

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440026

研究課題名(和文) シャペロニン反応メカニズムの再検証：円順列変異型GroELの構造・機能解析

研究課題名(英文) Re-evaluation of the molecular mechanism of chaperonin action: characterization of circularly-permuted GroEL

研究代表者

溝端 知宏 (Mizobata, Tomohiro)

鳥取大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：50263489

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：変性蛋白質の構造回復を促すシャペロニンは大小2種類の蛋白質がATPの結合・加水分解に依存してダイナミックに構造を変化させ、解離会合を繰り返すことで機能を発揮する。本研究では、シャペロニンの作用機構を分子レベルで理解するため、大腸菌由来のシャペロニンGroELに様々な機能障害を引き起こす変異を導入し、変異型GroELがATP依存的に構造を変化させる様子を蛍光ストップ・フロー法で解析した。計3種類の変異体を解析した結果、GroELの分子機構において複数の重要イベント(変性蛋白質に対する親和性を調節する、等)が同時進行している「並列型」の反応機構が確認できた。

研究成果の概要(英文)：Chaperonins facilitate the folding of numerous proteins by binding to aggregation-prone protein molecules and isolating them from solution. During this process, chaperonins typically alter their subunit conformations dynamically in response to ATP binding and hydrolysis. To understand this mechanism at the molecular level, in this study we analyzed and compared functionally impaired mutant versions of the bacterial chaperonin GroEL using stopped-flow fluorescence analysis. Our results showed that numerous molecular events, such as the expansion of the molecular capsule that segregates denatured protein and the binding of co-chaperonins that form the lid of the "capsule", occur simultaneously upon completion of a specific conformational transition in GroEL. We also determined that specific conformational changes alter the affinity of GroEL toward denatured proteins, and this allows a smooth transition of the molecular mechanism through multiple cycles.

研究分野：細胞内外蛋白質フォールディングの物理化学的解析

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

1. 研究開始当初の背景

シャペロニン¹は細胞内において蛋白質の構造維持と凝集抑制に寄与する分子シャペロニンの代表例で、ほとんどすべての生物で保存されている。シャペロニンの作用機序は変性し、疎水性部位を露出させた蛋白質分子を認識・結合した後、特徴的な二重リング型の四次構造内にこの分子を取り込み、一時的に溶媒から隔離し、構造の再生を促すものである。シャペロニンの構成サブユニットは ATP の結合と加水分解に連動してダイナミックにその構造を変化させ、この分子隔離・フォールディング促進効果を実現していることがこれまでの研究で解明されている。

シャペロニンを対象とした研究の大半は大腸菌由来の GroE タンパク質を用いて行われている。GroE は分子量 57 kDa の GroEL サブユニット 14 個と分子量 10 kDa の GroES サブユニット 7 個が ATP 依存的に会合して形成する計 21 量体の巨大蛋白質複合体であり、変性蛋白質の隔離空間を形成するのは GroEL サブユニット、ATP 依存的に結合し空間に「ふた」をするのが GroES サブユニットである。クライオ電子顕微鏡解析や蛍光ストップ・フロー解析により、GroEL は作用機構において構造を絶えず変化させながら蛋白質分子の取り込みと溶媒への再解放を繰り返しており、シャペロニンの仕組みを解明するためにはこの構造変化を詳細に解析し、個別機能と関連づけることが極めて重要となる。

申請者は以前の研究(基盤研究(C) 課題 22570119)において、この課題に取り組むために GroEL サブユニットを「円順列変異法」で摂動する手法を取り入れた。円順列変異法を活用することで GroEL サブユニットのペプチド主鎖に変化を導入し、GroEL を構成する 3 つのドメインの連結様式を変え、その変化が GroEL の機能に及ぼす影響を詳細に解析した。その研究において性格付けを実施した一つの変異体(CP86 変異体)では、GroEL のダイナミックな構造変化がほとんど実行不能な状態に有りながら、GroES の結合、並びに特定の蛋白質のフォールディング補助が実現した。この円順列変異体のユニークな特性が「GroEL サブユニットの構造変化」と「GroEL の機能メカニズム」の関係を再検証するきっかけとなった。

2. 研究の目的

円順列変異体の実験結果より、GroEL・GroES が ATP 依存的に相互作用する具体的な時系列イベントの詳細について再検証する必要が生じた。そのため本研究では、ある時点で反応サイクルが途中停止するような機能障害型の GroEL 変異体を複数用意し、蛍光トリプトファン残基を部位特異的に導入した後に蛍光ストップ・フロー法で解析することにより各々の GroEL のサブユニット構造変化がどのような機能的役割を果たしているかを特定し、分子メカニズムを構築す

る。これまでのシャペロニンの作用機構において詳細が不明であった個別イベントまで特定し、時系列的に説明することが本研究の最終目標である。

3. 研究の方法

本研究では各々の GroEL 変異体に蛍光レポーター分子となるトリプトファン残基をサブユニット頂上ドメインの特定部位に導入し、様々な条件下での蛍光ストップ・フロー解析を実施することを研究の基本手法として活用した。トリプトファンを導入した部位は頂上ドメインの Arg231 位で、この部位は GroEL が変性蛋白質を認識する部位、そして GroES と結合する部位に大変近く、これらの分子イベントの検出にも利用可能であることがこれまでの申請者の研究により実証されている。加えて、Arg231->Trp 変異は野生型 GroEL、及び各種変異体の機能的な影響が最小限であることも確認されており、GroEL の分子動的メカニズムを解析する上で理想的なプローブと言える。

研究に利用した GroEL 変異体は以下の 3 種類である。

(1) GroEL CP86 変異体 :

GroEL CP86 は円順列変異によりサブユニットの頂上ドメインと中間ドメインの連結が一部損われた構造を持つ変異体である。この変異体は野生型の GroEL と比べ、フォールディングを補助する蛋白質の種類が異なること(標的選択性の相違)や、ATP 加水分解活性の低下などが確認されている。

(2) GroEL D398A 変異体 :

GroEL D398A 変異体は GroEL サブユニットの ATP 加水分解活性部位近傍に変異が導入された結果、ATP 加水分解活性が野生型の 2%程度の値に低下した変異体である。しかしながらこの変異体は ATP や GroES との結合が野生型と同程度であることが確認され、変性蛋白質とも野生型とほぼ変わらない親和性で結合する。GroEL D398A 変異体は GroEL サブユニットが ATP を加水分解する直前の段階まで反応サイクルが進行して止まる「途中停止型」変異体の代表例として知られている。

(3) GroEL SR-1 変異体 :

GroEL SR-1 は GroEL サブユニットに 4 箇所の変異を導入した結果、野生型の 14 量体二重リング構造が 7 量体一重リング構造に変換された構造変異体である。この変異体では、変性蛋白質の結合、ATP 加水分解、GroES の結合のいずれもが野生型とほぼ同様に行われるが、反応サイクルが片方の「リング」からもう一方のリングに移行する時点で停止する変異体であると確認されている。野生型 GroEL で実現されている「リング交替型」反応サイクルが途中停止する変異体として本研究では解析されている。

4. 研究成果

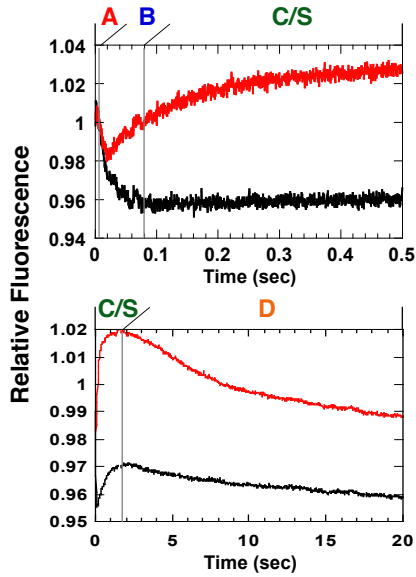


図 1. GroEL R231W の蛍光ストップ・フロー解析。本研究では GroEL R231W が見せる 5 つの構造転移 (A~D,S) が各変異体に反映される様子を解析する。

図 1 に野生型 GroEL と同等の機能を持ち、トリプトファンプローブを導入した GroEL R231W のストップ・フロー解析の結果を示す。ATP と結合した後、GroEL には図中 A~D で示される反応速度が異なる合計 4 種の構造変化が発生する。さらに、GroES が反応中に存在するとこの GroES と GroEL の結合を反映する 5 つめの構造変化 (S) が観測される。本研究では GroELR231W において蛍光強度変化として検出されるこの 5 つの構造変化を基準に設定し、各々の機能変異が及ぼす影響を詳細に解析した。

(1) GroEL CP86 変異体の解析 :

図 2 に GroEL CP86 に Arg231->Trp 変異を導入した変異体 GroEL CP86-RW のストップ・フロー解析結果を示した。

GroEL CP86-RW は野生型とは異なり、ATP と結合後、サブユニット構造変化を反映するような蛍光強度変化がほとんど確認できなかった(図 2A, 青)。蛍光シグナル変化の強度も弱く、一般的に変化も単調で速度定数が小さかったことより、この変異体は円順列変異導入の結果、サブユニット構造変化がほぼ封じられたシャペロニンであると考えられた。

ところが、大変興味深いことに GroES 添加時の蛍光強度変化では GroES と GroEL の結合を反映する変化「S」を彷彿させる蛍光強度の増加が見られ(図 2B, 青)、電子顕微鏡観察などでも両者の会合が確認された。このことより、シャペロニンサイクルにおいて GroES と GroEL の結合は GroEL の大規模な構造変化を待たずに実現していることが確かめられた。

(2) GroEL D398A 変異体の解析 :

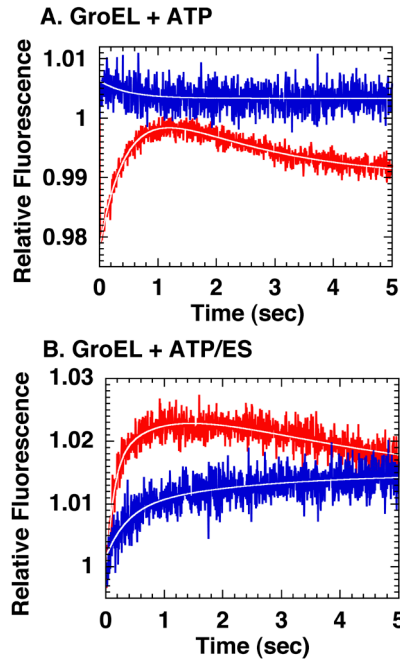


図 2. GroEL CP86-RW の蛍光ストップ・フロートレース(図中青)。GroEL R231W のトレース(同赤)との比較により、シグナル変化が大幅に抑制されていることが確認された。

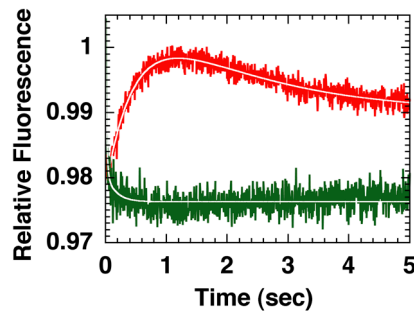


図 3. GroEL D398A-RW の蛍光ストップ・フロートレース(図中緑)。GroELR231W のトレース(同赤)との比較により、 $t=0.2$ 秒以降の蛍光シグナル変化(図 1, 「C」及び「D」)が選択的に消失したことが確認できた。

図 3 には ATP 加水分解活性に制限を持つ GroELD398A 変異体のストップ・フロー解析結果を示した。

GroELD398A 変異体においては蛍光シグナル変化のうち特定のシグナル変化(C,D に相等するシグナル)が選択的に消失した。ATP の加水分解反応が大幅に制限されたこの変異体において、特定の構造変化を反映する蛍光シグナルが抑制されている事実はこの両者に高い関連性があることを示唆していた。

(3) 各変異体の性質を統合したシャペロニン反応メカニズムの再検証 :

サブユニットの構造変化がほとんど制限された CP86 変異体(図 2), ATP 加水分解活性が抑制された D398A 変異体の構造変化(図 3), そして四次構造が野生型の 14 量体から

7 量体に変換されたため、反応サイクルが 1 度しか進行しない SR-1 変異体の解析を通して、本研究では図 4 に示すような新しい反応サイクルを提唱した。

GroE の反応サイクルはこれまで「変性蛋白質の結合」→「ATP の結合」→「GroEL の構造変化」→「GroES の結合と変性蛋白質の隔離」→「新たな変性蛋白質の結合、そして隔離された最初の蛋白質の解放」という明確な順序で進行すると提唱されていた。これに対し、図 4 で示す新しいサイクルでは「GroEL の構造変化」の完了を待たずに GroES の会合や変性蛋白質の隔離が「同時進行」で進むことを提唱している点、そしてある特定の GroEL 構造変化が反応サイクルの重要なイベント (GroES 結合、等) と強く関連づけられている点に新規性がある。

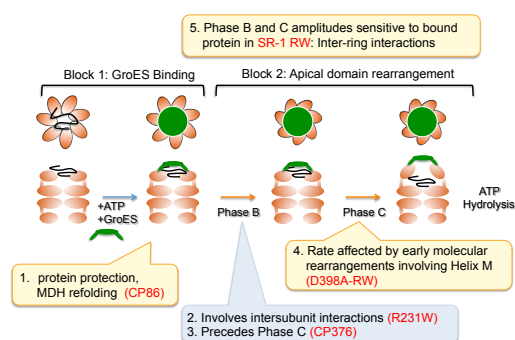


図 4. 本研究で提唱した新しい GroE の反応サイクル。

今回提唱している「同時進行」の反応機構では、GroEL に結合した変性蛋白質が GroEL から離れる前に GroES が結合するため、「変性蛋白質の隔離失敗」を防止する一定の効果を発揮することも、本研究の興味深い発見の一つである。

以上の成果は下記「5. 主な発表論文等」の雑誌論文 3. において成果として発表した。(4)様々な変異体の解析において消失する「D」構造転移の詳細と役割:

上記の解析を実施している中で、解析した 3 種類の変異体においてある共通の特徴、すなわち野生型類似体の GroEL R231W 変異体では観測されていた最も反応速度の遅い蛍光強度変化(「D」構造変化; 図 1) が大きく抑制されている点が特筆すべき結果として確認された。ATP 加水分解活性が制限されている D398A 変異体、そして GroEL の二重リング構造が赤道で分離したシングルリング変異体の SR-1 の両者でこの「D」構造転移が消失したことより、申請者はこの構造転移が GroES と ATP が結合した側の GroEL7 量体リング (通称 *cis* リング) の反対側のリング (通称 *trans* リング) において発生している構造転移ではないかと仮説を立て、その仮説の実証に載りだした。実験を重ねた結果、野生型類似体の GroEL R231W 変異体においても、ATP の結合後、加水分解を抑制する溶液条件

を選択することにより「D」構造転移を消失させることが可能であることを突き止め、さらに、この構造転移が *trans* リングにおいて実行されない場合、*trans* リングの変性蛋白質に対する親和性が変化することを確認した。5 つの構造転移の中で最も反応速度が遅く、それ故シャペロン反応サイクルの最終ステップに相当すると思われた「D」構造転移は、シャペロンが次の反応サイクルに移行するために変性蛋白質に対する親和性を調節する分子メカニズムに寄与していることが強く示唆された。

「D」構造転移を巡る詳細については現在投稿準備を進めている。

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 4 件)

1. Yamakawa, M. Y., Uchino, K., Watanabe, Y., Adachi, T., Nakanishi, M., Ichino, H., Hongo, K., Mizobata, T., Kobayashi, S., Nakashima, K., and Kawata Y. (2016). "Anthocyanin suppresses the toxicity of Ab deposits through diversion of molecular forms in *in vitro* and *in vivo* models of Alzheimer's disease." *Nutr. Neurosci.* **19**(1): 32-42. (査読あり)
2. Ida, M., Ando, M., Adachi, M., Tanaka, A., Machida, K., Hongo, K., Mizobata, T., Yamakawa, M. Y., Watanabe, Y., Nakashima, K., and Kawata Y. (2016). "Structural basis of Cu, Zn-superoxide dismutase amyloid fibril formation involves interaction of multiple peptide core regions." *J. Biochem.* **159**(2): 247-260. (査読あり)
3. Mizuta, T., Ando, K., Uemura, T., Kawata, Y., and Mizobata, T. (2013). "Probing the dynamic process of encapsulation in *Escherichia coli* GroEL." *PLoS One* **8**(10): e78135. (査読あり)
4. Iwasa, H., Kameda, H., Fukui, N., Yoshida, S., Hongo, K., Mizobata, T., Kobayashi, S., and Kawata, Y. (2013). "Bilberry anthocyanins neutralize the cytotoxicity of co-chaperonin GroES fibrillation intermediates." *Biochemistry* **52**(51): 9202-9211. (査読あり)

[学会発表] (計 29 件)

1. 安藤 瑞歩; 「アントシアニンによる家族性 ALS 原因タンパク質 SOD1 G93A のアミロイド線維形成抑制」, 第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会 合同大会, 2015 年 12 月 1 日~3 日, 神戸・神戸ポートアイランド
2. 下田 香; 「アントシアニンによる α クリスタリン蛋白質の凝集抑制」, 第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会 合同大会, 2015 年 12 月 1 日~3 日, 神戸・神戸ポートアイランド
3. 井田 昌孝; 「ALS 発症原因タンパク質

- SOD1 の構造安定性とアミロイド線維形成機構」, 第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会 合同大会, 2015 年 12 月 1 日~3 日, 神戸・神戸ポートアイランド
4. 福井 直也; 「強制テザリング法によるシャペロニン GroEL の機能解析」, 第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会 合同大会, 2015 年 12 月 1 日~3 日, 神戸・神戸ポートアイランド
 5. 藤井 豊; 「ATP の加水分解が引き起こす GroEL サブユニットの動的構造変化」, 第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会 合同大会, 2015 年 12 月 1 日~3 日, 神戸・神戸ポートアイランド
 6. Yoko Shima; "Stopped-Flow characterisation of a mutant chaperonin GroEL with a CXXC motif", 第 15 回日本蛋白質科学会年会, 2015 年 6 月 24~26 日, 徳島・あわぎんホール
 7. Seki Lee; "Inhibition mechanism of anthocyanin for Alpha-synuclein amyloid fibril formation", 第 15 回日本蛋白質科学会年会, 2015 年 6 月 24~26 日, 徳島・あわぎんホール
 8. Bimlesh Ojha; "Effect of GroEL Apical Domain on the Aggregation of α -Synuclein", 第 15 回日本蛋白質科学会年会, 2015 年 6 月 24~26 日, 徳島・あわぎんホール
 9. 栗本 成正; 「化学修飾による大腸菌 GroEL 円順列変異体 CP376 の機能改変」, 第 87 回日本生化学会大会, 2014 年 10 月 18 日, 京都・国立京都国際会館
 10. 安藤 瑞歩; 「家族性 ALS 原因タンパク質 SOD1 G93A 変異体のアミロイド線維形成機構の解明とポリフェノール VMA による線維形成抑制効果の検証」, 第 87 回日本生化学会大会, 2014 年 10 月 17 日, 京都・国立京都国際会館
 11. 川添 亜沙美; 「マウス由来プリオンタンパク質のアミロイド線維形成と細胞毒性」, 第 87 回日本生化学会大会, 2014 年 10 月 17 日, 京都・国立京都国際会館
 12. 齋木 美裕; 「 α シヌクレイン蛋白質のアミロイド線維核部位に存在する Phe94 とその周辺残基の線維形成における役割解明」, 第 87 回日本生化学会大会, 2014 年 10 月 17 日, 京都・国立京都国際会館
 13. Tomohiro Mizobata; "Curious Characteristics of a Mutant Chaperonin GroEL with Multiple Cysteines in the Central Cavity", The 28th Annual Symposium of The Protein Society, July 27~30, 2014, Manchester Grand Hyatt, San Diego CA, USA.
 14. Toshifumi Mizuta; "Study of *E. coli* GroEL Using Stopped-Flow Analysis and Circular Permutation", The 28th Annual Symposium of The Protein Society, July 27~30, 2014, Manchester Grand Hyatt, San Diego CA, USA.
 15. 安藤 瑞歩; 「家族性 ALS 発症原因タンパク質 SOD1 G93A 変異体の apo 化による立体構造とアミロイド線維形成の特性変化」, 第 14 回日本蛋白質科学会年会, 2014.6.25~6.27, 横浜・ワークピア横浜
 16. 下田 香; 「クリスタリン蛋白質の凝集抑制に関わる内在性, 外来性シャペロンの効果」, 第 14 回日本蛋白質科学会年会, 2014.6.25~6.27, 横浜・ワークピア横浜
 17. 藤井 豊; 「蛍光 Stopped-flow 測定による変異体 GroEL D398A-RW の動的解析」, 第 14 回日本蛋白質科学会年会, 2014.6.25~6.27, 横浜・ワークピア横浜
 18. 河田 康志; 「パーキンソン病原因蛋白質 α -synuclein のアミロイド線維に対するアントシアニンの効果」, 第 14 回日本蛋白質科学会年会, 2014.6.25~6.27, 横浜・ワークピア横浜
 19. 水田 敏史; 「変異解析・ストップフロー法を用いた大腸菌 GroEL の研究」, 第 14 回日本蛋白質科学会年会, 2014.6.25~6.27, 横浜・ワークピア横浜
 20. 安藤 瑞歩; 「家族性 ALS 発症原因タンパク質 SOD1 G93A 変異体の apo 化による立体構造とアミロイド線維形成の特性変化」, 第 55 回日本生化学会中国・四国支部例会, 2014.6.6~6.7, 愛媛・愛媛大学 南加記念ホール・校友会館
 21. 溝端 知宏; 「シャペロニン GroEL 頂上ドメインの反応サイクルにおける動きと役割」, 第 13 回日本蛋白質科学会年会, 2013.6.12~6.14, 鳥取・とりぎん文化会館
 22. 山下 智; 「クリスタリン蛋白質の凝集抑制効果に関する研究」, 第 13 回日本蛋白質科学会年会, 2013.6.12~6.14, 鳥取・とりぎん文化会館
 23. 福井 直也; 「シャペロニン GroEL の Hinge2 部位 Gly192 残基の変異体機能解析」, 第 13 回日本蛋白質科学会年会, 2013.6.12~6.14, 鳥取・とりぎん文化会館
 24. 亀田 啓; 「 α シヌクレインのアミロイド線維形成を抑制するキノコ由来ケミカルシャペロンの探索」, 第 13 回日本蛋白質科学会年会, 2013.6.12~6.14, 鳥取・とりぎん文化会館
 25. 川添 亜沙美; 「マウス由来プリオンタンパク質のアミロイド線維の細胞毒性評価」, 第 13 回日本蛋白質科学会年会, 2013.6.12~6.14, 鳥取・とりぎん文化会館
 26. 足立 誠幸; 「家族性 ALS 発症原因タンパク質 SOD1 G93A 変異体の構造特性とアミロイド線維形成機構」, 第 13 回日本蛋白質科学会年会, 2013.6.12~6.14, 鳥取・とりぎん文化会館
 27. 平川 和哉; 「パーキンソン病原因蛋白質 α -synuclein アミロイド線維のアントシアニンによる分解機構」, 第 13 回日本蛋白質科学会年会, 2013.6.12~6.14, 鳥取・とりぎん文化会館
 28. 内野 数之; 「アントシアニンによるアルツハイマー病原因タンパク質 A β のアミロイド線維形成抑制」, 第 13 回日本蛋白質科

学会年会， 2013.6.12~6.14， 鳥取・とりぎん文化会館

29. 齋木 美裕 ; 「 α シヌクレイン蛋白質の Phe94 の線維形成における役割」, 第 13 回日本蛋白質科学会年会, 2013.6.12~6.14, 鳥取・とりぎん文化会館

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