

機関番号：82648

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20370066

研究課題名(和文) シャペロニン GroEL の第二の ATP 結合部位とその機能的役割

研究課題名(英文) The second ATP-binding site of the chaperonin GroEL and its functional role

研究代表者

桑島 邦博 (KUWAJIMA KUNIHICO)

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

研究成果の概要(和文):細胞内の蛋白質の立体構造形成を助ける分子シャペロンの一つである、大腸菌シャペロニン GroEL は、ATP と結合することによってその機能を発揮する。本研究では GroEL への ATP 結合を光親和性標識、アミノ酸配列分析、ストップフロー蛍光スペクトル、滴定型熱量計などを用いて調べた。その結果、(1) Tyr360 近傍に2つ目の ATP 結合部位があること、(2) カリウムイオン非存在下では第1結合部位への ATP 結合のみが観測され、その結合定数は  $10^4 \text{ M}^{-1}$  であること、などが明らかとなった。

研究成果の概要(英文): The *Escherichia coli* chaperonin GroEL, a molecular chaperone that mediates protein folding in the biological cell, expresses its chaperone function through ATP binding. In the present study, we investigated the ATP binding to GroEL by photo-affinity labeling, amino acid sequence analysis, stopped-flow fluorescence spectroscopy, and isothermal titration calorimetry. We found (1) that the second ATP-binding site is present and located near Tyr360, and (2) that in the absence of potassium ion, only the ATP binding to the primary site was observed, and its binding constant is an order of  $10^4 \text{ M}^{-1}$ .

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	7,700,000	2,310,000	10,010,000
2009年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2010年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
年度			
年度			
総計	15,900,000	4,770,000	20,670,000

研究分野：生物物理学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：分子シャペロン, シャペロニン, ATP 結合, アロステリック転移

## 1. 研究開始当初の背景

大腸菌のシャペロニン GroEL は代表的な分子シャペロンであり、物理化学的研究が数多くなされているにもかかわらず、その ATP 結合に関して以下の点が不明のままであった。

(1) GroELの単一リング変異体 SR1 のアロステリック転移速度定数の ATP 濃度依存性が二段シグモイド状となることから、第二の ATP 結合部位の存在が期待されるが、それが分子中のどこにあるのかが不明である。

(2) ATP 結合によって誘起される GroEL のア

ロステリック転移に関しては研究代表者のものも含め数多くの研究があり、その詳細が明らかになりつつあるが、アロステリック転移が起こる前の ATP 結合過程そのものについてはよく分かっていない。

## 2. 研究の目的

(1) 上記の第二 ATP 結合部位を、光親和性標識、質量分析、アミノ酸配列分析の手法を用いて同定する。

(2) GroEL のアロステリック転移が起こる前の、ATP 結合過程を、平衡論的および速度論的に調べることの出来る条件を検討し、ATP 結合の熱力学および速度論的パラメータを明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) 第二 ATP 結合部位の同定には、アジド ATP を利用した光親和性標識、リシンエンドペプチダーゼによる加水分解、蛍光性亜鉛作体による標識ペプチド検出、アミノ酸配列分析、質量分析の方法を用いた。

(2) ATP 結合反応の解析には、GroEL のトリプトファン変異体 (Y485W) の蛍光スペクトルを利用して、蛍光ストップフロー法を用いた。また、カリウムイオン非存在下、4-5°C では、ATP 結合によるアロステリック転移とそれに引き続く ATP 加水分解が停止し、ATP 結合反応のみが起こることを利用して、滴定型熱量計による ATP 結合の熱力学的解析を行った。

## 4. 研究成果

(1) 光親和性標識による ATP 結合部位の同定：アジ化 ATP アナログによる光親和性標識、蛋白質分解酵素による分解産物の HPLC 解析、アミノ酸配列分析、質量スペクトル解析によって、光親和性標識されたアミノ酸が Tyr360 であることが明らかとなり、第二 ATP 結合部位はこの近くにあることが明らかとなった。

(2) アロステリック転移に及ぼす  $K^+$  の影響：pH 7.5, 10 mM  $MgCl_2$  の条件下で、KCl 濃度を 0, 10, 50 mM に振って、GroEL (Y485W 変異体) の ATP によるアロステリック転移の速度過程をストップフロー蛍光法を用いて調べた。その結果、速度定数の ATP 濃度依存性において、50 mM KCl で観測された第二の ATP 結合に対応するとされている二つ目のシグモイドが 0 と 10 mM KCl では全く観測されなかった。また、KCl なしでは、ATP のアロステリック転移そのものとそれに引き続く ATP 加水分解も停止するが、ATP の結合に伴う蛍光

変化は観測された。

(3) GroEL への ATP 結合の速度過程解析：蛍光ストップフロー法を用いて GroEL の Y485W 変異体の ATP 結合過程を測定した。 $K^+$ 非存在下で、ATP の結合に伴う蛍光強度変化が観測された。この反応は二分子反応として良く表され、結合と解離の反応速度定数を決定することが出来た。これらの速度定数から求められた結合定数は、等温滴定型熱量計により決定した結合定数と一致した。結合速度定数のアイリング・プロットから求めた活性化エンタルピーは 14-15 kcal/mol と十分大きいので、ATP の GroEL への結合は、拡散律速的な遭遇複合体形成の後、高エネルギーの遷移状態を通して進行することが分かった。

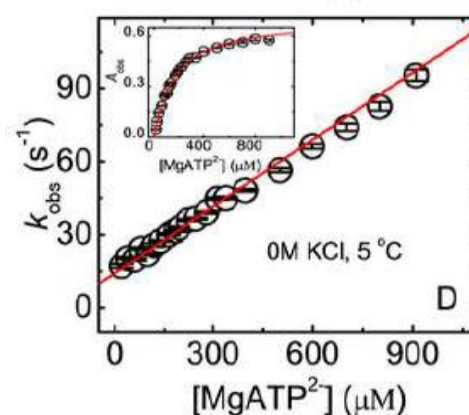


図1 見かけの速度定数および蛍光強度変化量（枠内）の  $MgATP^{2-}$  濃度依存性。

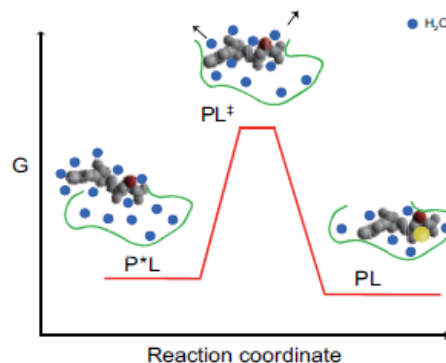


図2  $MgATP^{2-}$  の GroEL への結合過程の模式図。初めに形成された遭遇複合体 ( $P^*L$ ) が高い活性化エンタルピーを持つ遷移状態 ( $PL^{\ddagger}$ ) を経て最終複合体 ( $PL$ ) を形成する。GroEL の結合部位を緑の線、ATP を灰色の実体球模型、 $Mg^{2+}$  を赤い球、 $K^+$  を黄色い球で表した。

(4) 滴定型熱量計 (ITC) による GroEL への ATP 結合測定: KCl 非存在下では GroEL のアロステリック転移は起こらないが、ATP 結合を観測することはできたので、この結合を、ITC を用いて観測することを試みた。5 °C で明確な滴定曲線が観測され、結合定数  $9.5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ 、エンタルピー変化  $\Delta H_b = -3.52 \text{ kcal/mol}$  を得た。

#### 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 10 件)

- ① Chen, J., Makabe, K., Nakamura, T., Inobe, T. & Kuwajima, K. Dissecting a bimolecular process of  $\text{MgATP}^{2-}$  binding to the chaperonin GroEL. *J. Mol. Biol.*, in the press. (2011). (査読有)
- ② 中村敬, 眞壁幸樹, 桑島邦博「何が蛋白質のフォールディング経路を決めるのか?」*Medical Bio 9 月号別冊「揺らぎと生体機能」* pp. 52-57 オーム社 東京 (2010). (査読無)
- ③ Kanzaki, T., Ushioku, S., Nakagawa, A., Oka, T., Takahashi, K., Nakamura, T., Kuwajima, K., Yamagishi, A. & Yohda, M. Adaptation of a hyperthermophilic group II chaperonin to relatively moderate temperatures. *Protein Eng. Des. Sel.* **23**: 393-402 (2010). (査読有)
- ④ 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)
- ⑤ Ochi, A., Makabe, K., Kuwajima, K. & Hori, H. Flexible recognition of the tRNA G18 methylation target site by TrmH methyltransferase through first binding and induced fit processes. *J. Biol. Chem.* **285**: 9018-9029 (2010). (査読有)
- ⑥ 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)
- ⑦ 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)

- ⑧ 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)
- ⑨ Kanzaki, T., Iizuka, R., Takahashi, K., Maki, K., Masuda, R., Sahlan, M., Yébenes, H., Valpuesta, J.M., Oka, T., Furutani, M., Ishii, N., Kuwajima, K. & Yohda, M. Sequential action of ATP-dependent subunit conformational change and interaction between helical protrusions in the closure of the built-in lid of group II chaperonins. *J. Biol. Chem.* **283**: 34773-34784 (2008). (査読有)
- ⑩ 桑島邦博「真性体および組換え体 $\alpha$ ラクトアルブミンの構造の安定性とダイナミクス」, *Milk Science* **56**: 119-122 (2008). (査読無)

[学会発表] (計 50 件)

- ① K. Kuwajima, "Molecular mechanisms of the *Escherichia coli* chaperonin function," 3rd APPA Conference, Shanghai University, Shanghai, China, May 6-7, 2011.
- ② Q. Zhang, H.-M. Zhang, J. Chen, M.R. Emmett, C.L. Hendrickson, K. Kuwajima and A.G. Marshall, "Solution-phase H/D exchange coupled with FT-ICR MS to probe conformational dynamics of the ATP-dependent chaperone, GroEL," 8th North America FT MS Conference, Key West, Florida, USA, May 1-5, 2011.
- ③ A. Mukaiyama, T. Nakamura, K. Makabe, K. Maki, Y. Goto and K. Kuwajima, "Folding mechanism of  $\beta_2$ -microglobulin and its relationship to dialysis-related amyloidosis," 3rd Japan-Korea Seminar on Biomolecular Sciences - Experiments and simulations, Lotte Hotel, Jeju, Korea, February 26 - March 1, 2011.
- ④ K. Kuwajima, "Molecular Mechanisms of Protein Folding," The Overseas Sokendai Lecture in Bangkok FY2010 & The Inaugural CU-IMS Joint Symposium, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand, October 20 - 21, 2010.
- ⑤ 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.
- ⑥ 桑島邦博,「蛋白質フォールディング経路の速度論的理解」, 2010 年日本物理学会

- 秋季大会シンポジウム「揺らぎが決める生体分子の構造形成と機能発現」, 大阪府立大学・中百舌鳥キャンパス, 2010年9月.
- ⑦ K. Kuwajima, "Identification of fatty-acid binding site in the anti-tumor complex of  $\alpha$ -lactalbumin by 920-MHz NMR spectroscopy," IPR Seminar "Cooperation in Protein Science between Asian and Pacific Countries," the Institute for Protein Research, Osaka University, June 14 (Mon), 2010.
- ⑧ 桑島邦博, 「蛋白質フォールディング問題とバイオサイエンス」, 蛋白研一統合バイオ共同セミナー, 大阪大学蛋白質研究所, 2010年4月22日.
- ⑨ 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.
- ⑩ 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.
- ⑪ J. Chen, K. Makabe and K. Kuwajima, "Dissecting a bimolecular mechanism of ATP binding to the chaperonin GroEL," 4<sup>th</sup> International Symposium of "Molecular Science of Fluctuations toward Biological Functions", Piazza Omi, Ohtsu, Nov. 30 - Dec. 1, 2010.
- ⑫ T. Nakamura, K. Makabe, T. Aizawa, K. Kawano, M. Demura and K. Kuwajima, "The molten globule state and its biological function in  $\alpha$ -lactalbumin", 4<sup>th</sup> International Symposium of "Molecular Science of Fluctuations toward Biological Functions", Piazza Omi, Ohtsu, Nov. 30 - Dec. 1, 2010.
- ⑬ K. Makabe, T. Nakamura and K. Kuwajima, "Folding study of outer surface protein A," The 4<sup>th</sup> International Symposium of Molecular science of fluctuations toward biological functions, Nov. 30 - Dec. 1, 2010.
- ⑭ J. Chen, K. Makabe and K. Kuwajima, "Dissect a bimolecular mechanism of ATP binding to the chaperonin GroEL", YSF forum, OzBio2010 conference, 12<sup>th</sup> IUBMB conference, 21<sup>st</sup> FAOBMB conference, Melbourne, Australia, Sep. 23-26, 2010.
- ⑮ K. Makabe, T. Nakamura and K. Kuwajima, "Folding study of outer surface protein A," 24<sup>th</sup> annual symposium of the protein society, San Diego, USA, Aug. 1-5, 2010.
- ⑯ J. Chen, K. Makabe and K. Kuwajima, "Dissect a bimolecular mechanism of ATP binding to the chaperonin GroEL," 35<sup>th</sup> FEBS Congress, Gothenburg, Sweden, Jun.26- Jul. 1, 2010.
- ⑰ J. Chen, K. Makabe and K. Kuwajima, "A Potassium Switch of ATP-Induced GroEL Conformational Changes," 2nd Japan-Korea Seminar on Biomolecular Sciences – Experiments and Simulations (Asian Core Program by JSPS), Symposion Hall, Nagoya University, December 22- 23, 2009.
- ⑱ T. Nakamura, K. Makabe, T. Aizawa, K. Kawano, M. Demura and K. Kuwajima, "The molten globule state and its biological function in  $\alpha$ -lactalbumin," 2nd Japan-Korea Seminar on Biomolecular Sciences – Experiments and Simulations (Asian Core Program by JSPS), Symposion Hall, Nagoya University, December 22- 23, 2009.
- ⑲ K. Makabe, S. Koide and K. Kuwajima, "Role of the Main-Chain Hydrogen Bonding in  $\beta$ -Sheet Register," 2nd Japan-Korea Seminar on Biomolecular Sciences–Experiments and Simulations (Asian Core Program by JSPS), Symposion Hall, Nagoya University, December 22- 23, 2009.
- ⑳ A. Mukaiyama, T. Takahashi, K. Makabe and K. Kuwajima, "Hydrogen-exchange kinetics of the *Escherichia coli* chaperonin complex," 2nd Japan-Korea Seminar on Biomolecular Science– Experiments and Simulations (Asian Core Program by JSPS), Symposion Hall, Nagoya University, December 22-23, 2009.
- 21 K. KUWAJIMA, "A minor component of native  $\beta$ 2-microglobulin and its relationship to dialysis-related amyloidosis," The 9th KIAS–SNU Conference on Protein Structure and Function, Seoul National University, Seoul, Korea, October 2009.
- 22 桑島邦博, 「大腸菌シャペロニンの構造ダイナミクスと機能発現」, 第 58 高分子討論会シンポジウム「生体に学ぶセンシング, 物質輸送, 分離」, 熊本大学工学部, 2009年9月.
- 23 K. KUWAJIMA, "Hydrogen-exchange kinetics of the *Escherichia coli* chaperonin complex," Japan-Korea Symposium on Molecular Science 2009 "Chemical Dynamics in Materials and Biological Molecular Sciences," (Asian Core Program by JSPS), Awaji Yumebutai International Conference Center, July 2009.
- 24 桑島邦博, 「大腸菌シャペロニンの構造ダイナミクスと機能発現」, 第9回日本蛋白質科学会年会ワークショップ「生体分子の揺らぎと機能」, 熊本全日空ホテル, 2009年5月.

- 25 桑島邦博, 「相同蛋白質のフォールディング機構:  $\alpha$  ラクトアルブミンとリゾチームの比較研究」, 次世代スパコンプロジェクト・ナノ分野グランドチャレンジ研究開発・ナノ統合拠点分子科学 WG 連続研究会「タンパク質制御(フォールディング)」, 東京医科歯科大学, 2009年3月.
- 26 K. KUWAJIMA, "Folding mechanism of homologous proteins: A comparative study between  $\alpha$ -lactalbumin and lysozyme," 科研費特定領域研究「水と生体分子」成果取りまとめ公開シンポジウム, 岡崎コンファレンスセンター, 2009年3月.
- 27 K. KUWAJIMA, "Pathway vs. funnel perspectives of protein folding," Korea-Japan Seminars on Biomolecular Sciences—Experiments and Simulations (Asian Core Program by JSPS), Korea Institute for Advanced Study (KIAS), Korea, February 27-March 2, 2009.
- 28 桑島邦博, 「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」, 科研費新学術領域研究「揺らぎと生体機能」第1回公開シンポジウム, 京都テレサ, 2009年1月.
- 29 桑島邦博, 「 $\alpha$  ラクトアルブミンとリゾチームのフォールディング経路はなぜ違うのか?」, 札幌生体高分子シンポジウム, 北海道大学・学術交流会館, 2008年12月.
- 30 K. KUWAJIMA, "Molecular Mechanisms of the Chaperone Function of GroEL," the 8th KIAS - Yonsei Conference on Protein Structure and Function, Seoul (Korea), October 2008.
- 31 K. KUWAJIMA, "Folding Mechanisms of Homologous Proteins: A Comparative Study between Lysozyme and  $\alpha$ -Lactalbumin," ACS 236<sup>th</sup> National Meeting Symposium *Protein Folding Dynamics: Experiment and Theory*, Philadelphia (U.S.A.), August 2008.
- 32 K. KUWAJIMA, "Folding Mechanism of Homologous Proteins: A Comparative Study of  $\alpha$ -Lactalbumin and Lysozyme," 膜蛋白質研究国際フロンティア国際シンポジウム, 千里ライフサイエンスセンター (吹田市), 2008年3月.
- 33 桑島邦博, 「相同蛋白質のフォールディング機構 - イヌ乳リゾチームとヤギ  $\alpha$  ラクトアルブミンの比較研究」, 次世代スーパーコンピュータプロジェクト「ナノ分野グランドチャレンジ研究開発」第2回公開シンポジウム, 岡崎コンファレンスセンター, 2008年3月.
- 34 K. KUWAJIMA "Folding Mechanisms of Homologous Proteins: A Comparative Study between Lysozyme and  $\alpha$ -Lactalbumin," 2nd Pacific Rim International Conference of Protein Science, Cairns (Australia), June

2008.

〔図書〕 (計1件)

- ① Kuwajima, K., Oroguchi, 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 Heiderberg: (2009). (査読無)

〔その他〕

ホームページ

<http://gagliano.ims.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

桑島邦博 (KUWAJIMA KUNIHIRO)

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