

## 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 6月12日現在

機関番号：82648

研究種目：新学術領域研究

研究期間：2008～2012

課題番号：20107009

研究課題名（和文） シャペロニンの構造揺らぎとフォールディング介助機能

研究課題名（英文） Structural fluctuations and functional expression of the chaperonin complexes

研究代表者

桑島 邦博 (KUWAJIMA KUNIHIRO)

大学共同利用機関法人自然科学研究機構（岡崎共通研究施設）岡崎統合バイオサイエンスセンター・教授

研究者番号：70091444

研究成果の概要（和文）：分子シャペロンは細胞内の蛋白質フォールディングに関わり、分子レベルの生命現象である蛋白質フォールディングと細胞レベルの生命現象とを結びつける重要な概念である。本研究では、分子シャペロンの構造揺らぎと機能発現との関係を物理化学的に明らかにする。ジメチルスルフォキシド停止水素重水素交換法と二次元 NMR を利用して、さまざまなシャペロニン複合体中の GroES の水素重水素交換反応を追跡し、生物機能が構造揺らぎをどのように利用しているかについて研究した。

研究成果の概要（英文）：The molecular chaperone is an important concept that connects a molecular-level biological process, protein folding, to cellular-level biological processes. In this project, we studied physicochemical relationships between structural fluctuations and functional expression of the chaperonin complexes. To elucidate how the biological functions utilize the structural fluctuations of the complexes, we investigated hydrogen/deuterium (H/D)-exchange reactions of the GroES portion of various chaperonin complexes by dimethylsulfoxide-quenched H/D-exchange two-dimensional NMR spectroscopy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	17,000,000	5,100,000	22,100,000
2009年度	14,000,000	4,200,000	18,200,000
2010年度	13,100,000	3,930,000	17,030,000
2011年度	12,300,000	3,690,000	15,990,000
2012年度	12,300,000	3,690,000	15,990,000
総計	68,700,000	20,610,000	89,310,000

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：蛋白質、フォールディング、分子シャペロン、シャペロニン、構造揺らぎ、水素交換法、二次元 NMR

## 1. 研究開始当初の背景

(1) シャペロニン GroEL/GroES 複合体の機能発現にはその構造揺らぎが重要であるが、そのような構造揺らぎを、水素重水素 (H/D) 交換二次元 (2D) NMR 法で定量的に解析した

例は、ほとんどない。

(2) 上の(1)の問題点は、シャペロニン複合体のような超分子複合体に対して、通常の 2D NMR による高分解能の解析がほとんど不可能であることによる。したがって、これを克服

するには、横緩和最適化 NMR 法 (TROSY) による H/D 交換反応の直接測定やジメチルスルホキシド (DMSO) 停止 H/D 交換 2D NMR 法などが有効である。しかし、現在の DMSO 停止 H/D 交換 2D NMR 法では、凍結乾燥を溶媒交換に使用しているため、高濃度の塩存在下では適用できないという難点があった。

## 2. 研究の目的

(1) 緩衝塩や MgATP 存在下でも適用可能な、新規な DMSO 停止 H/D 交換 2D NMR 法を開発する。

(2) TROSY 法による H/D 交換の直接測定、および、上記(1)で開発された新規な DMSO 停止 H/D 交換 2D NMR 法を用いて、天然条件下における、遊離 GroES 7 量体の水素交換反応を解析する。

(3) GroEL/GroES 複合体の GroES 部分の水素交換反応を同様に解析し、上記(2)の結果と比較することによって、GroES 部分の構造揺らぎが、シャペロン複合体の機能発現にどのように関わっているかを明らかにする。

## 3. 研究の方法

TROSY 法による GroES 複合体の H/D 交換反応の直接測定、新規に開発された DMSO 停止 H/D 交換 2D NMR 法を用いる。このため、DMSO 溶液中の GroES のペプチド・アミドプロトンの 2D NMR スペクトル中のシグナルの帰属を行う。NMR 測定には、分子科学研究所に設置されている、超高磁場 NMR 装置 ( $^1\text{H}$  920 MHz) を使用した。

## 4. 研究成果

(1) DMSO 停止 H/D 交換法をシャペロンの系に有効に適用するため、スピン脱塩カラムを用いた DMSO 停止 H/D 交換法を開発した。

(2) 遊離  $^{15}\text{N}$  標識 GroES 7 量体の H/D 交換反応を DMSO 停止 H/D 交換 二次元 NMR 法と 920 MHz NMR 装置を用いて追跡した (20 mM KCl, 25 mM リン酸緩衝液, pH 6.5, 25°C)。また、遅く交換するアミド水素は TROSY HSQC スペクトルを用いて直接水素交換反応を追跡した。

(3) その結果、GroES の 94 個のペプチド・アミド水素中 33 個の交換反応を定量的に求め、それらの水素交換保護因子 ( $P_f$ ) を決定した。残りの 61 残基については、水素交換反応速度定数の下限が求められた。

(4) 最も強く保護されているアミド水素の  $P_f$  は  $10^6$ - $10^7$  のオーダーであり、通常の球状蛋白質の  $P_f$  と同程度であったが、 $P_f$   $10^6$  以上の非常に強く保護されたアミド水素の数はわずか 10 個で、通常の小さな球状蛋白質について知られている数よりも著しく少なかった。このことは、7 量体 GroES 中のかなりの部分がフレキシブルで天然変性状態にあることを示している。

(5)  $P_f$   $10^5$  以上の強く保護されたアミノ酸残基は疎水性コアを形成する三本の  $\beta$  ストランドに集中しており、残基 17-34 の可動性ループ領域はあまり保護されていなかった。

(6) ADP 存在下で GroEL の単一リング変異体 SRI と結合した  $^{15}\text{N}$  標識 GroES 部分の H/D 交換反応を同様に DMSO 停止 H/D 交換法を用いて追跡した。GroEL との結合部分にあたる可動性ループ領域が強く保護され、 $P_f$  が  $10^5$ - $10^6$  のオーダーとなった。可動性ループが GroEL による認識にとって重要であることが明らかとなった。

## 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 22 件)

1. Yagi-Utsumi, M., Kuniyama, T., Nakamura, T., Uekusa, Y., Makabe, K., Kuwajima, K. & Kato, K. (2013). NMR characterization of the interaction of GroEL with amyloid  $\beta$  as a model ligand. *FEBS Lett.* **In press.** (査読有)
2. Nakamura, T., Aizawa, T., Kariya, R., Okada, S., Demura, M., Kawano, K., Makabe, K. & Kuwajima, K. (2013). Molecular mechanisms of the cytotoxicity of human  $\alpha$ -lactalbumin made lethal to tumor cells (HAMLET) and other protein-oleic acid complexes. *J. Biol. Chem.* **288**, 14408-14416. (査読有)
3. Chandak, M. S., Nakamura, T., Makabe, K., Takenaka, T., Mukaiyama, A., Chaudhuri, T. K., Kato, K. & Kuwajima, K. (2013). The H/D-Exchange Kinetics of the *Escherichia coli* Co-Chaperonin GroES Studied by 2D NMR and DMSO-Quenched Exchange Methods. *J. Mol. Biol.* **In press.** (査読有)
4. Chandak, M. S., Nakamura, T., Takenaka, T., Chaudhuri, T. K., Yagi-Utsumi, M., Chen, J., Kato, K. & Kuwajima, K. (2013). The use of spin desalting columns in DMSO-quenched H/D-exchange NMR experiments. *Protein Sci.* **22**, 486-491. (査読有)
5. Makabe, K., Nakamura, T. & Kuwajima, K. (2013). Structural insights into the stability perturbations induced by N-terminal variation in human and goat  $\alpha$ -lactalbumin. *Protein Eng. Des. Sel.* **26**, 165-170. (査読有)
6. Mukaiyama, A., Nakamura, T., Makabe, K., Maki, K., Goto, Y. & Kuwajima, K. (2013). Native-state heterogeneity of  $\beta_2$ -microglobulin as revealed by

- kinetic folding and real-time NMR experiments. *J. Mol. Biol.* **425**, 257-272. (査読有)
7. Mukaiyama, A., Nakamura, T., Makabe, K., Maki, K., Goto, Y. & Kuwajima, K. (2013). The molten globule of  $\beta_2$ -microglobulin accumulated at pH 4 and its role in protein folding. *J. Mol. Biol.* **425**, 273-291. (査読有)
  8. Zhang, Q., Chen, J., Kuwajima, K., Zhang, H.M., Xian, F., Young, N.L. & Marshall, A.G. (2013). Nucleotide-induced conformational changes of tetradecameric GroEL mapped by H/D exchange monitored by FT-ICR mass spectrometry. *Sci Rep* **3**, 1247. (査読有)
  9. Chen, J., Yagi, H., Sormanni, P., Vendruscolo, M., Makabe, K., Nakamura, T., Goto, Y. & Kuwajima, K. (2012). Fibrillogenic propensity of the GroEL apical domain: a Janus-faced minichaperone. *FEBS Lett.* **586**, 1120-1127. (査読有)
  10. Tomoyori, K., Nakamura, T., Makabe, K., Maki, K., Saeki, K. & Kuwajima, K. (2012). Sequential four-state folding/unfolding of goat  $\alpha$ -lactalbumin and its N-terminal variants. *Proteins* **80**, 2191-2206. (査読有)
  11. Chen, J., Makabe, K., Nakamura, T., Inobe, T. & Kuwajima, K. (2011). Dissecting a bimolecular process of MgATP<sup>2-</sup> binding to the chaperonin GroEL. *J. Mol. Biol.* **410**, 343-356. (査読有)
  12. Rathnayaka, T., Tawa, M., Nakamura, T., Sohya, S., Kuwajima, K., Yohda, M. & Kuroda, Y. (2011). Solubilization and folding of a fully active recombinant *Gaussia luciferase* with native disulfide bonds by using a SEP-Tag. *Biochim. Biophys. Acta* **1814**, 1775-1778. (査読有)
  13. Kanzaki, T., Ushioku, S., Nakagawa, A., Oka, T., Takahashi, K., Nakamura, T., Kuwajima, K., Yamagishi, A. & Yohda, M. (2010). Adaptation of a hyperthermophilic group II chaperonin to relatively moderate temperatures. *Protein Eng. Des. Sel.* **23**, 393-402. (査読有)
  14. Nakamura, T., Makabe, K., Tomoyori, K., Maki, K., Mukaiyama, A. & Kuwajima, K. (2010). Different folding pathways taken by highly homologous proteins, goat  $\alpha$ -lactalbumin and canine milk lysozyme. *J. Mol. Biol.* **396**, 1361-1378. (査読有)
  15. Ochi, A., Makabe, K., Kuwajima, K. & Hori, H. (2010). Flexible recognition of the tRNA G18 methylation target site by TrmH methyltransferase through first binding and induced fit processes. *J. Biol. Chem.* **285**, 9018-9029. (査読有)
  16. Tsukamoto, S., Yamashita, T., Yamada, Y., Fujiwara, K., Maki, K., Kuwajima, K., Matsumura, Y., Kihara, H., Tsuge, H. & Ikeguchi, M. (2009). Non-native alpha-helix formation is not necessary for folding of lipocalin: comparison of burst-phase folding between tear lipocalin and  $\beta$ -lactoglobulin. *Proteins* **76**, 226-236. (査読有)
  17. Inobe, T., Takahashi, K., Maki, K., Enoki, S., Kamagata, K., Kadooka, A., Arai, M. & Kuwajima, K. (2008). Asymmetry of the GroEL-GroES complex under physiological conditions as revealed by small-angle X-ray scattering. *Biophys. J.* **94**, 1392-1402. (査読有)
  18. Ishii, T., Murayama, Y., Katano, A., Maki, K., Kuwajima, K. & Sano, M. (2008). Probing force-induced unfolding intermediates of a single staphylococcal nuclease molecule and the effect of ligand binding. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **375**, 586-591. (査読有)
  19. Kanzaki, T., Iizuka, R., Takahashi, K., Maki, K., Masuda, R., Sahlan, M., Yébenes, H., Valpuesta, J.M., Oka, T., Furutani, M., Ishii, N., Kuwajima, K. & Yohda, M. (2008). Sequential action of ATP-dependent subunit conformational change and interaction between helical protrusions in the closure of the built-in lid of group II chaperonins. *J. Biol. Chem.* **283**, 34773-34784. (査読有)
- [学会発表] (計 52 件)
1. Kuwajima, K. (2013). Sequential four-state folding/unfolding of goat  $\alpha$ -lactalbumin and its N-terminal variants. *17th Hiroshima International Symposium on Synchrotron Radiation - Progress in materials science and synchrotron radiation*, Feb. 28-Mar. 1, Hiroshima Univ.
  2. Chandak, M.S., Nakamura, T., Makabe, K., Takenaka, T., Mukaiyama, A., Chaudhuri, T.K., Chen, J., Kato, K. & Kuwajima, K. (2013). Structural fluctuation of free

- GroES and the GroES-SR1 complex studied by the use of hydrogen/deuterium (H/D) exchange. *57th Annual Meeting of the Biophysical Society (USA)*, Feb. 2-6, Philadelphia, USA.
3. Kuwajima, K. (2012). The structure and function of HAMLET and its related protein complexes. *3rd HAMLET Conference*, Dec. 7-8, Lund, Sweden.
  4. Kuwajima, K. (2012). Structural fluctuations and functional expression of the chaperonin complexes. *6th International Symposium "Molecular Science of Fluctuations toward Biological Functions"*, Dec. 5-6, 2012, Kyoto, Japan.
  5. 桑島邦博 (2012). シャペロン超分子複合体の水素交換反応. *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15-16日, 大阪.
  6. Kuwajima, K. (2011). Molecular Mechanisms of the *Escherichia coli* Chaperonin Function. *3rd Asia Pacific Protein Association (APPA) Conference*, May 6-9, 2011, Shanghai, China.

[図書] (計1件)

1. Kuwajima, K. (2009). "Water and Biomolecules-Physical Chemistry of Life Phenomena," pp. 307, Springer-Verlag, Berlin & Heidelberg (分担執筆).

[産業財産権]

○出願状況 (計2件)

名称: 蛋白質-化学療法剤複合体及びその製造方法, 並びに医薬

発明者: 桑島邦博、中村敬、真壁幸樹、岡田誠治

権利者: 自然科学研究機構、熊本大学

種類: 特許

番号: 特願 2012-147492

出願年月日: 2012年06月29日

国内外の別: 国内

名称: 球状蛋白質の準安定状態を用いた抗癌細胞作用のある分子の作成

発明者: 桑島邦博、中村敬、真壁幸樹

権利者: 自然科学研究機構

種類: 特許

番号: 特願 2011-238611

出願年月日: 2011年10月31日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://researchmap.jp/read0007744/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

桑島 邦博 (KUWAJIMA KUNIHIRO)

大学共同利用機関法人自然科学研究機構  
(岡崎共通研究施設)・岡崎統合バイオサイ  
エンスセンター・教授

研究者番号: 70091444

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者

真壁 幸樹 (MAKABE KOKI)

大学共同利用機関法人自然科学研究機構  
(岡崎共通研究施設)・岡崎統合バイオサイ  
エンスセンター・助教

研究者番号: 20508072

(H23 まで連携研究者として参画)