

平成22年 6月10日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2008～2009

課題番号：20870035

研究課題名（和文） シャペロニンGroELの新しい反応モデル構築と細胞内動態

研究課題名（英文） Modeling of an novel reaction cycle and analyses of cellular dynamics of chaperonin GroEL

研究代表者

小池 あゆみ (KOIKE AYUMI)

神奈川県工科大学・応用バイオ科学部・准教授

研究者番号：20454176

研究成果の概要（和文）：

細胞内全タンパク質の約15%の構造形成（フォールディング）を助けるタンパク質であるシャペロニン GroEL の作用機構を明らかにするため、重要な中間体であるフットボール型複合体の性質を生化学的に調べ、2つの反応槽の非対称性を明らかにした。また、細胞内で形成された複合体を単離・検出する手法を確立するとともに、基質タンパク質を空洞内に閉じ込めた状態の複合体の構造解析を行った。

研究成果の概要（英文）：

Chaperonin GroEL is involved in the folding of ~15% of newly translated protein in the cell. To clarify the chaperonin reaction mechanism, we analyzed in detail the symmetric football complexes which is critical intermediate in the reaction cycle, and demonstrated asymmetric diversity of two reaction chambers in the football complexes. We also established key techniques for isolating and detecting the chaperonin complexes formed in the cell, and determined the solution structure of the complexes encapsulating its substrate proteins.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

研究分野：生化学

科研費の分科・細目：生物学・機能生物化学

キーワード：蛋白質、フォールディング、酵素、シャペロン

1. 研究開始当初の背景

それまでの研究から、シャペロニン 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ことが通説として定着し

ていた。ところが、申請者らにより、これまでの作用モデルに反するいくつかの事実が明らかとなり、それに加えて、これまでの作用機構モデルでは存在しえないフットボー

ル型反応中間体を単離した。そのため、この反応中間体を組み込んだシャペロニンの新しい作用モデルの確立が必要であった。

2. 研究の目的

(1) フットボール型反応中間体を經由する GroEL の新しい作用機構モデルを立案・検証する。

(2) *in vitro* で構築した新たな作用モデルが、細胞内における GroEL の作用機構にもあてはまることを検証する。

3. 研究の方法

(1) ATP 加水分解を遅くした GroEL の変異体を用いて、反応の素過程を解析することで、フットボール型複合体に結合した2つの GroES は完全に等価なのか、あるいは不等価なのかを調べる。これにより、同時に活性化された2つの反応槽の協同性が保たれているのかどうかを検証できる。

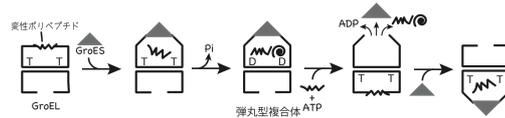
(2) *T. thermophilus* の GroEL-GroES 複合体は細胞内で変性タンパク質を閉じ込めたまま複合体として精製できることがわかっている。この基質を閉じ込めた GroEL 複合体の電子顕微鏡観察を行い、反応途中のシャペロニン複合体の構造を決定する。

(3) *in vivo* クロスリンク技術を使って、大腸菌の細胞内からフットボール型中間体を単離することを目指す。フットボール型複合体が細胞内で形成されていることが確認できれば、GroEL が細胞内でも新モデルに従って作用している可能性が示唆される。

4. 研究成果

(1) ヒスチジンタグを融合させた GroES (His-GroES) を Ni-NTA に結合させ、GroES カラムを作成した。そこへ ATP 加水分解が遅くなった GroEL 変異体 (D398A) を ATP 共存下で結合させ、一定の時間の後に蛍光色素でラベルした2つめの GroES を結合させた。カラムから外れてくる分子種を HPLC ゲル濾過クロマトグラフィーで分析したところ、90%以上が先に結合した側の、His-GroES と GroEL (D398A) の間の結合が解離したものであることがわかった。このことより、フットボール型複合体の2つの反応槽は一見対称であるように見えるが実は等価ではなく、先に結合した GroES が必ず先に解離することがわかった。つまり、フットボール型複合体の2つの GroES の結合と解離の順序は正しく守られていることが明らかとなった。

A. 弾丸型複合体經由サイクル (従来説)



B. フットボール型複合体經由サイクル (新しい作用モデル)

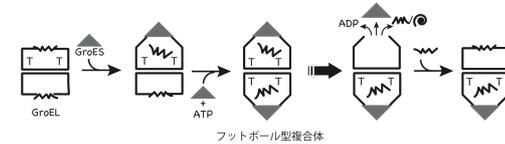


図1 シャペロニンの反応機構

(2) *Thermus thermophilus* から精製した GroEL-GroES-ADP 複合体を用いて低温電子顕微鏡法を用いた単粒子解析により、基質を取り込んだ GroEL-GroES 複合体の構造を明らかにした。天然から得たシャペロニン複合体の立体構造では、*cis* 空洞の中央付近に、取り込まれた基質と考えられる密度を観測することができた。これは、天然に存在する多様な基質の平均と考えられる。また、大腸菌から別々に精製した GroEL と GroES を用いて、GroEL-GroES-ADP 複合体を再構成した場合には、このような密度を観測することはできなかった。また、*cis* リングは7回対称性をもたず非対称であることが観測された。このような対称性の破れは、基質により起こると考えられ、空洞内部の基質とシャペロニン複合体の内壁との間に何らかの相互作用が存在することを示唆しており、基質の効率的な *cis* 空洞からの放出に関係している可能性がある。このように、基質が実際にシャペロニンの空洞内に取り込まれて、フォールディングを行っている中間状態が低温電子顕微鏡により可視化された。

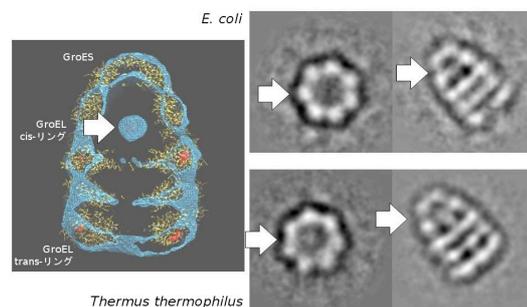


図2 シャペロニン基質複合体の構造

(3) 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 GroES に取り込ませるために、GroES の GroEL

結合部位のアミノ酸残基に相当するコドンにアンバー変異を導入したいくつかの変異型 GroES 遺伝子を作製し、これをアンバーサプレッサー-tRNA、pBpa 特異的アミノアシル tRNA 合成酵素とともに大腸菌内で発現させた。宿主大腸菌にはゲノム上の GroES の発現をアラビノースの有無によって制御可能な MGM100 株を使用し、大腸菌内で発現したほとんどの GroES が変異型 GroES となるようにした。pBpa 含有培地内で大腸菌がある程度生育した後、菌体培養液に紫外線を照射して、細胞内 GroEL/GroES 複合体を光架橋し、SDS-PAGE にてクロスリンク産物の量を比較した。これにより、大腸菌内で GroEL と GroES はクロスリンクすることが可能であることを示し、最もクロスリンク効率の良い GroES のアミノ酸残基を決定した。これにより、細胞内で形成された GroES-GroEL-GroES フットボール型複合体の単離を可能とする実験系が構築できた。

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 3 件)

- ① Kanno R, Koike-Takeshita A, Yokoyama K, Taguchi H, Mitsuoka K., Cryo-EM structure of the native GroEL-GroES complex from *thermus thermophilus* encapsulating substrate inside the cavity., *Structure*, 査読有, 17(2), 2009, 287-93.
- ② 光岡薫, 小池あゆみ, 田口英樹, シャペロニン・基質複合体の分子構造, *生物物理*, 査読有, 49(6), 2009, 296-297.
- ③ Koike-Takeshita, A., Yoshida, M. and Taguchi, H., Revisiting the GroEL-GroES reaction cycle via the symmetric intermediate implied by novel aspects of the GroEL (D398A) mutant., *J. Biol. Chem.*, 査読有, 283, 2008, 23774-81. "Paper of the week" に採択

[学会発表] (計 9 件)

- ① 小池 あゆみ, 新島弘識, 田口 英樹, GroEL/GroES フットボール型複合体における 2つのリングは等価なのか, 日本分子生物学会, 2009 年 12 月, パシフィコ横浜.
- ② 小池 あゆみ, 新島弘識, 田口 英樹, GroEL/GroES フットボール型複合体における 2つのリングは等価なのか, 日本化学会, 2009 年 10 月, 神戸ポートアイランド.

③ 小池 あゆみ, 吉田 賢右, 田口 英樹, シャペロニン GroEL の反応モデルの改訂と 2 ストロークモデルの可能性, 日本分子生物学会, 2008 年 12 月, 神戸ポートアイランド.

④ Ayumi Koike-Takeshita, Masasuke Yoshida, Hideki Taguchi, Revisiting the GroEL-GroES reaction cycle via the symmetrical intermediate implied by novel aspects of the GroEL (D398A) mutant, FASEB Summer Research Conferences Protein Folding in the Cell, 2008 年 7 月, Saxtons River, Vermont, USA.

⑤ 小池 あゆみ, 田辺弘幸, 吉田 賢右, 田口 英樹, GroEL の ATP 加水分解に関する新規変異体, 日本蛋白質科学会, 2008 年 6 月, タワーホール船堀.

[図書] (計 1 件)

- ① 小池あゆみ, 田口英樹, 共立出版, 「GroEL/GroES」 in キーワード: 蛋白質の一生 編集・遠藤斗志也、小椋光、永田和宏、森和俊、田口英樹、吉田賢右, 2008, pp. 1054-1055.

[産業財産権]

○出願状況 (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: 特願 2008-294487

出願年月日: 2008 年 1 月 1 日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

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・准教授

研究者番号: 20454176