布 (c) 可溶性と等電点の散布図

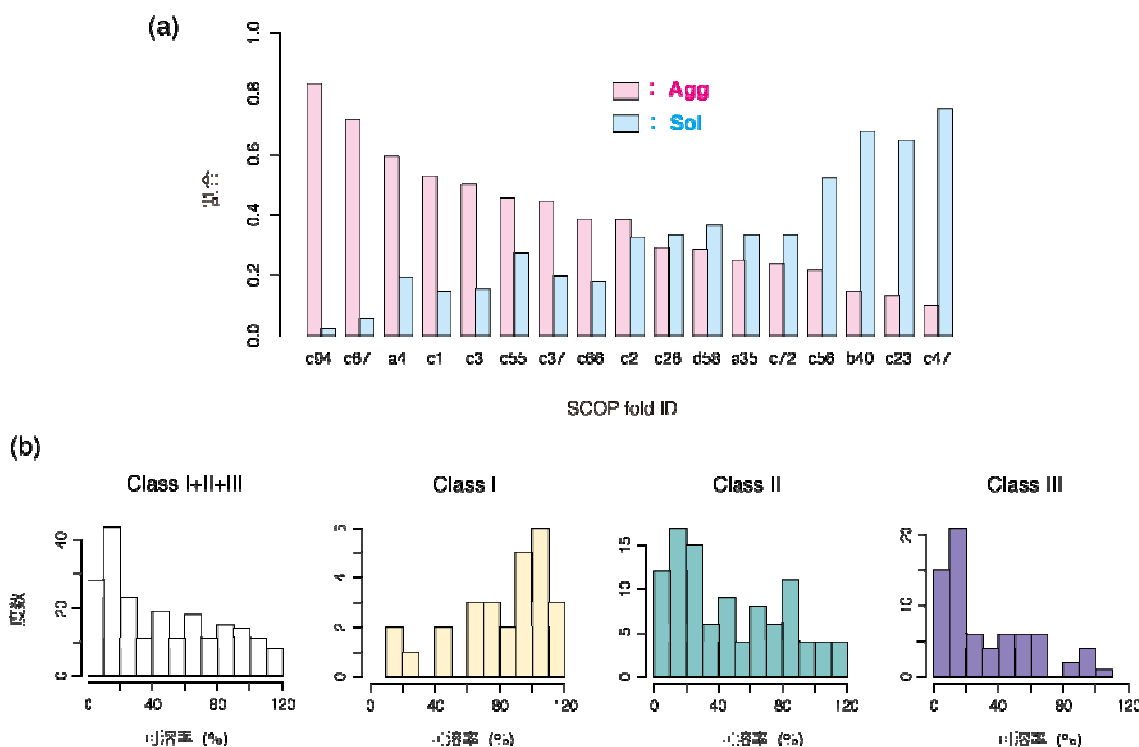


図3 (a) 各 SCOP fold における Agg、Sol の割合 (b) GroE 基質の各クラスにおける可溶性ヒストグラム

上述の凝集しやすい SCOP fold の中に、大腸菌の細胞質内で働く主要な分子シャペロンの1つである GroEL/ES の基質に多いといわれている fold (c67, a4, c1, c37) が含まれていた。そこで可溶性と GroEL/ES 基質との関係を直接調べるために、GroEL/ES 基質のみの可溶性の分布を調べた(図3b)。すると、GroEL/ES 依存性の低い基質 (Class I 基質) には可溶性が高いものが多いのに対し、GroEL/ES 依存性の高い基質 (Class III 基質) では可溶性が低いものが多いという傾向がみられた。

### ・分子シャペロンを存在させた条件でのタンパク質凝集の網羅的解析

分子シャペロンを含まないタンパク質合成系で行った凝集 評価における凝集しやすい集団 (Agg) のうち、細胞質のタンパク質 792 個について、Trigger Factor、GroEL/ES、DnaK/DnaJ/GrpE の3種のシャペロンをそれぞれ加えた PURE system を用いて可溶性を調べ、各シャペロンの凝集抑制効果を網羅的に評価した。図4aに各シャペロンの凝集抑制効果 (シャペロンを加えた際の可溶性からシャペロンを含まない条件での可溶性を引いたもの) の分布を示した。この結果より、Trigger Factor は単独では凝集抑制効果がごく弱いこと、GroEL/ES と

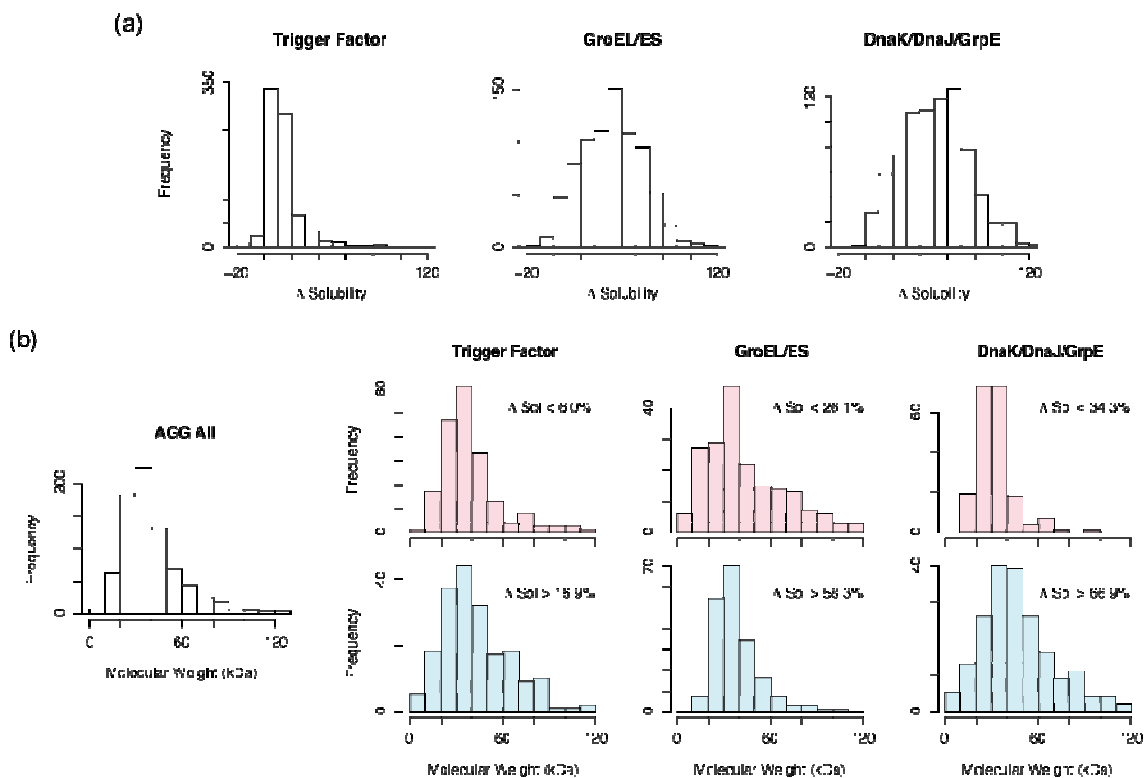


図4 (a) 各シャペロンを加えたときの可溶性からシャペロンなしでの可溶性を引いた値の分布

(b) 各シャペロンの凝集抑制効果が弱かったもの（ピンク:下位 25%）、強かったもの（水色:上位 25%）の分子量分布

DnaK/DnaJ/GrpE はどちらも多種類のタンパク質に対して凝集を抑制する効果があることが示された。

さらに各シャペロンがどのような性質を持つタンパク質に対して作用するかを調べるために、図 4 a の分布の下位 25%、上位 25%を抽出し、各集団の分子量の分布を調べた (図 4 b)。すると GroEL/ES では分子量 20~50kDa 付近のものに対して凝集抑制効果を発揮しやすい傾向があるのに対し、DnaK/DnaJ/GrpE では高分子量 (60kDa 以上) のものに対して作用しやすい傾向があることが明らかとなった。同様に等電点の分布を調べたところ、GroEL/ES、DnaK/DnaJ/GrpE とともに中性付近 (pI 7~8) のタンパク質に対しては凝集抑制効果が弱く、塩基性 (pI 10 付近) のものに対しては DnaK/DnaJ/GrpE がより効果を発揮する傾向があるという結果が得られた。

### 【考察とまとめ】

本研究における、無細胞蛋白質合成系によって多種類のタンパク質を一つ一つ発現させて網羅的に解析するという手法は、既存のプロテオーム研究では存在量が少なく解析できないタンパク質まで扱えるといった点などにおいて非常に強力な手法である。さらに無細胞蛋白質合成系に分子シャペロンを含まない PURE system を用いて大腸菌の全タンパク質の凝集評価を行うことによって、タンパク質の凝集という普遍的な現象が、タンパク質の一次配列情報 (分子量、等電点やアミノ酸組成など) だけでなく、最終的な立体構造の種類に関係するという、今までの研究では得られなかった新たな知見を得る事ができた。

さらに分子シャペロンの基質認識についても、この手法によって初めて得られた大規模なデータセットをより詳細に解析していくことで (特に一次配列的・立体構造的な視点からの解析など)、分子シャペロンの基質認識機構の解明につながる事が期待される。