

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：23201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06983

研究課題名(和文) 原核生物および真核生物シャペロニンのフォールディング促進メカニズムの解明

研究課題名(英文) The elucidation of the folding acceleration mechanism of prokaryotic and eukaryotic chaperonins

研究代表者

元島 史尋 (Motojima, Fumihito)

富山県立大学・工学部・研究員

研究者番号：70372464

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では変性タンパク質がシャペロニンの空洞と結合した中間状態がフォールディングを促進するか検証した。大腸菌シャペロニンについて空洞内に閉じ込められた変性タンパク質の構造状態を解析し、自発的フォールディングで形成されるコンパクト状態よりもほどかれた状態であることを明らかにした。さらに中間体形成に携わる残基の特定を行い、疎水性残基の場所によってフォールディングおよびescapeへの影響は大きく異なることを明らかにした。真核生物由来シャペロニンCCTを大腸菌で組換え体を精製し、結晶化スクリーニングを行ったが、優位な結晶は得られず、研究は進まなかった。

研究成果の概要(英文)：We tested whether denatured protein encapsulated in the chaperonin cage is expanded by using single-pair FRET. All of tested substrate proteins were more expanded in the chaperonin cage than those at the initial of spontaneous folding. Mutational analysis revealed that hydrophobic residues in the chaperonin cage differently reduced the folding acceleration ability and the inhibition of polypeptide escape. To elucidate whether the folding acceleration mechanism can be applied to eukaryotic chaperonin CCT, we constructed the recombinant expression system of CCT from *Cyanidioschyzon merolae*. The recombinant CCT binds fluorescent ATP analog, Cy3-ATP. The crystallization condition of CCT was searched in the presence of various nucleotide analogs. However, we could not obtain the crystal of CCT.

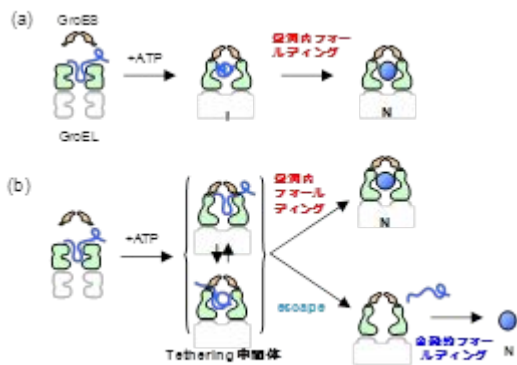
研究分野：生化学、構造生物物理学

キーワード：分子シャペロン 変性 フォールディング

## 1. 研究開始当初の背景

リボソームにより合成されたタンパク質がその機能を発揮するためには、アミノ酸配列により一義的に決まる天然構造を形成(フォールディング)する必要がある。多くのタンパク質がそのフォールディングに分子シャペロンによる援助を必要としている。代表的な分子シャペロンであるシャペロニン(Chaperonin)は必須タンパク質であり、その空洞内に变性タンパク質を隔離してフォールディング促進を行う。原核生物由来の cpn60/10 シャペロニンは様々なタンパク質をフォールディングできるが、真核生物細胞質由来のシャペロニン(CCT, TRiC)はアクチン、チューブリンなど特定のタンパク質しかフォールディングできず、原核生物シャペロニンとは異なるフォールディング促進メカニズムが働いていると考えられているがその詳細はまだまだ明らかではない。

大腸菌のシャペロニン GroEL/ES は最も研究された分子シャペロンである。このフォールディングメカニズムについては長年論争されており、空洞による空間制限が原因とするモデルがこれまで支持されていた(図1a) [1,2]。しかし、我々はこれまでのモデルとは異なり、シャペロニン空洞内に閉じ込められた变性タンパク質はシャペロニン空洞と疎水性相互作用しており、その一部は空洞外へはみ出ていることを発見し、新規なモデル(tethering model)を提唱した(図1b) [3,4]。



**図1. シャペロニン援助フォールディングのモデル。** (a) Confinement モデル。空洞内の变性タンパク質は完全に閉じ込められるとする。(b) Tethering モデル。空洞内の变性タンパク質は完全に閉じ込められず(Tethering 中間体)、空洞内でフォールドするか、または空洞外に遊離後(escape)、自発的にフォールドする。

## 2. 研究の目的

先の研究より、变性タンパク質は空洞内に結合し、そこから空洞内でフォールディングするか、もしくは空洞外に escape することがわかっている。变性タンパク質が空洞と結合した中間状態を明らかにすることで、シャ

ペロニンによるフォールディング促進機構が明らかになると期待される。そこで本研究ではこの状態における变性タンパク質の構造状態、そしてこの中間体の形成に關与すると予想される空洞内疎水性残基の役割について検討を行った。

## 3. 研究方法

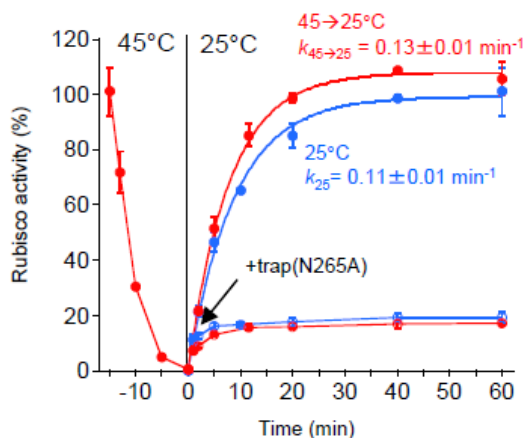
研究1においては熱安定性が高い single-ring 変異体として、SRKKK2 変異体を用いた。研究2において、变性タンパク質の構造変化の観察はするために、1分子内の2カ所に蛍光色素を標識し、蛍光色素間で起こる single-pair 蛍光共鳴エネルギー移動(spFRET)を用いた。研究4におけるシャペロニン変異体によるフォールディング能力の評価は、single-ring 変異体における青色蛍光タンパク質(BFP)の空洞内フォールディング速度と变性BFPの escape 速度の比較により行った。研究5の好熱性紅藻シゾン由来のCCTの発現は、8つのCCTサブユニットを大腸菌で同時に発現させ、CCT5に付加させたMBPを用いたアフィニティー精製により行った。

## 4. 研究成果

### (1) 中間体の可逆性の検証

これまでに提唱されてきた説(iterative annealing model)においては、变性タンパク質がシャペロニン空洞内に閉じ込められる瞬間に変性タンパク質がアンフォールディングされ、その後空洞内に遊離されて自由にフォールディングできるようになると提唱されていた[5,6]。しかし、我々のモデルでは閉じ込め後の变性タンパク質は常に空洞と相互作用していると考えられ、閉じ込め時の構造変化の影響は小さいと予想された。

これを確かめるため、我々は空洞内でフォールディングしたタンパク質を GroES の結合を維持したまま熱変性させ、常温に戻したときのフォールディング速度を調べることを試みた。我々はシャペロニン変異体 SRKKK2 が高温でも GroES 結合状態を維持していることを発見した。そこでまず GroES/ATP を加えて SRKKK2 空洞に藍藻由来 Rubisco を閉じ込め、フォールディング速度を測定した(図2、青)。その後 45 分で Rubisco を変性させ、25 °C に戻したときのフォールディングを観察した。温度低下によるフォールディング速度は GroES/ATP 結合によりフォールディングさせた場合の速度とほぼ同じであり、収率も大きく変わらなかった(図2、赤)。さらに Rubisco の一部が空洞外に飛び出した中間体であることを確認するために、フォールディング開始直後に trap(N265A)を加えて变性 Rubisco と結合させフォールディングを阻害したところ、両者ともに同程度に trap(N265A)によって阻害された。

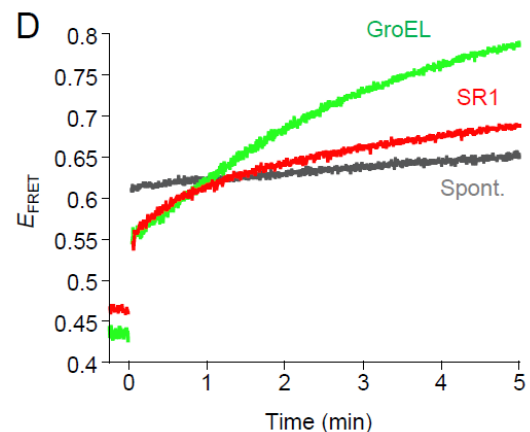
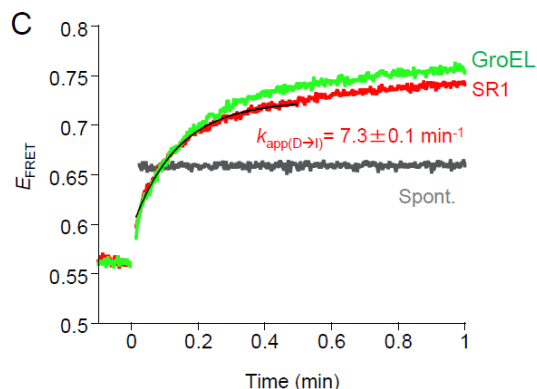
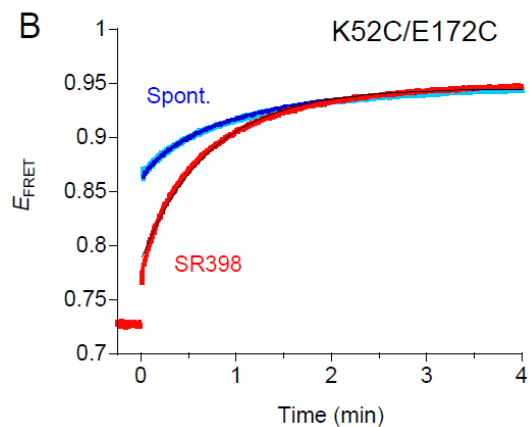
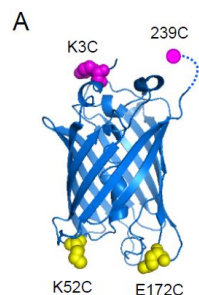


**図2 SRKKK2 空洞内に閉じ込めた Rubisco の熱変性、温度低下によるフォールディング。** 青：25 における 0 分での GroES/ATP の投入による Rubisco のフォールディング。赤：フォールディング 60 分後（青）のサンプルを 45 , 15 分熱変性し、0 分で 25 に温度低下させたときの Rubisco のフォールディング。フォールディング開始後 1 分で Trap(N265A)を加えると、青、赤の条件共にフォールディングが約 20%まで阻害される。

したがって、GroES の結合に伴う変性タンパク質の構造変化はフォールディングの促進には寄与していないこと、空洞内の変性タンパク質は常に空洞外に一部飛び出た中間体を形成することが明らかとなった。これらの結果から、これまでに提唱されていた iterative annealing が正しくないことが明らかとなった（論文）。

(2) シャペロニン空洞内変性タンパク質のアンフォールディング

これまでの研究よりシャペロニン空洞内の変性タンパク質の構造がより広がった構造をしていることを、青色蛍光タンパク質 (BFP) について蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) を用いて確認していた（未発表、図 3A & 3B）。このアンフォールディング効果が他の基質タンパク質でも見られるかどうかを確かめるため、DapA（図 3C）とマルトース結合タンパク質の 2 重変異体 (DMMBP)(図 3D)について新たに FRET による構造変化測定系を構築し、その構造変化を確かめた。



**図3 .Single-pair FRET による変性タンパク質の構造変化測定。** (A) BFP において蛍光標識に用いたシステイン変異箇所。B. BFP(K52C/E172C)の single-pair FRET における FRET 効率変化。Spont.: 自発的フォールディング、SR398: GroEL single-ring 変異体 SR398 によるフォールディング。0 分において GroES/ATP を加えてフォールディング反応を開始。(B) DapA(C20A/T3C/E223C) の FRET 効率変化。(C) DMMBP(D184C・K362C) の FRET 効率変化。

タンパク質を 2 つの蛍光色素で標識するために、ネイティブ構造で近接する 2 つの残基をシステインに置換した変異体を作成した。いずれの基質タンパク質についても、シャペロニンで ATP 投入によりフォールディング反応を開始した直後の FRET 効率の値

は自発的フォールディングの値よりも低く、自発的フォールディングはシャペロニンの時よりもよりコンパクトな状態からフォールディングが開始していることが明らかとなった。

これまでシャペロニンの空洞内で変性タンパク質はコンパクト化されると考えられていたが[1,2]、実際には逆にアンフォールディングされること明らかとなった(研究)。これらの結果は Tethering model (図 1b) が正しいことを示している。

### (3) フォールディング促進に貢献する GroEL/ES の空洞の疎水性残基の網羅的解析

シャペロニンのサブユニット界面だけでなく[3]、空洞内に露出した疎水性残基がフォールディング促進に影響している可能性を検証した。予備実験において GroEL 変異体を発現する大腸菌の生育を指標に評価したところ、GroES(Y71C)、GroEL(Y203C)、GroEL(F281C)、GroEL(Y360C)は生育に影響することがわかった(図 4)。

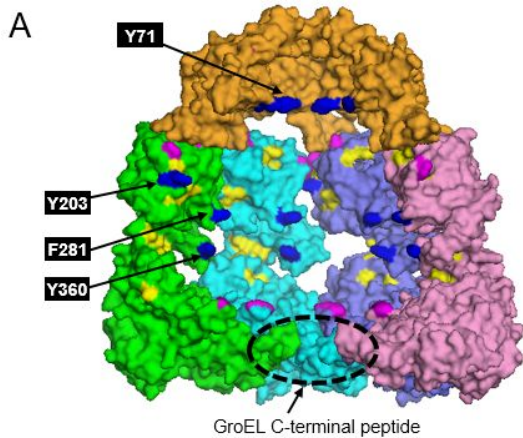


図 4. シャペロニン空洞内の疎水性残基。赤：変異により生育に変化が見られた残基、青：生育の変化なし

これらの変異体についてシャペロニンの single-ring 体を精製してフォールディングへの影響を *in vitro* で解析した。基質タンパク質として BFP を用いたところ、GroES(Y71C)はわずかにフォールディング速度が低下する程度だったが、Y203C 変異体ではフォールディング速度( $k_{in}$ )が半分程度に減少し、escape 速度は 2 倍に上昇した。F281C 変異体と Y360C 変異体では Y203C 変異体ほどではなかったが、同様の変化が見られた。これらの結果から、空洞

中心部に近い疎水性残基はフォールディングを促進すると共に escape を防ぐのに重要な役割があることが明らかとなった。これらの結果は現在論文にまとめているところである。

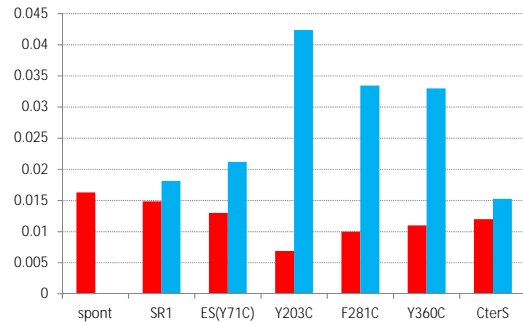


図 5. シャペロニン変異体による BFP の空洞内フォールディング速度( $k_{in}$ )と空洞外エスケープ速度( $k_{out}$ )。赤：変異により生育に変化が見られた残基、青：生育の変化なし

### (4) 高感度かつ短時間な SDS-PAGE 染色方法の開発

本研究を通じてシャペロニンを SDS-PAGE で解析する必要があり、より効率的な CBB 染色方法について検討を行った。様々な条件を検討した結果、高電圧の電源装置を用いて、CBB 染色・脱染を 30 分以内に終了させる方法を見つけた。この方法では従来のメタノールに代わり、エタノールを使用することから、安全性も増している(図 6)。この方法は従来の方法よりも約 2 倍高感度で、5ng 以上の GroEL を検出できた(論文)。

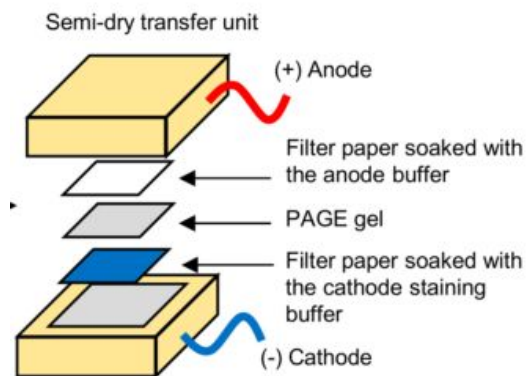


図 5. 電気泳動染色法。赤：変異により生育に変化が見られた残基、青：生育の変化なし

### (5) 組換え真核生物由来シャペロニン(CCT)の活性

我々は好熱性紅藻シゾン来 CCT を大腸菌で発現させることに成功しており、精製 CCT は基質タンパク質であるアクチンに結合できることを確認している。この精製 CCT の



フォールディング活性を調べたが、大腸菌シャペロニンの基質タンパク質である rhodanese, GFP, luciferase には結合せず、フォールディングを促進できなかった。

精製 CCT が ATP を結合できるかを確認めた。蛍光標識された ATP である Cy3-ATP を CCT と混ぜゲル濾過すると、Cy3-ATP は CCT の溶出位置に現れ、結合していることが確認できた (図 6)。

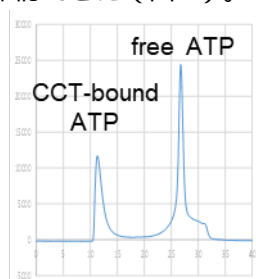


図 6. ゲル濾過による CCT に結合した Cy3-ATP の検出

#### (6) 組換え真核生物由来シャペロニン(CCT)の結晶化

CCT について結晶化スクリーニングを行った。しかし CCT については微少な結晶しか現れず、ヌクレオチドやヌクレオチドアナログ (ATP, AMP-PNP, ADP+AlFx, ADP+BeFx) を加えた条件下でも結晶化スクリーニングを行ったが、結晶を得ることができなかった。

#### <引用文献>

1. Chakraborty, K. *et al.*, *Cell* (2010) **142**:112-22
2. Tang, Y.C. *et al.*, *Cell* (2006) **125**:903-14
3. Motojima, F. and Yoshida, M. *EMBO J.* (2010) **29**:4008-4019
4. Motojima, F., Motojima-Miyazaki, Y. and Yoshida, M. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2012) **109**:15740-15745
5. Shtilerman, M. *et al.* (1999) *Science*. **284**: 822-825
6. Lin, Z. *et al.* (2008) *Nat. Struct. Mol. Biol.* **15**: 303-311

#### 5. 主な発表論文等

(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6件)(査読有)

Motojima, F., Fujii, K., and Yoshida, M., Chaperonin facilitates protein folding by avoiding initial polypeptide collapse (2018) *J. Biochem. in press*

Motojima, F., Rapid Electrophoretic Staining and Destaining of

Polyacrylamide Gels, *Methods and Protocols* (2018) **1**: 13, DOI: 10.3390/mps1020013

Ishida, R. Okamoto, T. Motojima, F. Kubota, H. Takahashi, H. Tanabe, M. Oka, T. Kitamura, A., Kinjo, M. Yoshida, M. Otaka, M. Grave, E. Itoh, H., Physicochemical properties of the mammalian molecular chaperone HSP60, *Int. J. Mol. Sci.* (2018) **19**: 489, DOI:10.3390/ijms19020489

Motojima, F. (2016) フォールディングを改善するシャペロニンのテザリング効果. *生化学*. 88, 791-794

Motojima, F. (2015) How do chaperonins fold protein? *Biophysics (Oxf)*. **11**, 61-70, DOI: 10.2142/biophysics.11.61

Motojima, F., and Yoshida, M. (2015) Productive folding of a tethered protein in the chaperonin GroEL-GroES cage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **466**, 72-75, DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.08.108

[学会発表](計2件)

元島 史尋, 吉田 賢右, ヤペロニンのアンフォールディング作用によるフォールディング促進効果, 第53回日本生物物理学会年会, 2017年9月14日, 金沢大学

元島 史尋, 吉田 賢右, シャペロニンのアンフォールディング作用によるフォールディング促進効果, 第17回日本蛋白質科学会年会, 2017年6月20日, 仙台国際センター

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

元島 史尋 (MOTOJIMA FUMIHIRO)

富山県立大学・工学部・研究員

研究者番号: 70372464