

## 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 24 年 6 月 1 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21370067

研究課題名（和文）

グループ2型シャペロニンの構造変化プロセスとフォールディング機構の解明

研究課題名（英文）

Elucidation of mechanism for conformational change and protein folding of the group 2 chaperonin

研究代表者

養王田 正文 (YOHDA MASAFUMI)

東京農工大学・大学院工学研究院・教授

研究者番号：50250105

研究成果の概要（和文）：

我々は、グループ2型（II型）シャペロニンの反応機構の解明を目的に研究を行っている。本研究では、蛍光ストップフロー法、X線小角散乱ストップフロー法及びX線1分子追跡法を駆使して、Open型からClosed型への構造変化が2相の反応であり、2段階目のATPの加水分解に伴う構造変化がリングの“ねじれ”に対応していることを明らかにした。また、循環連結型変異体を用いることで、非対称型シャペロニン構築技術を開発し、リング間協調作用の解析を行った。

研究成果の概要（英文）：

To elucidate detailed conformational change and protein folding mechanism of the group 2 chaperonin (CPN), we have performed kinetic studies of conformational change by stopped-flow fluorometry, stopped-flow small angle X-ray scattering and Diffracted X-ray Tracking. The results have shown that the conformational change is biphasic and the latter includes the rotational motion of the ring. In addition, we constructed and characterize asymmetric ring complex that consists of a wild-type ring and a mutant ring by using circular permuted connected mutants. The results gave an insight on the inter ring communication of CPN.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,800,000	1,740,000	7,540,000
2010年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2011年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
年度			
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

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：シャペロン、シャペロニン、フォールディング、構造変化、古細菌、ストップフロー

## 1. 研究開始当初の背景

細胞内におけるタンパク質の構造形成と品質管理は、分子シャペロンと呼ばれる一群のタンパク質により制御されている。シャペロニンは、分子シャペロンの最も代表的なメンバーであり、2層のリング状構造を形成し、非天然構造のタンパク質をリング内の空洞に捕獲し、ATP 依存的にその正常なフォールディングを促進する。シャペロニンは、グループ1型 (I型) とグループ2型 (II型) に大別される。大腸菌の GroEL に代表されるグループ1型の分子機構については詳細なモデルが提唱されており、コシャペロンである GroES が重要な役割を担っていることが分っている。一方、真核生物の細胞質や古細菌に見出されるグループ2型シャペロニンには、GroES に相当する補因子が存在せず、グループ1型には存在しない Helical protrusion 領域が Built-in Lid として GroES と類似の機能を担っている。グループ2型シャペロニンは、リングが形成する空洞に変成タンパク質を取り込み、ATP の結合・加水分解により誘導される Built-in Lid の開閉に伴う構造変化により、そのフォールディングを促進する。このため、グループ2型シャペロニンの研究では、Open 型から Closed 型への構造変換プロセスの解明に主な焦点が当てられていた。最も大きな問題は、この構造変化におけるリング内及びリング間の協調作用機構である。グループ1型については、リング内及びリング間の協調作用機構が重要であることが明らかになっている。グループ2型でも同様な協調性が存在することが示唆されているが、明確な証拠はなかった。我々は、サブユニットを連結することで、リング内の特定の位置に変異体を含むシャペロ

ニンを構築する技術を確認し、種々の変異体を含むヘテロリング体を構築して、その構造変化能の解析を行った。その結果、ATP 結合・加水分解におけるリング内の協調性は小さく、リングに変異体が存在しても、構造変化能があることを示した。その一方で、Helical protrusion を欠失した変異体が1つでも含まれると機能が失われることが分かった。この結果から、グループ2型シャペロニンでは ATP の加水分解によるリング内の協調性は重要ではなく、Helical protrusion がリング内の協調作用に重要な役割を担っていることが明らかになった。リング間の協調作用については、我々のグループが非対称構造の存在を示す結果を得た他は、ほとんど研究が進んでいなかった。また、本研究を開始する直前に Open 型の X 線結晶構造が発表され、構造変化の過程でリングの回転速度の存在が示唆された。

## 2. 研究の目的

本研究では、グループ2型シャペロニンによるフォールディング機構の解明を目的に、Open 型から Closed 型への構造変化プロセスの解明し、フォールディングに関わる構造変化の正体を明らかにする。これまでの研究の結果から、構造変化は以下のようなプロセスで進行すると考えられる。

- 1) 各サブユニットに ATP が結合し、ATP 結合部位周囲の構造が変化する。
- 2) ATP 結合により引き起こされた構造変化がサブユニット内を伝搬し、各サブユニットの Helical Protrusion の構造が変化する。
- 3) 各サブユニットの Helical Protrusion 間の相互作用により、大きな構造変化が引き起こされる。この構造変化の結果、シャペロニン内の空洞の大きさが変わると同時に内部表面が疎水性から

親水性に変化し、捕らえた変性タンパク質のフォールディングを促進する。

4) この構造変化の結果、ATPの加水分解が進行し、蓋を開ける方向での構造変化が引き起こされる。

5) 以上のプロセスのいずれかの段階で、2つのリング間の協調作用があり、蓋の開閉いずれかにおいて重要な機能を担っている。

本研究では、以上のモデルを検証すると同時に、タンパク質フォールディングに関わる構造変化の正体を明らかにする。また、2つのリング間の協調作用がどの段階で機能するかを明らかにすることを目的とする。具体的には、以下の内容に絞って研究を行う。

- (1) 速度論的解析により、ATPの結合・加水分解により誘導される構造変化の素過程を明らかにする。
- (2) 構造変化を1分子レベルで観察し、X線結晶構造から提唱されている構造変化モデルを検証すると同時に、そのダイナミクスに関する情報を獲得する。
- (3) 野生型で形成されたリングと変異体で構成されたリングから構成される非対称リング体(CPN<sup>ASR</sup>)を構築し、リング間の協調作用機構を解明する。

### 3. 研究の方法

本研究では、これまで我々が研究を行い、X線結晶構造解析による高分解能の構造情報があり、高いタンパク質フォールディング能を有する *Thermococcus* strain KS1 由来シャペロニン (TKS1-CPN) を材料として研究を行った。

#### (1) 構造変化の速度論的解析

シャペロニンの構造変化プロセスを解明するために、TKS1-CPN の様々な残基を Trp に置換した変異体を作成し、ATPの結合、加水分解に伴う Trp の蛍光強度の変化を蛍光ストップ フロー法で解析することで、構造変

化プロセスの解明を行った。野生型の TKS1-CPN には Trp が含まれていないので、その位置に特有の構造変化を検出できる。Trp 置換する残基としては、これまでの知見から ATP の結合・加水分解及び構造変化に伴い周囲の環境が変化することが予想されている Helical Protrusion の先端に位置する L265、空洞内のループ領域の先端に位置する L56 及び ATP 結合ポケットに位置する K485 を対象とした。さらに、X線小角散乱ストップフロー法でも解析を行った (SPring 8、BL45XU)。

#### (2) 構造変化の1分子解析

X線1分子追跡法を用いて構造変化機構の解析を行った。X線1分子追跡法は、直径数十 nm 程度のナノ結晶をタンパク質分子に標識し、白色 X線を照射し、ナノ結晶の回折から得られるラウエ斑点を指標に、着目したタンパク質分子の動きを時分割的に追跡する技術である。TKS1-CPN の Helical Protrusion の先端のみに Cys を有する変異体 (D263C/C366S) を構築し、一方のリングの Cys を介して金でコートした基盤に固定化し、もう一方のリングの Cys を用いて金ナノ粒子を結合した。サンプルチャンバー内に ATP や Caged-ATP などを含むバッファーを封入し、ドライヤーで 70°C に加温して、実験を行った。Caged-ATP を用いた実験は、Nd-YAG laser ( $\lambda=355$  nm) で照射することにより反応を開始させた。実験は、高エネルギー加速器研究機構の PF-AR NW14 で行った。

#### (3) 非対称体の構築によるリング間協調作用の解明

CPN<sup>ASR</sup> を作製するためには、活性の異なるシャペロニンサブユニットを共発現した上で、各リング内においてサブユニットが混在しない工夫が必要である。このため、本研究では循環置換型連結 CPN (CPN<sup>CPC</sup>) を用いる方法を考案した。CPN<sup>CPC</sup> サブユニットは、2

個のサブユニットを連結し、その N 末端または C 末端を欠損させ逆の末端(C 末端または N 末端)に付加した変異体サブユニットである。CPN<sup>CPC</sup> サブユニットと野生型シャペロニン(CPN<sup>WT</sup>)サブユニットを共発現させると、立体障害によりそれぞれが独立にリングを形成するので、CPN<sup>CPC</sup> と CPN<sup>WT</sup> のそれぞれで形成されるリングからなる CPN<sup>ASR</sup> の形成が期待できる (図 1)。

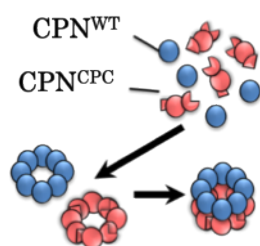


図 1 循環連結置換体を用いた非対称シャペロニンの構築

さらに、CPN<sup>ASR</sup> を、それぞれの対称なリング複合体から精製するために、CPN<sup>CPC</sup> の Helical protrusion に Strep-Tag を付加した CPN<sup>CPC</sup>- $\Delta$ ATPase-strep と、CPN<sup>WT</sup> の C 末端に His-Tag を付加した CPN-His サブユニットを用い、2 種類のアフィニティークロマトグラフィーにより精製をした。

#### 4. 研究成果

##### (1) 構造変化の速度論的解析

空洞内部のループ領域または Helical protrusion 先端に Trp を導入した変異体 L56W、L265W を作製し、構造変化に伴う Trp 周辺の疎水的環境への変化を蛍光強度変化で観測した。いずれの変異体も ATP 依存的に Closed 型に構造変化すると Trp の蛍光強度が増大した。各変異体における蛍光強度の ATP 濃度依存性を測定し、ATP 解離定数  $K_D$  を求めた。蛍光ストップフロー法を用いて、CPN の ATP 依存的な構造変化に伴う蛍光強度変化を経時的に測定した。両変異体とも、ほぼ同じような蛍光変化を示し、ATP との混合後 1 秒

程度で急激に蛍光強度が増大した (図 2)。

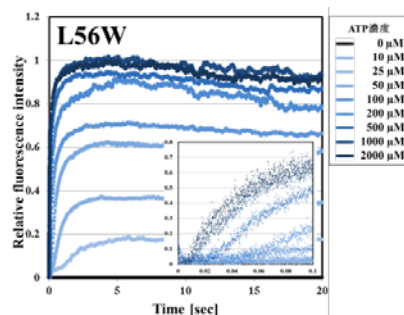


図 2 L56W の蛍光ストップフロー法による解析

ATP との混合による蛍光変化の初速度を解析した結果、1mM 以下の低濃度では ATP の結合が律速であり、CPN と ATP の結合は単純な 1 次反応であることが示され、ATP 結合速度定数  $k_{on}$  が測定できた。

また、高濃度では構造変化速度が律速となり、蛍光変化をフィッティングしたところ 2 相の反応であることが示された。また、Closed 型への変化を引き起こさない ADP を過剰に加え、ATP を Chase することで、Closed 型から Open 型への構造変化速度定数  $k_{open}$  を求めた。上述の蛍光強度増大の後、蛍光の減衰が見られ、15 秒程度で平衡に達した。この蛍光減衰は、CPN が高いフォールディング活性を示す  $K^+$  存在下でのみ確認されたことから、ATP の加水分解に伴う構造変化を反映していると考えられる。ストップフローを用いた X 線小角散乱法により、L265W の ATP 依存的構造変化における構造情報を経時的に測定した。散乱曲線の変化量解析により、 $K^+$  存在下で、上述の蛍光強度の増大及び減衰と類似したタイムコースで 2 段階の構造変化が確認された。

##### (2) 構造変化の 1 分子解析

一分子 X 線追跡法により、CPN の ATP 依存的構造変化を 1 分子解析することに成功した。様々な ATP 濃度条件および caged-ATP 存在下における光照射前後での測定を比較した結果、ATP の結合・加水分解による Open

型から Closed 型への構造転移の過程でシャペロニンリングが上方からみて時計回りに約 10 度程度ねじれることがわかった。この回転運動は ATP の加水分解に依存することから、タンパク質フォールディングに関連するものであることが分かった。また、ATP 結合後から回転運動がスタートするまでに 2 秒程度のラグタイムがあった。この結果から、ATP リング内の各サブユニットで独立した構造変化があり、その後、リング全体で同期したねじれ運動を伴って閉状態へ移行することがわかった。この 2 段階の構造変化はストップフローによる解析結果とも一致していた。

(3) 非対称体の構築によるリング間協調作用の解明

2 つのサブユニットを連結し、N 末端から 95 アミノ酸残基を欠損させ C 末端に付加した CPN<sup>CPC</sup> サブユニットを作製した。また、この複合体が CPN<sup>WT</sup> のような 16 量体のリング構造を形成していることをゲル濾過 HPLC および電子顕微鏡観察により確認した。このことから CPN<sup>CPC</sup> は CPN<sup>ASR</sup> 構築に利用可能と判断した (図 3)。CPN<sup>CPC</sup> の Helical protrusion に Strep-Tag を付加した CPN<sup>CPC</sup>-ΔATPase-strep と CPN<sup>WT</sup> サブユニットの C 末端に His-Tag を付加した CPN-His サブユニットを共発現し、2 種類のアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。その結果、CPN<sup>ASR</sup> の構築および精製に成功し、ゲル濾過 HPLC および電子顕微鏡観察により CPN<sup>ASR</sup> も CPN<sup>WT</sup> と同様なリング複合体を構築していることが確認できた (図 3)。

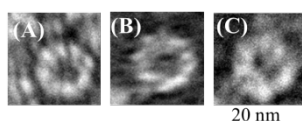


図 3 透過型電子顕微鏡による構造確認 (A)CPN<sup>WT</sup> (B)CPN<sup>CPC</sup> (C)CPN<sup>ASR</sup>

構築した CPN<sup>ASR</sup> の機能解析を行うことで、リング間での協調作用の解析を試みた。CPN<sup>ASR</sup> は、構成する CPN-His オリゴマーと比較して約 50% の ATP 加水分解活性を有していた。また、GFP を基質としたリフォールディング活性を測定した結果、CPN<sup>ASR</sup> はリフォールディング活性をほとんど失っていた。このことより、ATP 加水分解は各リングで独立して起こるが、構造変化にはリング間での協調作用が重要であることが示唆された (図 4)。

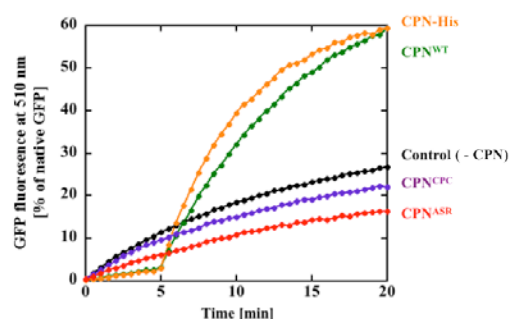


図 4 GFP フォールディング活性

本研究の結果、グループ 2 型 CPN では、ATP 加水分解は各リングで独立して起こるが、構造変化に関してはリング間での協調作用が重要であることが示唆された。今後も CPN<sup>ASR</sup> の機能解析を行うことで、グループ 2 型 CPN の構造変化等においてリング間協調作用がどのように重要であるのか、より詳細な解析が期待される。

#### 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 27 件)

1. Hanazono, Y., Takeda, K., Yohda, M., Miki, K.: Structural studies on the oligomeric transition of a small heat shock protein, StHsp14.0. *J. Mol. Biol.* in press. (査読有)
2. Takeda, K., Hayashi, T., Abe, T., Hirano, Y., Hanazono, Y., Yohda, M.,

- Miki, K.: Dimer structure and conformational variability in the N-terminal region of an archaeal small heat shock protein, StHsp14.0. *J. Struct. Biol.* 174, 92-99 (2011) (査読有)
3. Abe, T., Oka, T., Nakagome, A., Tsukada, Y., Yasunaga, T., Yohda, M.: StHsp14.0, a small heat shock protein of *Sulfolobus tokodaii* strain 7, protects denatured proteins from aggregation in the partially dissociated conformation. *J. Biochem.* 150, 403-409 (2011) (査読有)
  4. Sahlan, M., Zako, T., Tai, P. T., Ohtaki, A., Noguchi, K., Maeda, M., Miyatake, H., Dohmae, N., Yohda, M.: Thermodynamic Characterization of the Interaction between Prefoldin and Group II Chaperonin. *J. Mol. Biol.* 399, 628-636 (2010) (査読有)
  5. Sahlan, M., Kanzaki, T., Zako, T., Maeda, M., Yohda, M.: Analysis of the interaction mode between hyperthermophilic archaeal group II chaperonin and prefoldin using a platform of chaperonin oligomers of various subunit arrangements. *Biochim. Biophys. Acta* 1804, 1810-1816 (2010) (査読有)
  6. 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)
  7. Sugino, C., Hirose, M., Tohda, H., Yoshinari, Y., Abe, T., Giga-Hama, Y., Iizuka, R., Shimizu, M., Kidokoro, S., Ishii, N., Yohda, M.: Characterization of a sHsp of *Schizosaccharomyces pombe*, SpHsp 15.8, and the implication of its functional mechanism by comparison with another sHsp, SpHsp16.0. *Proteins* 74, 6-17 (2009) (査読有)

[学会発表] (計 58 件)

1. M. Yohda, A. Nakagawa, K. Moriya, T. Oka, H. Sekiguchi, Y. C. Sasaki, K. Makabe, K. Kuwajima, "ATP dependent conformational change and protein folding mechanism of group II chaperonin", The 11th KIAS Conference on Protein Structure and Function, KIAS (KOREA INSTITUTE FOR ADVANCED STUDY) Seoul, South Korea, October 8th,

2011

2. M. Yohda, A. Nakagawa, H. Sekiguchi, K. Moriya, T. Oka, K. Makabe, K. Kuwajima, Y. C. Sasaki, "Conformational change and protein folding mechanism of group II chaperonin proposed from stopped-flow experiments and diffracted X-ray tracking", The 3rd Pacific Protein Association Conference in conjunction with the 3rd Symposium of the Chinese Protein Society, Shanghai University, May 6th, 2011
3. M. Yohda, A. Nakagawa, T. Kanzaki, H. Sekiguchi, Y. C. Sasaki, "Structure, function and application of hyperthermophilic molecular chaperonins", 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem 2010), Hawaii Convention Center, Honolulu, USA, December 19th, 2010
4. M. Yohda, "Mechanism of protein folding by prefoldin and group II chaperonin system", 11th China-Japan-Korea Joint Symposium on Enzyme Engineering, Chengdu, China, November 5th, 2010
5. M. Yohda, T. Kanzaki, R. Masuda, A. Namagawa, K. Igarashi, "Conformational change mechanism of group II chaperonin", 21th IUBMB & 12th FAOBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, Shanghai International Conventional Center, China, August 4th, 2009
6. M. Yohda, T. Kanzaki, R. Masuda, S. Muhamad, T. Oka, "Mechanism in Conformational Change of Group II Chaperonin EXPERIMENTAL BIOLOGY 2009 (ASBMB)," Ernest N. Morial Convention Center, New Orleans, USA, April 21th, 2009

[その他]

ホームページ等

<http://www.tuat.ac.jp/~yohda/index.html>

6. 研究組織
  - (1) 研究代表者  
養王田 正文 (YOHDA MASAFUMI)  
東京農工大学・大学院工学研究院・教授  
研究者番号: 50250105
  - (2) 研究分担者  
なし
  - (3) 連携研究者  
なし