

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月31日現在

機関番号：15101
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22570119
 研究課題名（和文）シャペロニン GroEL のドメイン間情報伝達機構に関する機能的・速度論的研究
 研究課題名（英文）Functional and kinetic analysis of the inter-domain communication network of the chaperonin GroEL
 研究代表者
 溝端 知宏（MIZOBATA TOMOHIRO）
 鳥取大学・大学院工学研究科・准教授
 研究者番号：50263489

研究成果の概要（和文）：本研究では、変性蛋白質のフォールディングを補助する GroEL 蛋白質のドメイン構造が機能発現にどのように貢献しているかを解明する為、円順列変異を用いて GroEL のドメイン構造を変え、その影響を機能的・速度論的に解析した。実験の結果、GroEL のドメイン特異的なある構造変化の抽出と機能メカニズムにおけるその構造変化の重要性を解明することに成功した。同時に、この解析を通して GroEL の分子メカニズムの新たな側面を示唆する重要なヒントを得た。

研究成果の概要（英文）：A combination of circular permutation and stopped-flow fluorescence analysis was utilized to probe the relationship between the molecular mechanism of GroEL-facilitated protein folding and the unique three-domain subunit structure of the GroEL protein. Through analysis of multiple circularly permuted GroEL variants, we succeeded in correlating a specific, domain-dependent conformational change to an important functional aspect of the chaperonin mechanism. Additionally, our results prompt a reevaluation of the conventional mechanism of GroEL-facilitated folding.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：変性とフォールディング，シャペロニン，ストップト・フロー解析，円順列変異

1. 研究開始当初の背景

シャペロニンは細胞内で変性した蛋白質の構造を回復させるためにこの変性蛋白質に結合し、その非特異的凝集（アグリゲーション）を防ぐ。この効果は、シャペロニンが変性蛋白質を特異的に認識・結合し、その変性蛋白質を溶媒から隔離された自身の内部空間に一時的に格納することにより実現している。変性蛋白質分子を自構造内部に「カプセル化」するユニークなシャペロニン

の分子メカニズムでは、様々な蛋白質の相互作用が複雑に関与しあい、そして ATP の加水分解反応によりその進行が制御されることがここ十数年の研究で明らかとなっている。

大腸菌由来のシャペロニン蛋白質 GroE は様々な生物由来の変性蛋白質を認識する能力を示すため、シャペロニン研究において一つの基準系とみなされている。GroE は大小2種類のサブユニット、分子量 57 kDa の GroEL 14 分子と分子量 10 kDa の GroES 7 分子によ

り構成される。ATP 加水分解活性と連動させて変性蛋白質の認識と溶媒からの隔離を主に担当するのは GroEL 蛋白質であり、GroES は補助的な役割を担当する。

X-線結晶構造解析により、2つの7員環リング構造が会合した GroEL 14量体に7分子のATPが結合すると7員環リング構造を形成するGroESが「ふた」のように会合し、変性蛋白質を自身の中に閉じ込めることが判明した。この隔離プロセスは様々な研究により複数の素過程からなる多段階反応であることが示唆されている。GroEL サブユニットのATPを結合した構造はATPを結合していない構造と大きく異なっており、GroEL サブユニットの3個のドメイン(頂上ドメイン、中間ドメイン、赤道ドメイン)がATP結合に伴いダイナミックにその構造を変化させていることと考えられた。近年、GroELのクライオ電子顕微鏡観察によりこのダイナミックな構造変化と関係が深いとされるGroELの「中間構造」が複数検出された。一方、蛍光ストップ・フロー解析によるとGroELがATPを結合後、少なくとも5つの反応素過程からなるダイナミックなプロセスを経て変性蛋白質分子を隔離していることが確認された。そこで、最近国内外で進められている研究では、クライオ電子顕微鏡観察などで確認されるGroELの様々な構造の情報とストップ・フロー解析などにより得られるダイナミックプロセスの速度論的情報を統合し、GroEのメカニズムの全貌を表す総合的な分子メカニズムを構築することが目指されている。

2. 研究の目的

GroEの構造と動的振る舞いの関連を明らかにすることを目標とした研究では、これまでGroELサブユニットやGroESサブユニットに適当なアミノ酸置換(点変異)を導入してこの変異導入効果を評価することが主に採用された手法であった。この手法はGroEL, GroESの構造内の特定部位に注目し、分子メカニズムにおけるその部位の役割を解明するために大変有効な手法であり、これまで数多くの研究が成果を出し、GroEの理解に貢献してきた。しかし、たとえば変性蛋白質を溶媒から隔離する際、GroELのドメインがどのように連携し、カプセル化を実現するか、などの知見を得るには点変異導入による比較研究では限界があり、より本質的にGroEアーキテクチャーを変える新たな実験手法が望まれる。

そこで、本研究では新しいタイプの分子撰

動法として、GroELサブユニットに円順列変異を導入してGroELのポリペプチド鎖主鎖を変異により改変する手法を採用した。円順列変異によりアミノ酸配列の末端をGroELの各所に移動させ、GroELのドメイン同士の繋がりを変えた後、その変化がGroEの機能に及ぼす影響を詳細に解析することで、GroELの構造が機能発現にどのように関与するかを解析することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) GroEL円順列変異体の作成と機能評価

PCR増幅反応によりGroELの構造遺伝子から開始コドンと終始コドンを除去した後、末端をリンカー配列でつなぎ構造遺伝子を一旦環状化した。続いて、マンガンイオン存在下におけるDNaseIのニック反応を使用し、環状DNAをランダムに直鎖化することで、無作為に円順列変異を導入したGroEL構造遺伝子のプールを作成した。この構造遺伝子プールより主として大腸菌の可溶性画分に発現されるGroELの円順列変異体を3種類選択し、シャペロン機能の維持を確認し、機能メカニズムの変化の有無を評価した。

(2) GroEL円順列変異体の蛍光ストップ・フロー解析

次に、性質決定を実施した円順列変異体の中から2変異体(GroEL CP376変異体とGroEL CP86変異体)を選び、蛍光ストップ・フロー解析を実施するためのトリプトファン残基を変異体の頂上ドメインに導入した。トリプトファンを導入した部位(頂上ドメインの231番目のArg→Trp変異; 図2, 黄色)は、以前代表研究者が実施した研究で利用した部位であり、この部位を用いて得たデータの蓄積があるので、今回の円順列変異体にも同じ部位へトリプトファンを導入し、ストップ・フロー解析を実施することにした。

(3) GroEL CP86円順列変異体の可逆的機能調節を目指したジスルフィド結合導入と評価

機能評価、並びにストップ・フロー解析を実施した円順列変異体の中からGroEL CP86変異体を選び、円順列変異導入の効果特異性を確かめるためポリペプチド鎖のN末端、C末端にシステインを導入してポリペプチド鎖末端をジスルフィド結合で連結できる新たな変異体(GroELCP86-C4変異体)を作成し、ジスルフィド結合を形成させた場合の変異体の性質を調べた。

4. 研究成果

(1) GroEL円順列変異体の獲得と性格付け

GroEL の構造遺伝子を環状化し、その後ランダムに直鎖状 DNA に戻すことで作成したランダム円順列変異体の遺伝子プールより 3 種類の円順列変異体を選択し、性格付けを行った。この 3 種類の円順列変異体では GroEL サブユニット構造の様々な位置にポリペプチド鎖末端が移動していたが、すべての変異体は GroEL の基本的機能の一つである ATP 加水分

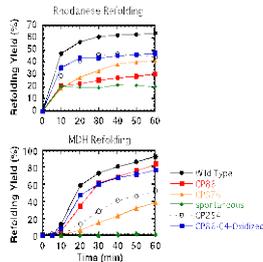


図 1. GroE 円順列変異体の変性蛋白質フォールディング補助反応。

解活性を保持していた。また、野生型 GroEL に比べ効果は低減していたものの、変性した蛋白質のフォールディングを補助する能力はすべての変異体において保持されていた (図 1)。この結果より、GroEL の機能を維持しつつポリペプチド鎖の末端をサブユニットの別の位置に移動させ、その変異の効果を解析することはシャペロンの機能を理解する上で有効な実験手段であることが示された。

機能評価を実施した変異体の中から、GroEL の頂上ドメインと中間ドメインをつなぐ蝶番部位 (ヒンジ 2 部位) に変異が導入された CP376 変異 (図 2 ; 紫) と、GroEL の赤道ドメイン内に存在する ATP 加水分解反応部位に隣接した位置に変異が導入された CP86 変

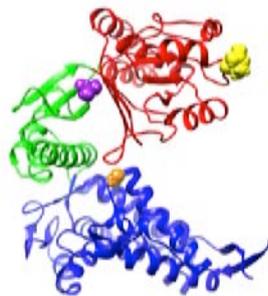


図 2. GroEL サブユニットと本研究の変異導入箇所。黄色 ; Arg231, 紫 ; Val376, 橙 ; Gly86。

異体 (図 2, 橙) を選択し、より詳細な機能評価とストップ・フロー解析を実施した。

(2) GroEL 円順列変異体のストップ・フロー解析

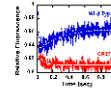


図 3. GroELCP376 変異体のストップ・フロー解析。0.2~1 秒付近の Phase C 消失が確認。

2 種類の円順列変異体、CP376 と CP86 の頂上ドメインにトリプトファン残基を導入し、その蛍光強度を指標に ATP 結合に伴う構造変化をストップ・フロー解析で追跡した結果、頂上ドメインと中間ドメインを結ぶヒンジ 2 部位にポリペプチド鎖末端が移動した CP376 ではある特定の構造変化 (Phase C と呼ばれる、見かけの反応速度定数 $k = 2 \text{ s}^{-1}$ の蛍光強度増加) が特異的に抑制されていることが確認された (図 3 ; 赤)。この Phase C は以前の研究において、GroEL に変性蛋白質が結合した場合その反応速度が減少することが確認されている。今回 GroEL CP376 が示した性質と合わせて考察すると、Phase C は GroEL の頂上ドメインが ATP 結合に伴い変性蛋白質を内部にカプセル化するときに必要なドメインの「ティルティング ; 持ち上がり動作」に該当すると考えられた。

また、CP376 変異体は頂上ドメインに結合する GroES 蛋白質に対する振る舞いも変化していた。野生型 GroEL では ATP が結合するのが GroES 結合の必須条件であるが、CP376 変異体では ATP 非存在下でも GroES の結合が確認された。CP376 変異体では、変異の結果頂上ドメインの配向において自由度が増したため、それまで厳密に制御されていた GroES 結合やカプセル化に伴い誘発される特異的な構造変化に影響が及んだものと考察された。

一方、ATP 結合部位近傍に変異が導入された CP86 変異体のストップ・フロー解析では、ATP 結合に伴う頂上ドメインの構造変化がほとんど観測されなくなり、CP376 変異体と比べ変異の影響はよりシビアなものとなった。しかし、その一方で CP86 変異体は変性したリンゴ酸デヒドロゲナーゼのフォールディングを野生型の GroEL 並み、CP376 変異体と比べ高い水準で補助することができた (図 1, "CP86")。この結果はシャペロンの作用メカニズムと GroEL サブユニットのドメイン構造変化との関連について大きな疑問を呈する実験結果となった。その後、詳細な実験を実施した結果、CP86 変異体においては ATP 結合後、GroEL 頂上ドメインの構造

変化が発生しない状態でGroESの結合と変性蛋白質のカプセル化が進行していることが明らかとなった(図4)。この実験結果はGroELがATP, GroESと共同して変性蛋白質を隔離・保護する一連のプロセスについて再考を促す結果となった。すなわち, CP86においてはGroELの頂上メインが大規模な構造変化を起こす前にGroESの結合が可能になっていたため, 野生型のGroELにおいても「ATP結合」→「GroESの結合と変性蛋白質の隔離」→「頂上ドメインの構造変化とカプセル完成」という逐次的な反応メカニズムが存在する可能性が示唆された。

(3) GroEL円順列変異体CP86-C4による可逆的な変異効果の調節

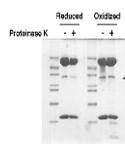


図4. GroEL CP86 変異体では GroES+ATP 存在下に変性ローダネーゼ (矢印) の Proteinase K による消化を防ぐ(*)。

GroEL CP86 円順列変異体を用いた実験で得られた成果は今後の研究にとってきわめて重要な意味を持つものであったため, この変異体が見せる特徴的な性質がどの程度変異導入に由来するものであるか, 円順列変異の「特異性」を確認する必要性が生じた。そこで, 円順列変異導入の効果がポリペプチド鎖主鎖の切断に由来する効果であれば, 変異の効果を相殺するような別の分子結合導入が可能であると考え, CP86 変異体のポリペプチド鎖末端をジスルフィド結合で連結することを試みた。CP86 変異体の N 末端と C 末端近傍にそれぞれ 2 個のシステイン残基を導入し, この変異体を酸化型グルタチオンで処理した場合の性質変化を追跡した。実験の結果, CP86-C4 変異体は溶液中に ATP が存在する状態で酸化型グルタチオン処理を実施すると, その機能的性質が野生型 GroEL のものに近づくことが変性蛋白質のフォールディング補助アッセイにより確認された (図1; "CP-86-C4-Oxidized")。この結果は CP86 変異体において野生型と異なる機能的性質を示す主な原因は円順列変異導入によりポリペプチド鎖主鎖が切断されたためであると強く示唆している。と同時に, CP86-C4 変異体において申請者は円順列変異の効果を持続的に調節できる手段を獲得したことを

意味しており, このユニークな実験系を用いてより詳細に円順列変異導入の効果を明らかにすることが可能となった。

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7件)

- ① Noi, K., Kitamura, A., Hirai, H., Hongo, K., Sakurai, T., Mizobata, T., and Kawata, Y. (2012) Suppression of Sup35 amyloid fibril formation by group II chaperonin from *Thermoplasma acidophilum*. *Am. J. Mol. Biol.* **2**, 265-275 (査読あり)
- ② Izawa, Y., Tateno, H., Kameda, H., Hirakawa, K., Hato, K., Yagi, H., Hongo, K., Mizobata, T., and Kawata, Y. (2012) Role of C-terminal negative charges and tyrosine residues in fibril formation of alpha-synuclein. *Brain and behavior* **2**, 595-605 (査読あり)
- ③ Hongo, K., Itai, H., Mizobata, T., and Kawata, Y. (2012) Varied effects of *Pyrococcus furiosus* prefoldin and *P. furiosus* chaperonin on the refolding reactions of substrate proteins. *J Biochem* **151**, 383-390 (査読あり)
- ④ Mizobata, T., Uemura, T., Isaji, K., Hirayama, T., Hongo, K., and Kawata, Y. (2011) Probing the functional mechanism of *Escherichia coli* GroEL using circular permutation. *PLoS One* **6**, e26462 (査読あり)
- ⑤ Iwasa, H., Meshitsuka, S., Hongo, K., Mizobata, T., and Kawata, Y. (2011) Covalent structural changes in unfolded GroES that lead to amyloid fibril formation detected by NMR: insight into intrinsically disordered proteins. *J. Biol. Chem.* **286**, 21796-21805 (査読あり)
- ⑥ Yagi, H., Takeuchi, H., Ogawa, S., Ito, N., Sakane, I., Hongo, K., Mizobata, T., Goto, Y., and Kawata, Y. (2010) Isolation of short peptide fragments from alpha-synuclein fibril core identifies a residue important for fibril nucleation: a possible implication for diagnostic applications. *Biochim. Biophys. Acta* **1804**, 2077-2087 (査読あり)
- ⑦ 溝端知宏, 河田康志 (2010) 「タンパク質のフォールディングを補助するシャペロニンの構造と働き」鳥取大学大学院

[学会発表] (計15件)

- ① 池田 雅史; 「CXXCモチーフを導入したシャペロニン変異体の機能解析」, 第85回日本生化学会大会, 2012年12月16日, 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡
- ② 水田 敏史; 「ストップフロー解析法を用いた円順列変異型 GroELCP86の機能的、速度論的解析」, 第85回日本生化学会大会, 2012年12月16日, 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡
- ③ 安藤 華純; 「シングルリング GroEL 変異体におけるアピカルドメインの動きと働き」, 第85回日本生化学会大会, 2012年12月16日, 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡
- ④ Tomohiro Mizobata; “Elucidating the Molecular Mechanism of Chaperonin-facilitated Protein Folding”, 2nd Seminar on Green Sustainable Chemistry in Tottori, 2012年12月03日, 鳥取大学
- ⑤ 溝端 知宏; 「大腸菌GroELの機能発現における頂上ドメインの動きと役割」, 大阪大学蛋白質研究所セミナー「分子シャペロンの機能発現の新展開と細胞制御」, 2012年11月15日, 大阪大学蛋白質研究所
- ⑥ Toshifumi Mizuta; 「GroEL 円順列変異体 CP86 のストップフロー機能解析」, 第50回日本生物物理学会年会, 2012年09月22日, 名古屋大学 東山キャンパス
- ⑦ 池田 雅; 「GroEL Cavity 内部へのジスルフィド交換モチーフ導入の試み」, 第84回日本生化学会大会, 2012年9月22日, 国立京都国際会館
- ⑧ 溝端知宏; 「円順列変異体GroELを用いたシャペロニンの機能解析」, 第12回日本蛋白質科学会年会, 2012年06月20日, 名古屋国際会議場
- ⑨ Tomohiro Mizobata; “Using circular permutation to probe various characteristics of E. coli GroEL”, 2012 Meeting on Molecular Chaperones and Stress Responses, 2012年05月03日, Cold Spring Harbor Laboratory, New York
- ⑩ 伊佐治 算浩; 「GroEL 円順列変異体 CP376 の蛍光ストップフローを用いた解析」, 第84回日本生化学会大会, 2011年9月23日, 国立京都国際会館
- ⑪ 荒木 紀帆; 「シャペロニン GroEL の機能的構造変化の中心点 HingeII 部位の Gly192 残基の変異体機能解析」, 第84回日本生化学会大会, 2011年9月23日,

国立京都国際会館

- ⑫ 岡田 拓也; 「GroEL 円順列変異体 CP254 の構造・機能相関解析」, 第84回日本生化学会大会, 2011年9月23日, 国立京都国際会館
- ⑬ 溝端 知宏; 「円順列変異型GroELの機能的性質とタンパク質工学」, 第52回日本生化学会 中国・四国支部例会, 2011年5月13日, 広島大学 広仁会館
- ⑭ Tomohiro Mizobata; “Modulation of the Altered Functional Characteristics of Circularly Permuted GroEL through the Introduction of Disulfide Bonds”, The 4th International Symposium on “Molecular Science of Fluctuations toward Biological Functions”, 2010年11月30日, Piazza Omi, Shiga Japan
- ⑮ Tomohiro Mizobata; “Altered Functional Characteristics of Circularly Permuted GroEL Variants”, The 3rd International Symposium on “Protein Community”, 2010年9月14日, Hotel Nikko Nara, Nara Japan

[その他]

<ミニレビュー>

1. 溝端知宏, 河田康志 「ヤヌスの二つの顔: 大腸菌シャペロニン GroEL の頂上ドメインに関する最近の研究」生化学 82, 612-617 (2010)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

溝端 知宏 (MIZOBATA TOMOHIRO)

鳥取大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号: 50263489