

## *Chaetomium thermophilum* 由来 Hsp104 脱凝集酵素のスプリット構造

篠原恭介<sup>1</sup>, 野口恵一<sup>2</sup>, 養王田正文<sup>1</sup>

<sup>1</sup>東京農工大学大学院工学府生命工学専攻, <sup>2</sup>東京農工大学 学術研究支援総合センター機器分析施設

### Split conformation of *Chaetomium thermophilum* Hsp104 disaggregase

Kyosuke SHINOHARA<sup>1</sup>, Keiichi NOGUCHI<sup>2</sup>, Masafumi YOHTA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Biotechnology and Life Science, Tokyo University of Agriculture and Technology,

<sup>2</sup> Instrumentation Analysis Center, Tokyo University of Agriculture and Technology

#### Abstract

好熱性真菌 *Chaetomium thermophilum* 由来の Hsp104 (CtHsp104) の構造を、X線結晶構造解析、クライオ電子顕微鏡、原子間力顕微鏡により解析した。CtHsp104 のコンフォメーションは、Flat Ring, Staggered Ring, Intermediate Ring, Split Ring の4つの構造に分類された。基質である変性タンパク質が存在すると、コンフォメーション変化が促進され、Split Ring 構造の頻度が高まることがわかった。Split Ring 構造が CtHsp104 の分解時のオフパスウェイの状態であり、基質の捕捉や放出に適応した構造である可能性がある。

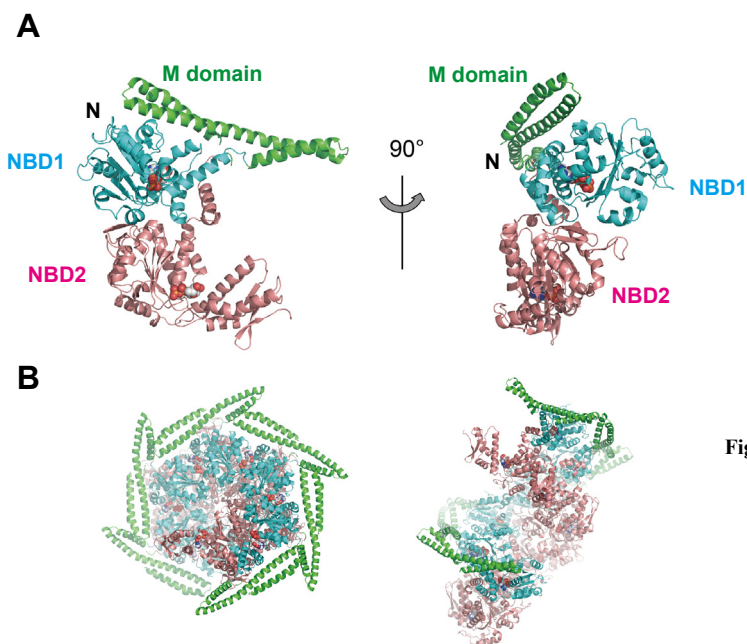
#### 1. はじめに

1990年代後半、著者の一人の養王田は、東京工業大学の吉田賢右先生らと共同で好熱菌 *Thermus thermophilus* の DnaK オペロンの配列を解析した。DnaK, DnaJ, GrpE の他に、DafA という *Thermus* DnaK・DnaJ 複合体形成に必要な因子の遺伝子も存在することを明らかにし、論文を発表している [1]。このオペロンの解析を進めると、下流に ClpB の遺伝子が存在することが分かった。ClpB とその真核生物型である Hsp104 も AAA+ タンパク質ファミリーに属する分子シャペロンである。1994年、Lindquist たちは、酵母において Hsp104 が凝集したタンパク質の再生を行うことを報告している [2]。ClpB が DnaK と同一のオペロンに存在することから、ClpB が DnaK システムと共同で機能していることが予想された。その後、吉田先生たちが研究を進め、ClpB と DnaK システム (DnaK, DnaJ, GrpE) が、高温で変性し凝集した蛋白質の再可溶化 (脱凝集) と再生に協調して働いていることを明らかにした [3]。Lindquist たちも、酵母の Hsp104 が Hsp70 システムと協調して脱凝集することを実証した [4]。細胞には様々な分子シャペロンが存在するが、凝集したタンパク質の脱凝集することができるのは、Hsp104/ClpB のみである。このため、タンパク質凝集病の治療への可能性などから注目を集め、多くの研究が行われている [5]。*T. thermophilus* の ClpB は Tsai たちに渡り、X線結晶構造が解明された [6]。Hsp104/ClpB は、AAA1, AAA2 と呼ばれる ATP を結合・加水分解するドメインと、N ドメイン、M ドメインと呼ばれる補助ドメインからなり、リング状の6量体を形成して機能する。これまでの研究から、Hsp104/ClpB は ATP のエネルギーを利用

し、リング中央の孔に凝集したタンパク質をほぐしながら通すことで脱凝集するといわれている。しかし、Tsai たちの構造も含め、X線結晶解析では6量体の構造は解析されていなかった。私たちは分子シャペロンの研究は行っていたが、Hsp104/ClpB の研究は行っていなかった。2014年頃、養王田が好熱性真菌 *Chaetomium thermophilum* の Group II 型シャペロニン (Chaperonin Containing TCP-1) に関する研究を行っている時に、余っていたゲノムを用いて大学院生の一人に *C. thermophilum* の Hsp104 (CtHsp104) の遺伝子のクローニングをしてもらったことが、この研究のスタートであった。機能解析からX線結晶構造解析までは順調に進んだが、機能単位である6量体の構造が解明できないという問題から一時的に頓挫していた。この問題などについて、著者の一人である篠原が取り組み、クライオ電子顕微鏡や原子間力顕微鏡などによる解析を行うことで合理的な解釈が可能となり、本年 *Structure* 誌に論文を発表することができた [7]。

#### 2. CtHsp104 の X 線結晶構造解析

大腸菌で発現、精製した CtHsp104 は、*C. thermophilum* の DnaK システムと協調して脱凝集活性を示した。ヌクレオチドが存在しない条件ではモノマーであったが、ATP や ADP を添加することで6量体を形成した。ClpB は ATP 存在下のみで6量体を形成する。ATP 存在下では、加水分解の伴う動的構造変化状態であることが6量体の構造解析が困難である原因であると考え、ADP 存在条件で CtHsp104 の6量体の構造解析を行うことにした。N 末端の N ドメインが Flexible であり、脱凝集活性には必要がないことか



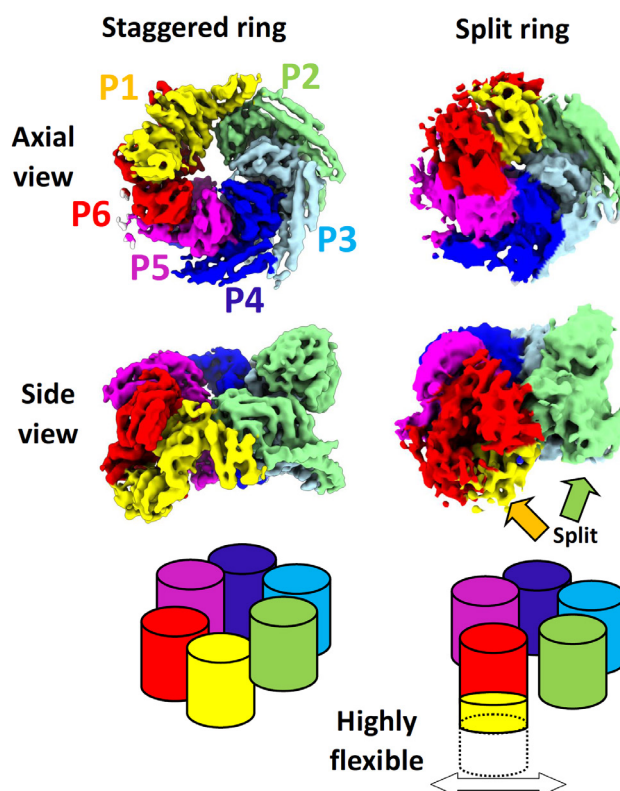
**Figure 1** Crystal structure of CtHsp104ΔN. (A) The monomer structure of CtHsp104 is shown as a ribbon model, in which NBD1, MD, and NBD2 are shown in cyan, green, and salmon, respectively. The bound ADP molecules are shown as sphere models. (B) The hexameric structure of CtHsp104 in the crystal structure. The hexamer shows a left-handed spiral structure along the crystallographic  $6_3$ -screw axis.

ら、N末端欠損体 (CtHsp104ΔN) の結晶構造解析を行なった。CtHsp104ΔN と ADP との複合体の結晶構造を 2.7Å の分解能で決定した (Fig. 1)。この結晶構造では、機能的に重要な残基の側鎖とヌクレオチドの位置がすべて明確に観察された。以前に解析された Hsp104 と ClpB の構造モチーフをよく反映している。nucleotide-binding domain (NBD)1 では、Walker A (Lys229, Thr230) と Walker B (Asp295, Glu296) のモチーフがヌクレオチド結合ポケットを形成している。NBD2 では、Walker A (Lys640, Thr641), Walker B (Asp706, Glu707), Sensor 1 (Asn748), Sensor 2 (Arg849) がヌクレオチド結合ポケットを形成している。結晶中のヌクレオチド結合領域の周辺には、第 2 の相同性領域 (SRH) モチーフがよく確認されている。NBD1 では、酵母由来 Hsp104 で提案されているアルギニンフィンガー Arg333 と Arg334 に対応する Arg349 と Arg350 が、隣接するプロトマーのヌクレオチド結合ポケットの近くに配置されている。また、NBD2 では、ClpB で提案されているアルギニンフィンガー Arg765 に対応する Arg788 が、ヌクレオチド結合ポケットの近くに配置されている。得られた構造は  $6_3$  左巻フィラメント構造であり、その構造単位は 6 量体であった。しかし、6 量体単位で会合していない分割した構造 (Split Conformation) であった。この結果は、CtHsp104 がヌクレオチドの存在下で安定した 6 量体として存在していることと矛盾する。分割された 6 量体は安定的に存在するとは考えられない。より小さなオリゴマーやモノマーに簡単に解離することができる。また、大きなオリゴマーに変化する可能性もある。

### 3. クライオ電子顕微鏡による構造解析

CtHsp104 の 6 量体に Split Conformation が実際に存在するかどうかを調べるために、クライオ電子顕微鏡で CtHsp104 の構造を解析した。単粒子解析により、ADP

存在下で CtHsp104ΔN の構造を決定した。その結果、CtHsp104 では、Staggered Ring と Split Ring という 2 種類の異なる 6 量体構造が得られた (Fig. 2)。Split Ring 構造



**Figure 2** Cryo-EM structure of CtHsp104ΔN in the presence of ADP. Cryo-EM structures of CtHsp104ΔN. Yellow, green, cyan, blue, purple, and red represent P1, P2, P3, P4, P5, P6 in the CtHsp104 hexamer. Volumes denote the 3D structure of the staggered ring (at a spatial resolution of 7.9 Å) and the split ring conformation (at a spatial resolution of 6.2 Å) of CtHsp104ΔN, respectively.

は、これまで報告されている Hsp104 の構造とは大きく異なっていた。Split Ring 構造では、末端のサブユニット (P1) の半分以上の電子密度が欠けており、移動性が高いことが示唆されている。Staggered Ring 構造では P1 と反対側の末端のサブユニット (P6) との結合が確認されているが、Split Ring 構造では P1 と P6 の結合が失われている。Split Ring 構造と X 線結晶構造は異なるが、いずれも 6 量体の P1 と P6 の結合が解離した Split Conformation である。

#### 4. ヌクレオチドに依存した構造変化

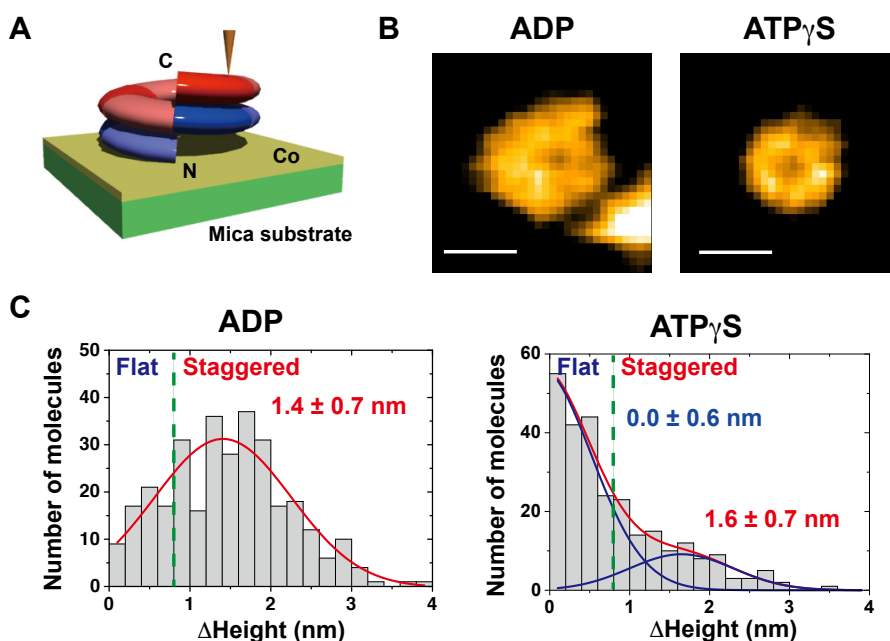
次に、原子間力顕微鏡 (AFM) を用いて CtHsp104 オリゴマーの構造変化のヌクレオチド依存性を調べた。His タグを付加した CtHsp104 オリゴマーを作成し、コバルトで覆われた雲母の表面に固定化し、AFM で観察した (Fig. 3)。6 量体のリング状構造が観察されたが、リング内でのサブユニットの間での高低差があった。最高位のサブユニットと最低位のサブユニットの深さ方向の位置の差から、Staggered Ring, Intermediate Ring, Flat Ring と定義した。CtHsp104ΔN では、オリゴマーの 81% が Staggered Ring/Intermediate Ring であり、残りの 19% は Flat Ring であった。一方、ATP の加水分解されないアナログである ATP $\gamma$ S の存在下では、61% が Flat Ring で、39% が Staggered Ring/Intermediate Ring であった。以上の結果から、CtHsp104 は、ATP 依存性サイクルにおいて、Staggered Ring/Intermediate Ring と Flat Ring を含む、少なくとも 2 つの異なるコンフォメーションを持つことが示唆された。しかし、結晶構造やクライオ電子顕微鏡構造で見られた Split Ring 構造は、AFM では観察されなかった。

#### 5. 高速原子間力顕微鏡による CtHsp104 の構造ダイナミクスの解析

Split Ring 構造が反応サイクル中に実際に存在することを調べるために、ADP または ATP の存在下で CtHsp104 の構造ダイナミクスを高速原子間力顕微鏡 (HS-AFM) で観察した。いずれの条件でも、Split Ring 構造が観察された。ATP 存在下では、CtHsp104 が主に Flat Ring として存在していることを明確に示しており、ATP $\gamma$ S 存在下での静的 AFM 観察結果と一致している。ADP 存在下では、主に Staggered Ring/Intermediate Ring 構造であり、時折 Split Ring 構造に変化した。CtHsp104 の ATP 加水分解活性は基質である変性タンパク質により活性化される。モデル基質であるカゼインを加えることで、ATP 存在下での HS-AFM 観察で大きな変化が見られた。カゼインの添加によって動的な構造変化が誘発され、Staggered Ring の頻度と Split Ring の頻度が大幅に増加した (Fig. 4)。

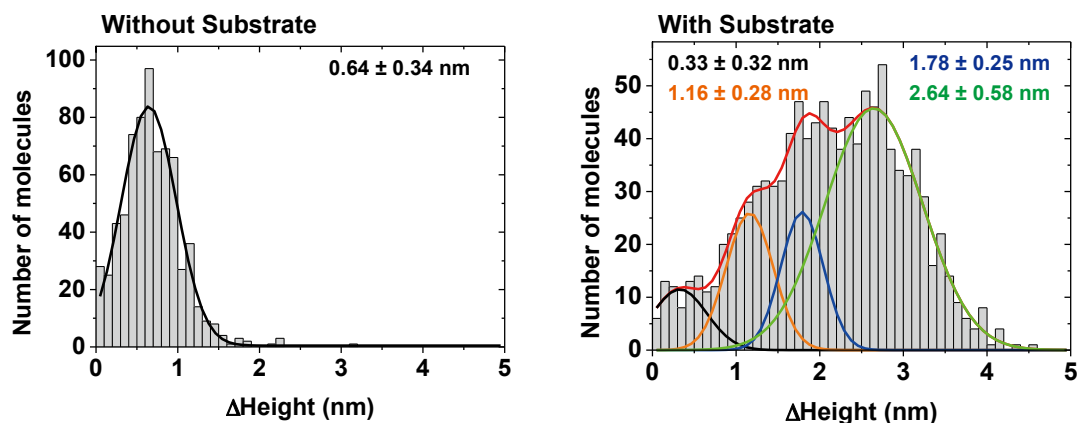
#### 6. まとめ

本研究では、X 線結晶構造解析、クライオ電子顕微鏡、AFM、HS-AFM を用いて、CtHsp104 のコンフォメーションの柔軟性を解析した。CtHsp104 の構造は、Flat Ring, Staggered Ring, Intermediate Ring, Split Ring の 4 つに分類された。ATP 存在下では、CtHsp104 は主に Flat Ring 構造で存在していたが、時折、Staggered Ring などの他構造に変化していた。ADP 存在下では Staggered Ring が主要なコンフォメーションであり、他の構造への変化も観察された。Split Ring への転移の頻度は、ATP 存在下の場合よりも少し大きかったが、頻度は限られていた。モデル基質であるカゼインを加えることで、ATPase が活性化され動的な構

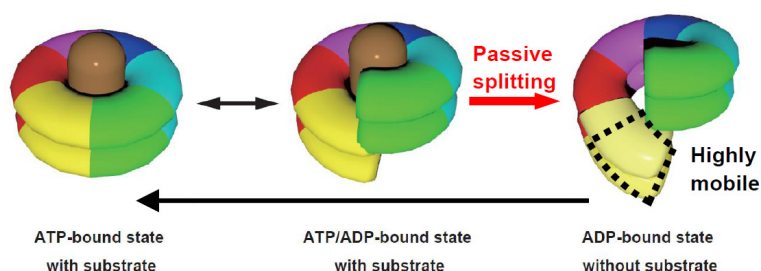


**Figure 3** AFM imaging of His-tagged CtHsp104ΔN in the defined orientation. (A) Schematic image of the orientation-controlled AFM. (B) AFM images of CtHsp104ΔN in the presence of ADP (Left) and ATP $\gamma$ S (Right). (C) Histograms of height differences between the top and bottom subunits of CtHsp104ΔN in the presence of ADP (Left) and ATP $\gamma$ S (Right). Scale bar 10  $\mu$ m.





**Figure 4** Histogram of height differences between the topmost subunit and the bottommost subunit of CtHsp104 in the presence of ATP with (Right) or without model substrate (Left) in HS-AFM observation. Black, orange, blue, and green solid lines represent fitting curves for Flat Ring, Staggered Ring, Intermediate Ring and Split Ring, respectively.



**Figure 5** A model of conformational change of CtHsp104.

造変化が誘発され、Staggered Ring の頻度と Split Ring の頻度が大幅に増加した。我々の結晶構造とクライオ電子顕微鏡構造は、それぞれが6量体ユニットのP1とP6の間の解離した Split Conformation であるという点で類似した特徴を持っている。結晶構造では安定したP1サブユニットが示されているのに対し、低温電子顕微鏡構造では非常に動きやすい柔軟なP1サブユニットが示されている。このことから、Split Ring 構造は準安定状態であり、結晶パッキングによって無限のスパイラルとして安定化したものと考えられる。

以上の観察結果に基づき、我々は以下のような CtHsp104 の構造変化モデルを提案する (Fig. 5)。CtHsp104 は、ヌクレオチドがない状態ではモノマーとして存在する。CtHsp104 の単量体はヌクレオチドの結合により6量体に集合する。ATP の存在下では、主に Flat Ring を形成する。ATP が加水分解されると、各サブユニットのコンフォメーション変化により、ヘキサマー構造が Staggered Ring に変化する。基質があると ATP 加水分解活性が刺激され、動的な構造変化が誘導される。ATP 加水分解による基質の貫通後、ADP 結合した CtHsp104 の確率的な運動により、ヘキサマーの受動的な分裂が起こる。おそらくこの開裂した状態は基質の相互作用する前の待機している状態 (Off-pathway state) であると予想している。この Split Conformation は、基質の捕捉や放出に適応した構造である可能性がある。

## 謝辞

本研究は課題番号 2012G697 とおよび 2014G599 の支援を受け実施した。共同研究者一同を代表し厚く御礼を申し上げる。

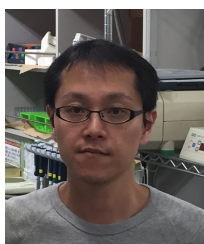
## 引用文献

- [1] K. Motohashi, M. Yohda, I. Endo, and M. Yoshida, *J. Biol. Chem.* **271**, 17343 (1996).
- [2] D. A. Parsell, A. S. Kowal, M. A. Singer, and S. Lindquist, *Nature*. **372**, 475 (1994).
- [3] K. Motohashi, Y. Watanabe, M. Yohda, and M. Yoshida, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **96**, 7184 (1999).
- [4] J. R. Glover, and S. Lindquist, *Cell*. **94**, 73 (1998).
- [5] E. A. Sweeny, and J. Shorter, *J. Mol. Biol.* **428**, 1870 (2016).
- [6] S. Lee, M. E. Sowa, Y. Watanabe, P. B. Sigler, W. Chiu, M. Yoshida, and F. T. Tsai, *Cell*. **17**;115, 229 (2003).
- [7] Y. Inoue, Y. Hanazono, K. Noi, A. Kawamoto, M. Kimatsuka, R. Harada, K. Takeda, R. Kita, N. Iwamasa, K. Shibata, K. Noguchi, Y. Shigeta, K. Namba, T. Ogura, K. Miki, K. Shinohara, and M. Yohda, *Structure*. **29**, 721 (2021).

(原稿受付日：2021年9月12日)

## 著者紹介

篠原恭介 Kyosuke SHINOHARA



東京農工大学 大学院工学府 生命工学  
専攻 准教授

〒184-8588 東京都小金井市中町

e-mail: k\_shino@cc.tuat.ac.jp

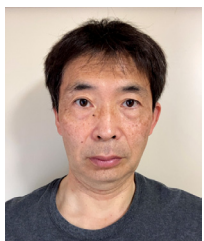
略歴：2007年東京大学大学院工学  
研究科博士課程修了，博士（工学）。  
2008年日本学術振興会特別研究員  
PD。2011年大阪大学大学院生命機能

研究科博士研究員。2012年大阪大学大学院生命機能研究  
科助教。2015年東京農工大学 特任准教授，2020年准教授  
(テニユア取得)。

最近の研究：運動繊毛の分子基盤，分子シャペロンの構造  
解析。

趣味：テニス

野口恵一 Keiichi NOGUCHI



東京農工大学 学術研究支援総合セン  
ター機器分析施設 教授

〒184-8588 東京都小金井市中町

e-mail: knoguchi@cc.tuat.ac.jp

略歴：1991年3月東京農工大学大  
学院工学研究科博士前期課程修了，  
1993年3月東京農工大学大学院工学

研究科博士後期課程中退，1993年5月東京農工大学工学  
部物質生物工学科助手，1999年3月東京農工大学機器分  
析センター講師，2007年4月東京農工大学機器分析セン  
ター准教授，2020年10月東京農工大学学術研究支援総合  
センター教授。博士（工学）。

最近の研究：生体高分子構造

趣味：読書

養王田正文 Masafumi YOHDA



東京農工大学 大学院工学府 生命工学  
専攻 教授

〒184-8588 東京都小金井市中町

e-mail: yohda@cc.tuat.ac.jp

略歴：1987年東京大学工学研究科博  
士課程 退学。1988年工学博士。

1987年旭硝子(株)中央研究所研究員。

1991年理化学研究所研究員。1998年

東京農工大学工学部助教授。2003年東京農工大学大学院  
教授。

最近の研究：分子シャペロンの構造と機能，嗅覚受容体  
を用いた嗅覚センサーの開発，バイオレメディエーション，  
遺伝子解析の自動化。

趣味：テニス