

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19770127
 研究課題名（和文） 光分解性クロスリンカーを用いたシャペロニン制限空間内でのフォールディングの解析

研究課題名（英文） Analysis on protein folding in restricted chaperonin cage by using photocleavable cross-linker

研究代表者

元島 史尋 (MOTOJIMA FUMIHIRO)
 東京工業大学・資源化学研究所・助教
 研究者番号：70372464

研究成果の概要：

本研究は当初予定していた光分解性クロスリンカーでは問題があり、代わりにジスルフィド結合を用いて還元剤にて分解を行った。この結果、GroELによるフォールディングは「空洞内に隔離された後もGroELに変性状態のまま結合しており、フォールディングがある程度進んだところで完全にGroELから解離して即座にフォールドする」という過程を経ていることがわかった。これは現在のモデルを大きく書き換える発見である。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	0	2,100,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	240,000	3,140,000

研究分野：生物科学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：フォールディング、分子シャペロン、GroEL、GroES、クロスリンカー

1. 研究開始当初の背景

細胞内では分子シャペロンと呼ばれる蛋白質が、熱などにより変性した蛋白質のフォールディングを援助することで細胞機能を維持している。分子シャペロンの一つであるシャペロニンGroELは変性蛋白質の露出した疎水性残基と疎水相互作用によって結合し、続いてATPとGroESが結合することで変性蛋白質を

GroEL/GroES複合体の空洞内に閉じこめ、フォールディングを促進する。これまでシャペロニンのATP加水分解サイクルについての多くの研究がなされてきた。しかし、最も解明すべき点である、シャペロニンが蛋白質のフォールディングを促進するメカニズムについてはいまだ十分に解明されていない状況である。

現在までに報告されたシャペロニンのフォー

ルディングへの効果についての知見を以下にまとめる。①空洞内への隔離によって凝集体の形成を阻害する効果はフォールディングを促進できない(Lin, Z. & Rye, H. S., *Mol. Cell*, 16 : 23-34, (2004))。②変性蛋白質は GroEL に結合するとよりアンフォールドした状態になる(Lin, Z. & Rye, H. S., *Mol. Cell*, 16 : 23-34, (2004))。③空洞表面に露出した残基の変異体はフォールディングに与える影響は限定的であり、空洞表面は親水性であれば機能的に十分であると考えられる(Wang J. D. et al. : *Cell*, 111, 1027-1039, (2002); Tang, Y-C. et al. : *Cell*, 125, 903-914, (2006))。④計算によるシミュレーション実験から、空洞と比べてある適当な大きさをもつタンパク質が安定化されることが予想されている。実際に GroEL の C 末端配列の増加によって空洞を小さくすると、一部のタンパク質のフォールディングが速くなることが示されている(Takagi, F. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100 : 11367-11372, (2003); Tang, Y-C. et al. : *Cell*, 125, 903-914, (2006))。これらの結果から、シャペロニンがフォールディングを促進する原因として、①GroEL への結合によるアンフォールドの作用、②空洞によって空間的制限を受ける作用が予想される。

近年、蛋白質に FRET を導入し、フォールディング過程を蛍光分子間距離の変化で観察する方法が注目されている。実際、藍藻由来 Rubisco に FRET を導入し、自発的とシャペロニン依存的フォールディングが比較された(Lin, Z. & Rye, H. S., *Mol. Cell*, 16 : 23-34, (2004))。Rubisco は自発的フォールディングではコンパクトな状態に陥ったままフォールディングが進まない速度論的トラップと呼ばれる状態に陥った。一方、シャペロニンによるフォールディングでは Rubisco が空洞内に閉じ込められると、自発的フォールディングと異なる FRET 変化を示した。しかし、シャペロニン依存的フォールディングに見られた FRET 変化は Rubisco が自発的にフォールドできる条件でも観察される可能性があり、FRET 変化のうちどれがシャペロニンによるものなのか判別できない問題が残されている。

そこで私は 自発的フォールディングが可能な蛋白質について観察することで上の問題点を解決でき、自発的とシャペロニン依存的フォールディングのフォールディング経路の違いについて詳細に議論できると考えた。蛋白質にはシャペロニン研究でよく用いられる GFP を用いた。GFP の構造変化を緑と赤の蛍光色素による FRET でモニターするため、GFP 固有のシステインを他の残基に置換し、GFP を BFP に変更した。

蛍光分子を導入する残基はネイティブ状態と変性状態で大きく距離が変わると予想され

る、ネイティブ状態で距離が近いがアミノ酸配列が離れている組み合わせを選択し、システインに置換した。2つのシステインに緑色と赤色蛍光分子を一つずつラベルさせる方法を開発し、標識サンプルを得た(BFPnearAT)。自発的、シャペロニン依存的フォールディングにおける BFPnearAT の蛍光分子間距離変化は次のようになる。BFPnearAT は自発的フォールディングではコンパクトな状態(A)からフォールディングが始まっていた。一方、シャペロニン依存的フォールディングでは、BFPnearAT は GroEL への結合によって大きくアンフォールドした状態になり(B)、GroES/ATP の結合直後も自発的よりもアンフォールドした状態(C)からフォールディングが始まっていた。さらにフォールディング速度は自発的の3倍程度に上昇した。したがってシャペロニンは GFP のフォールディング経路を大きく変化させており、この変化は GroEL への結合によるアンフォールディングが原因であることが示唆された。

2. 研究の目的

この研究では GroEL への結合によるアンフォールディングの重要性を指摘できたが、空洞内部への隔離がフォールディングに及ぼす作用については説明できない。制限空洞の作用を証明するためには、GroEL による変性作用を経ずに変性蛋白質を空洞内に閉じ込める必要がある。

3. 研究の方法

そこで私は、変性蛋白質のシステインを光分解性クロスリンカーで架橋することで変性状態を維持し、シャペロニン空洞内に閉じ込めた後に UV 照射によってフォールディングをスタートさせることで、GroEL による変性作用を排除し、空洞の影響だけを反映したフォールディングを観察できると考えた(図1)。これまで光分解性試薬によってフォールディングを開始させた例はチトクロム C において報告されている(Okuno, T. et al, *Biochemistry*, 39, 7538-7545 (2000))。しかしこの方法では GFP をグローバルにアンフォールドすることができないと予想される。2つのシステインに反応する光分解性クロスリンカーは Christopher A. Hunter 教授(英国)らが報告している(図2:Milanesi, L. et al., *Chem. Eur. J.*, 10, 1705-1710 (2004))。この実験計画を彼らに提案したところ、快諾して頂き共同研究を行うことになった。



図1. 光分解性クロスリンカーによる空洞内でのフォールディング開始

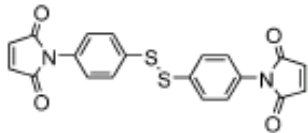


図2. 光分解性クロスリンカーの構造

4. 研究成果

本研究はGroELによる変性作用を排除し、空洞の影響だけを反映したフォールディングを観察することを目的とする。当初予定していた光分解性クロスリンカーによる研究は、タンパク質との標識によってクロスリンカーの性質が変化するため光による分解ができなかった。代わりにジスルフィド結合によってGroELと変性タンパク質を固定化し、これを還元剤DTTによって切断することでフォールディングをトリガーすることを試みた。

GroELと変性タンパク質クロスリンクした状態で空洞内に閉じ込めた後、一定時間後DTTを加えてフォールディングを開始した。クロスリンクした部位によってDTT投入前にフォールディングが開始できたもの、できなかったものがあった。フォールディングできないものはDTTを入れることでフォールディングが開始したが、これはDTTを投入する時間によらず一定だった。この結果はタンパク質のフォールディングに重要な残基がGroELに結合している場合、全体のフォールディングが始まらないことを示している。つまり空洞内でフォールディングの律速になっているのはフォールディングに重要な残基の空洞内への解離であると考えられる。

これらの実験と以前の結果を考え合わせると、GroELによるフォールディングはこれまで考えられてきた「空洞内への隔離の後フォールディングが開始する」のではなく、「空洞内に隔離された後もGroELに変性状態のまま結合しており、フォールディングがある程度進んだところで完全にGroELから解離して即座にフォールドする」という過程を経ていることがわかった。このとき、空洞内への隔離はフォールディングに必須であり、誤って空洞外に出たものは一から自発的フォールデ

ィングが始まることも確認した。以上のことから、GroELによるフォールディング促進作用の最も重要な因子はGroELが空洞内で変性タンパク質と結合することでアンフォールド状態を保つことであると推測された。これらの結果から、GroELへの結合に伴う変性作用はフォールディングの律速段階に関わることで、空洞はGroELから解離後のフォールディングに必須であることが初めて証明できた。空洞は必須であるがフォールディングにどのような効果を発揮しているかについては未だわかっておらず、今後も研究を進めていく必要がある。現在以上について論文を投稿するところである。

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 1件)

- ① Nojima, T., Murayama, S., Yoshida, M., Motojima, F., Determination of the number of active GroES subunits in the fused active GroES heptamer GroES required for interactions with GroEL, *J. Biol. Chem.*, **283**, 2008, 18385-18392 (査読あり)

[学会発表] (計 3件)

- ① Motojima, F., Yoshida, M.、変性タンパク質がGroELに結合した状態がシャペロン依存性フォールディングにおける律速中間体である、日本生化学会大会、2008. 12. 7、神戸ポートアイランド

- ② Motojima, F., Yoshida, M.、Blue fluorescent protein folds from unfolded state by chaperonin、米国コールドスプリングハーバー会議、2008. 4. 30、米国コールドスプリングハーバー

- ③ Motojima, F., Yoshida, M.、分子シャペロン GroEL/ES は BFP のフォールディング経路を速度論的にだけでなく構造的にも変化させる、日本生物物理学会、2007. 12. 22、パシフィコ横浜

〔その他〕

ホームページ

<http://www.res.titech.ac.jp/~seibutu/main.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

元島 史尋 (MOTOJIMA FUMIHIRO)

東京工業大学・資源化学研究所・助教

研究者番号：70372464

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし