

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：32714

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440055

研究課題名(和文)細胞内環境に応答したハイブリッドなシャペロニン反応機構の提案

研究課題名(英文) Proposal of hybrid-type chaperonin reaction mechanism in response to the intracellular environment

研究代表者

小池 あゆみ (KOIKE, AYUMI)

神奈川工科大学・応用バイオ科学部・教授

研究者番号：20454176

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：シャペロニンGroELは、細胞内の環境に応じて、2つのリングが同時に活性化状態にあるフットボール型反応中間体を経由する機構と、交互に活性化状態になる弾丸型反応中間体を経由する機構を使い分けている可能性がある。フットボール型複合体の結晶構造解析により、弾丸型複合体と全体構造は変わらないが、リング間で $\sim 7^\circ$ の回転が検出された。このため、細胞内で形成されたフットボール型複合体はPAGEでシングルリングに解離しやすいことも明らかとなった。また、蛍光ラベルした2色のGroESを細胞内で同時観察できたため、蛍光相互相関分光法(FCCS)による解析が可能となった。

研究成果の概要(英文)：GroEL is able to use both the “bullet cycle” and the “football cycle”, the selection will depend on the situation in the cell. We determined the crystal structure of the “football” GroEL:GroES2 complex. The overall structure of the “football” complex resembled the GroES-bound GroEL-ring of the asymmetric 1:1 GroEL:GroES complex (the “bullet” complex). However, the two GroES-bound GroEL-rings form a modified interface by a rotation about the 7-fold axis. As a result, the inter-ring contacts between the two GroEL rings in the football complex differed from those in the bullet complex. The altered inter-GroEL ring contacts in the football structure lead GroEL tetradecamer to dissociated in the presence of ATP and GroES in a native gel. Furthermore, we constructed coexpression system of distinct fluorescence molecules-labeled GroES in *E. coli* for the purpose of detection of the football-like reaction intermediates by FCCS.

研究分野：生化学

キーワード：タンパク質フォールディング シャペロニン

1. 研究開始当初の背景

GroELは57kDのサブユニット7つからなるリングが2つ重なった14量体構造をしており、リング内部にはそれぞれ直径約45Åの空洞がある。これまでの研究から、GroELの反応サイクルは2つのリングが交互に機能しながらはたらくと考えられてきた。「先にポリペプチド/ATP/GroESが結合したシスリングのATP加水分解が終わるまでは(約8秒)、トランスリングにはATPもポリペプチドもコシャペロニンGroESも結合できない」という、リング間の負の協同性があるために、1つのGroELには1つのGroESしか結合できず、“弾丸型複合体”を経由する反応モデルが通説として定着したといえる。ところが、従来のGroEL作用機構モデルにはない、GroELの両側のリングにGroESが結合した“フットボール型複合体”の形成が報告され、これまでの反応モデルの改訂が必要となった。我々は、フットボール型複合体を経由する新しい反応モデルを提案し、このモデルが細胞内におけるGroELの作用機構を表しているか検証するため、*in vivo*光クロスリンク技術により細胞内で形成されたフットボール型複合体の検出を試み、成功している。フットボール型複合体は、7量体リング2つに分かれてシングルリングを形成する傾向にあり、この状態ではATP加水分解終了後もポリペプチドは放出されない。「通常は、弾丸型複合体ではたらくが、細胞内の変性タンパク質が多い場合は、GroELの2つのリングが活性化し、必要に応じてシングルリング内にポリペプチドをしばらく隔離して凝集を防ぐ」という、細胞内の変性タンパク質量に応じたハイブリッドなシャペロニン作用仮説を立て、検討している。

2. 研究の目的

ストレス条件下での細胞内GroEL/GroES複合体生成比を2つの方法で解析し、細胞内変性タンパク質量とシャペロニン反応過程の関係を検証することを目的とした。

(1) *in vivo*光クロスリンク技術により光架橋したフットボール型、弾丸型、シングルリング複合体の生成比を検証する。

(2) 蛍光相互相関分光法(FCCS)により、細胞内フットボール型、弾丸型、シングルリング複合体の生成比を検証する。

3. 研究の方法

(1) *in vivo*光クロスリンク技術とは、生きた細胞内ではたらくしている状態のタンパク質間の相互作用を解析する方法で、光反応性のアミノ酸アナログであるパラベンゾイルフェニルアラニン(pBpa)を目的タンパク質の特定の部位に取り込ませ、紫外線照射によって導入したpBPAと近接する別のタンパク質との間に架橋を形成させる。光架橋により寿命の短い反応中間体の単離・同定が可能となるため、GroESの

GroEL結合部位へpBpaを導入し、大腸菌細胞内で形成されたGroEL/GroES複合体の解析を行うことが可能となった。温度ストレスにより変性タンパク質が増加した環境下の大腸菌細胞内において、GroEL/GroES複合体の解析を行う。

(2) 蛍光相互相関分光法(FCCS)は、生細胞における分子間相互作用検出を可能にする測定方法である。2種類の蛍光色素をそれぞれ別々の分子に結合させ、それら蛍光色素のゆらぎの同時測定から、2種類の分子の“時間的・空間的同時性(分子間相互作用)”を求めることが可能となる。そこで、2種の蛍光タンパク質をそれぞれ別々に融合したGroESを大腸菌内で発現させ、それらが時間的・空間的に同時にGroELに結合するかどうかを検証する。

4. 研究成果

(1) GroELのATP加水分解活性に重要な働きをするAsp398とAsp52をAlaに置換したGroEL(D52A/D398A)変異体は、1つのGroELの両側のリングにGroESがそれぞれ結合したフットボール型複合体(GroEL₁₄/2GroES)を安定に保持し、複合体の半減期は6日であった。フットボール型複合体の性質を解析するため、精製GroEL(D52A/D398A)変異体を用いてフットボール型複合体を形成させ、Blue-Native PAGE(BN-PAGE)による解析を行ったところ、フットボール型複合体は、少なくともPAGEでは、2つのリング構造のリングーリング間で解離したシングルリング複合体(GroEL₇/1GroES)になることが明らかとなった(図1A)。また、野生型GroELをATPBeFxを使って複合体解析した場合も、同様の結果が得られた(図1B)。

GroEL(D52A/D398A)のフットボール型複合体のX線結晶構造解析の結果、全体の構造は弾丸型複合体(GroEL₁₄/1GroES)とよく似ているが、リングーリング界面では弾丸型複合体と比べて~7°の回転が観察され、このことがシングルリングへの解離と関係していると推察された(図2)。

これらのことから、細胞内で形成されたフットボール型複合体もPAGEによる解析でシングルリングとして検出される可能性が高いと考えられた。GroEL(D52A/D398A)を発現させた大腸菌ライセートを電気泳動し、ウェスタンブロットで細胞内で形成されたと考えられるGroEL/GroES複合体生成比を解析したところ、フットボール型複合体はわずかに検出されただけで、大部分は弾丸型複合体とシングルリング複合体として検出された。37°Cと42°Cで培養した大腸菌ライセートを比較したところ、42°CではGroEL単独が減少し、弾丸型複合体とシングルリング複合体が増加する傾向にあった。*in vivo*光クロスリンクを施したライセートによる分析では、明確な複合体のバンド検出には至っておらず、条件を検討している。

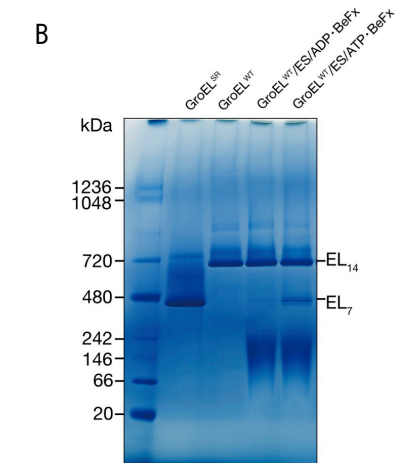
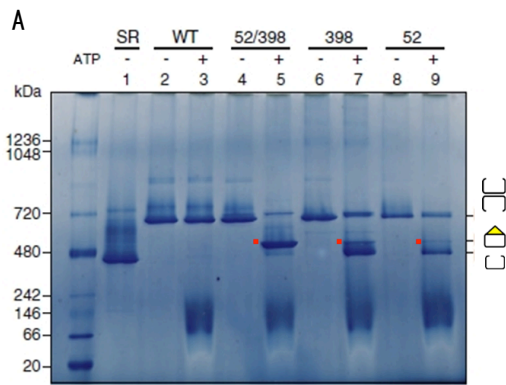


図1 BN-PAGEによるGroEL複合体解析

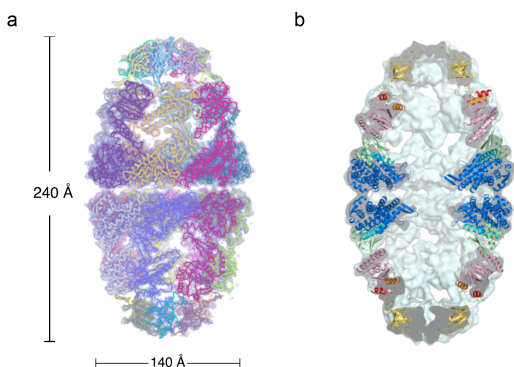


図2 フットボール型複合体の構造

(2) GroESはホモ7量体タンパク質であり、GroES-GFPと別の蛍光GroESを同時に細胞内で発現させると、2色のサブユニットが混在したGroES分子が構成され、これがフットボール型複合体と区別できない。そこで、7量体GroESを1つの遺伝子で発現させたtandem-GroESを使って、GroES7-GFPを発現させることに成功した。同様に、7量体GroES(ES7)にSNAPまたはHaloタグを融合してそれらを同時発現させ、2色の蛍光リガンドでそれぞれ標識できるように、pMW118にES7SNAP-ES7Halo遺伝子を挿入した。さらに、FCCS観察のために、Single copy plasmid pZC320にES7SNAP-ES7Halo遺伝子を挿入した。形質転換した大腸菌は、細胞外から蛍光リガンドを取り込み、505-StarおよびTMR蛍光を示すことも蛍光顕微鏡観察により確認でき

た(図3)。

一方、GroELのN、C末端はともにリング内部に位置しており、オリゴマー構造の形成に影響を与えずにGFP融合GroELを作製することはこれまで困難であった。そこで、頂点ドメインにGFPを融合したGroEL(GFP-GroEL)を構築し、精製タンパク質を用いてシャペロン活性を評価した。GFP-GroELは、HPLCゲルろ過クロマトグラフィーで14量体に相当する位置に溶出し、透過型電子顕微鏡観察では、野生型GroELとよく似たリング構造が観察された。また、GFP-GroELは野生型GroELと同等以上のATP加水分解活性、RhodaneseおよびMDHのフォールディング活性を示し、GroEL欠損大腸菌(MGM100株)を相補できたことから、細胞内でもシャペロン機能を保持すると予想された。蛍光相関分光法(FCS)でGFP-GroELはCy3標識GroELと同程度の拡散時間を示したことから、細胞内のGroELの分子機構解明のためのツールになると期待できる。蛍光相互相関分光法(FCCS)を用いて、*in vitro*および*in vivo*で1つのGroELに2つのGroESが結合したフットボール型反応中間体の検出を引き続き行っていく。

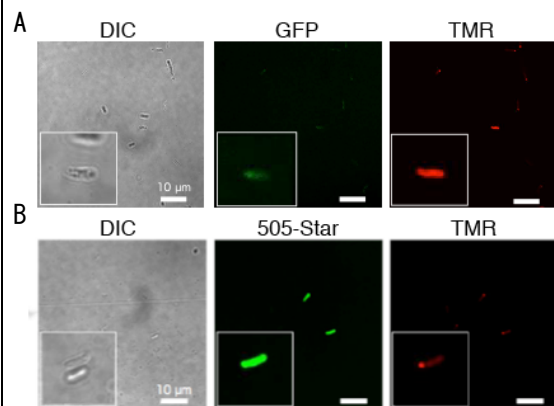


図3 大腸菌内の2色の蛍光GroES観察

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Koike-Takeshita A, Mitsuoka K, Taguchi H, Asp52 in combination with Asp398 plays a critical role in ATP hydrolysis of chaperonin GroEL, J. Biol. Chem., 査読有, 289(43), 2014, 30005-30011
DOI: 10.1074/jbc.M114.593822
- ② Koike-Takeshita A, Arakawa T, Taguchi H, Shimamura T, Crystal structure of a symmetric football-shaped GroEL-GroES2 complex determined at 3.8 Å reveals rearrangement between two GroEL rings, J. Mol. Biol., 査読有, 426(21), 2014, 3634-3641

- ③ Hideshima S, Wustoni, S, Kuroiwa S, Nakanishi, T, Koike-Takeshita A, Osaka T., Monitoring Amyloid Sup35NM Growth with Label-Free Electrical Detection Using a Field-Effect Transistor Biosensor, ChemElectroChem, 査読有, 1(1), 2014, 51-54
DOI: 10.1002/celec.201300151

- ④ 依田ひろみ, 小池あゆみ, シャペロニン GroEL への金属ナノ粒子の高効率内包 -- 分析電子顕微鏡システム利用研究成果、その XXIV (2) --, 神奈川工科大学研究報告 B 理工学編, 査読有, 38, 2014, 49-53

[学会発表] (計 18 件)

- ① Ayumi Koike-Takeshita, Takatoshi Arakawa, Hideki Taguchi, Tatsuro Shimamura, Crystal structure of a symmetric foot-ball-shaped GroEL: GroES2-ATP14 complex reveals rearrangement between two GroEL rings, Pacificchem 2015, 2015 年 12 月 18 日, Hawaii Convention Center (Honolulu, Hawaii, USA)
- ② H. Yoda, O. Yamamoto, A. Koike - Takeshita, Construction of GroEL-GFP protein which holds the chaperonin function: A tool to study elucidation of GroEL molecular mechanism in vivo, Pacificchem 2015, 2015 年 12 月 17 日, Hawaii Convention Center (Honolulu, Hawaii, USA)
- ③ Hiromi Yoda, Osamu Yamamoto, Ayumi Koike-Takeshita, Approach for an alignment of chaperonin GroEL complexes encapsulating metal nanoparticles, Pacificchem 2015, 2015 年 12 月 17 日, Hawaii Convention Center (Honolulu, Hawaii, USA)
- ④ 西村 友汰、星 健介、丹羽 達也、田口 英樹、小池 あゆみ, 蛍光相関分光法を用いた大腸菌生細胞内でのシャペロニン動態解析, BMB2015, 2015 年 12 月 4 日, ポートアイランド (兵庫県神戸市)
- ⑤ Ayumi Koike-Takeshita, Takatoshi Arakawa, Hideki Taguchi, Tatsuro Shimamura, Crystal structure of a symmetric foot-ball-shaped GroEL: GroES2-ATP14 complex reveals rearrangement between two GroEL rings, PIM International Symposium 2015, 2015 年 9 月 25 日, COMS (Ehime, Japan)
- ⑥ Yuta Nishimura, Hideki Taguchi, Ayumi Koike-Takeshita, Construction of GFP fusion GroEL which holds the

chaperonin function: a tool to study elucidation of GroEL molecular mechanism in vivo, PIM International Symposium 2015, 2015 年 9 月 25 日, COMS (Ehime, Japan)

- ⑦ 小池 あゆみ、荒川 孝俊、田口 英樹、島村 達郎, フットボール型複合体 GroEL: GroES2-ATP14 の結晶構造解析, 第 15 回日本蛋白質科学会年会, 2015 年 6 月 26 日, あわぎんホール (徳島県徳島市)
- ⑧ 依田ひろみ、高村岳樹、小池あゆみ, ドラッグデリバリーのための細胞核移行能を有するシャペロニン GroEL/ES 複合体の調製, 第 15 回日本蛋白質科学会年会, 2015 年 6 月 25 日, あわぎんホール (徳島県徳島市)
- ⑨ 星野文彦、西田愛、依田ひろみ、小池 (竹下) あゆみ, シャペロニン GroEL 内に形成された金属ナノ粒子の規則配列, 第 37 回日本分子生物学会年会, 2014 年 11 月 26 日, パシフィコ横浜 (神奈川県)
- ⑩ 西村友汰、土生勇樹、丹羽達也、田口英樹、小池あゆみ, 細胞内 GroEL の分子機構解明のためのシャペロニン機能を保持した GFP 融合 GroEL の構築, 第 37 回日本分子生物学会年会, 2014 年 11 月 25 日, パシフィコ横浜 (神奈川県)
- ⑪ Yuta Nishimura, Hideki Taguchi, Ayumi Koike-Takeshita, Approach for an alignment of chaperonin GroEL complexes encapsulating metal nano particles, EMNT2014, 2014 年 11 月 6 日, 沖縄コンベンションセンター (宜野湾市)
- ⑫ 西村友汰、土生勇樹、佐伯亨、田村祥平、田口英樹、小池あゆみ, 細胞内 GroEL 観察のためのシャペロニン活性を保持した GFP 融合 GroEL の構築, 第 14 回日本蛋白質科学会年会, 2014 年 6 月 26 日, ワークピア横浜 (横浜市)
- ⑬ 中澤 耕己、丹羽 達也、伊藤 耕一、多田 隈 尚史、小池 あゆみ, 田口 英樹, 新生タンパク質-シャペロン間相互作用を大腸菌内で観察する試み, 第 13 回日本蛋白質科学会年会, 2013 年 6 月 12 日, とりぎん文化会館 (鳥取県鳥取市)
- ⑭ 小池 あゆみ, 佐伯 亨, ニノ井 友里, 田村 祥平, 田口 英樹, シャペロニン GroEL/GroES の細胞内動態観察, 第 13 回日本蛋白質科学会年会, 2013 年 6 月 14 日, とりぎん文化会館 (鳥取県鳥取市)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 3 件)

- ① 名称: 変異型シャペロニン複合体を利用した細胞内への局所的薬物送達システム用ナノカプセル
発明者: 小池あゆみ、高村岳樹、依田ひろみ
権利者: 学校法人幾徳学園 神奈川工科大学

種類：特許
番号：PCT/JP2016/063939
出願年月日：平成 28 年 5 月 11 日
国内外の別： 国外

② 名称：変異型シャペロニン複合体及び薬物送達システム用ナノカプセル
発明者：小池あゆみ、高村岳樹、依田ひろみ
権利者：学校法人幾徳学園 神奈川工科大学
種類：特許
番号：特願 2015-100586
出願年月日：平成 27 年 5 月 16 日
国内外の別： 国内

③ 名称：ナノ粒子-GroEL 蛋白質複合体及びその製造方法
発明者：星野文彦、今枝孝夫、西田愛、小池あゆみ
権利者：株式会社豊田中央研究所、トヨタ自動車株式会社、学校法人幾徳学園
種類：特許
番号：特願 2014-082093
出願年月日：平成 26 年 4 月 11 日
国内外の別： 国内

○取得状況（計 1 件）

名称：シャペロニン変異体およびこれをコードする DNA
発明者：小池あゆみ、田口英樹
権利者：学校法人幾徳学園神奈川工科大学
種類：特許
番号：特許第 5540367 号
取得年月日：平成 26 年 5 月 16 日
国内外の別： 国内

〔その他〕
ホームページ等
http://www.kait.jp/ug_gr/undergrad/bio/bioscience/academic/koike.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小池 あゆみ (KOIKE, Ayumi)
神奈川工科大学・応用バイオ科学部・教授
研究者番号：20454176