

## 自己評価報告書

平成 23 年 5 月 16 日現在

機関番号：82648

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2008～2012

課題番号：20107009

研究課題名（和文）シャペロニンの構造揺らぎとフォールディング介助機能

研究課題名（英文）Structural fluctuations and their role in the folding-assisting function of the chaperonin complex

研究代表者

桑島 邦博 (KUWAJIMA KUNIHRO)

大学共同利用機関法人自然科学研究機構(岡崎共通研究施設)・岡崎統合バイオサイエンスセンター・教授

研究者番号：70091444

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：分子機械、分子認識、蛋白質、アロステリック転移、シャペロニン

## 1. 研究計画の概要

分子シャペロンは細胞内の蛋白質フォールディングに関わり、分子レベルの生命現象である蛋白質フォールディングと細胞レベルの生命現象とを結びつける重要な概念である。本研究では、分子シャペロンの構造揺らぎと機能発現との関係を物理化学的に明らかにする。そのため、ジメチルスルフォキシド (DMSO) 停止水素重水素 (H/D) 交換法を蛋白質超分子であるシャペロニン複合体の H/D 交換反応の追跡に適用する。シャペロニン複合体中の GroES 部分 (分子量 10,000) の H/D 交換反応をから着手し、さらにインテインによる蛋白質ライゲーションを利用して GroEL 部分 (分子量 57,000) の H/D 交換解析も視野に入れる。DMSO 停止 H/D 交換法と二次元 NMR を利用して、さまざまなシャペロニン複合体中の GroES の H/D 交換反応を追跡し、生物機能が構造揺らぎをどのように利用しているかを明らかにする。

## 2. 研究の進捗状況

(1) 二次元 NMR スペクトルにおける GroES の主鎖アミドプロトンの帰属を行った。 $^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}$  二重標識した GroES を調整し、分子研の 920 MHz NMR 装置を利用して 95% DMSO 中における GroES のアミドプロトンの帰属を HNCACB と CBCACONH スペクトルを測定して行った。94 個あるアミドプロトンの内 70 個のアミドプロトンの帰属に成功した。

(2) DMSO 停止 H/D 交換二次元 NMR 法を用いて遊離 GroES の水素交換反応を測定した。上記の GroES の主鎖 NH プロトンの帰属 (95% DMSO 条件下) をもとに、pH 6.6 にお

ける遊離 GroES 7 量体の H/D 交換反応の解析を、DMSO 停止 H/D 交換二次元 NMR 法を用いて行った。その結果、GroES 7 量体のモバイル・ループと呼ばれる GroEL 結合部位と GroES の頂上にあるループ領域は H/D 交換に対する保護度が低い (保護因子  $10^4$  以下)、GroES のコアにある  $\beta$  構造領域は安定で保護因子が  $10^5$  以上であることが分かった。

(3) TROSY 法による遊離 GroES の水素交換反応の測定の有効性を確認した。TROSY 法は、シャペロニン複合体のような巨大な蛋白質複合体の二次元 NMR を取得する有効な実験法である。分子研に設置されている 920 MHz NMR 装置を用いて、遊離 GroES 7 量体の二次元  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  TROSY スペクトルを測定し、大変良好な結果を得た。

(4) GroEL への ATP 結合の素過程をストップフロー法と滴定型熱量計 (ITC) を用いて明らかにした。GroEL への ATP 結合の 2 分子反応過程調べ、高エンタルピーの遷移状態を経て GroEL-ATP-Mg $^{2+}$  複合体が形成されることが分かった。この成果は Journal of Molecular Biology 誌に投稿し受理された。

## 3. 現在までの達成度

① 当初の計画以上に進展している。

(理由)

当初は計画されていなかった、ATP 結合部位の K $^{+}$ 依存性や、GroEL への ATP 結合の素過程なども明らかにすることが出来た。

## 4. 今後の研究の推進方策

(1) 二次元  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  TROSY 法による遊離 GroES 7 量体の水素交換反応解析 二次元

<sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N TROSY スペクトルを用いて天然条件下のGroES 7量体のH/D 交換反応を直接観測し、既に得られているDMSO停止H/D 交換二次元NMR 測定の結果と比較する。DMSO停止H/D 交換法の有効性を確認する。

**(2) GroEL/<sup>15</sup>N-GroES複合体の水素交換反応解析の実験条件検索** GroEL/<sup>15</sup>N-GroES複合体のH/D交換反応解析では、DMSO停止H/D交換法が有効な手段となる。GroELが共存する場合、溶液粘性の増大によるスペクトルの質低下が起こる。ゲル濾過やヒスタグなどを利用してGroELの除去を試み、良好なNMRスペクトルの観測が可能か否かを調べる。

**(3) GroELのアロステリック転移の速度論的解析** ATPにより誘起されるGroELのアロステリック転移に関して、溶液中のK<sup>+</sup>濃度に注目した例はない。GroELとその単一リング変異体SR1のアロステリック転移に及ぼすK<sup>+</sup>の影響を、ストップフロー蛍光スペクトルを用いて調べる。GroES存在下におけるアロステリック転移も調べる。第二のATP結合部位に関する知見を深めるとともに、H/D交換解析による構造揺らぎとアロステリック転移との関係を明らかにする。

**(4) GroEL-GroES複合体の水素交換反応** 野生型GroELおよび単一リング変異体SR1と<sup>15</sup>N標識されたGroESとの複合体を作製する。複合体中のGroES主鎖アミドプロトンの水素交換反応を同様に測定し、遊離GroESの結果と比較する。シャペロン複合体中に標的蛋白質を含まない系と含む系の両者について実験を行い、標的蛋白質有無の影響についても調べる。

**(5) GroELのドメイン特異的同位体標識と水素交換反応** インテイン融合による蛋白質ライゲーションを用いて、GroELのドメイン特異的な同位体標識を行い、NMRスペクトルにおける主鎖アミドプロトンの帰属を進める。

#### 5. 代表的な研究成果

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

1. Chen, J., Makabe, K., Nakamura, T., Inobe, T. & Kuwajima, K. Dissecting a bimolecular process of MgATP<sup>2-</sup> binding to the chaperonin GroEL. *J. Mol. Biol.*, in the press. (2011). (査読有)
2. Nakamura, T., Makabe, K., Tomoyori, K., Maki, K., Mukaiyama, A. & Kuwajima, K. Different folding pathways taken by highly homologous proteins, goat  $\alpha$ -lactalbumin and canine milk lysozyme. *J. Mol. Biol.* **396**:

1361-1378 (2010). (査読有)

3. Tsukamoto, S., Yamashita, T., Yamada, Y., Fujiwara, K., Maki, K., Kuwajima, K., Matsumura, Y., Kihara, H., Tsuge, H. & Ikeguchi, M. Non-native  $\alpha$ -helix formation is not necessary for folding of lipocalin: Comparison of burst-phase folding between tear lipocalin and  $\beta$ -lactoglobulin. *Proteins* **76**: 226-236 (2009). (査読有)
4. Inobe, T., Takahashi, K., Maki, K., Enoki, S., Kamagata, K., Kadooka, A., Arai, M. & Kuwajima, K. Asymmetry of the GroEL-GroES complex under physiological conditions as revealed by small-angle X-ray scattering. *Biophys. J.* **94**: 1392-1402 (2008). (査読有)
5. Ishii, T., Murayama, Y., Katano, A., Maki, K., Kuwajima, K. & Sano, M. Probing force-induced unfolding intermediates of a single staphylococcal nuclease molecule and the effect of ligand binding. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **375**: 586-591 (2008). (査読有)

[学会発表] (計 34 件)

1. K. Kuwajima, "Molecular mechanisms of the *Escherichia coli* chaperonin function," 3rd APPA Conference, Shanghai University, Shanghai, China, May 6-7, 2011.
2. K. Kuwajima, "Identification of fatty-acid binding site in the anti-tumor complex of  $\alpha$ -lactalbumin by 920-MHz NMR spectroscopy," The 10th KIAS Conference on Protein Structure and Function, Korea Institute for Advanced Study (KIAS), Seoul, Korea, September 30 - October 2, 2010.
3. K. Kuwajima, "Is the Folding Pathway Conserved in Homologous Proteins?," Bit Life Science's 3rd Annual Protein and Peptide Conference "After a Solution of the Machines of Life," Beijing International Convention Center, Beijing, China, March 21 - 23, 2010
4. K. Kuwajima, "Molecular mechanisms of protein folding," 2010 Annual Meeting of Asian CORE Program "Frontiers of Materials, Photo-, and Theoretical Molecular Sciences," Institute of Atomic and Molecular Sciences, Academia Sinica, Taipei, Taiwan, February 28-March 2, 2010.

[図書] (計 1 件)

1. Kuwajima, K., Ikeguchi, T., Nakamura, T., Ikeguchi, M. & Kidera, "A. Experimental and Simulation Studies of the Folding/Unfolding of Goat  $\alpha$ -Lactalbumin." In: *Water and Biomolecules -- Physical Chemistry of Life Phenomena*. (Kuwajima, K., Goto, Y., Hirata, F., Kataoka, M. & Terazima, M., Eds.) pp. 13-35 Springer - Verlag. Berlin Heidelberg: (2009). (査読無)