

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10日現在

機関番号：32714

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22570146

研究課題名（和文） 細胞内タンパク質フォールディング機構の解明～*in vivo* タンパク質相互作用解析～研究課題名（英文） Elucidation of the intracellular protein folding mechanism～*In vivo* protein interaction analysis～

研究代表者

小池 あゆみ (KOIKE AYUMI)

神奈川県立大学・応用バイオ科学部・教授

研究者番号：20454176

研究成果の概要（和文）：細胞内のタンパク質フォールディングに重要な GroEL の反応機構を解明するため、*in vivo* 光クロスリンク技術により、細胞内の GroEL/GroES 相互作用を解析した。細胞内で形成された GroEL 複合体をクロスリンクした後にウェスタンブロッティングで解析し、フットボール型反応中間体の形成を明らかにした。また、蛍光蛋白質を融合した GroES を用いて蛍光相関分光法（FCS）により、細胞内の複合体の検出が可能となった。

研究成果の概要（英文）：To elucidate the reaction mechanisms of GroEL, important in protein folding in the cell, I analyzed the GroEL / GroES interactions in cells using *in vivo* photo-crosslinking techniques. After cross-linking of the GroEL-GroES complexes formed in cells, they were analyzed by western blotting. As a result, “football” type reaction intermediate was detected. Furthermore, fluorescence correlation spectroscopy (FCS) using a GroES which fused fluorescent protein enabled to detect GroEL-GroES complexes in the cell.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

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背中合わせに 2 つ重なった 14 量体構造を形成しており、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。ところが我々は、現在提唱されている GroEL の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」GroES-GroEL-GroES 複合体を反応中間体として単離した (Koike-Takeshita *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2008)。同じ時期、他グループからも 1 分子観察によってフットボール型中間体の形成が報告され (Sameshima *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2008)、10 年来信じられてきたこれまでの反応モデルの改訂が必要となった。我々は、*in vitro* での実験

結果からシャペロニンの2つのリングが同時に活性状態にある、新しいダブルストロークモデルを提案している。このダブルストロークモデルが、細胞内におけるシャペロニンのタンパク質フォールディング機構を表していることを証明する必要がある。

2. 研究の目的

細胞内 GroEL/GroES 相互作用を2つの方法で解析し、フットボール型複合体形成を検証する。

(1) *in vivo* 光クロスリンク技術により、細胞内で形成された複合体を光架橋した後、分析し、フットボール型複合体の形成を示す。

(2) 蛍光相互相関分光法 (FCCS) により、2つの GroES が同時に1つの GroEL に結合することを示すことで、フットボール型複合体の形成を検証することを目指す。

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いっ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) (図1) 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。目的タンパク質と相互作用するタンパク質を架橋によって安定に回収することが可能になるので、寿命の短い反応中間体の単離・同定に役立つ強力な技術であると考えた。そこで、大腸菌内で1分子の GroEL が2分子の GroES と結合したフットボール型複合体を単離できれば、*in vitro* の実験から我々が提案したダブルストロークモデルを、*in vivo* においても検証することができる。

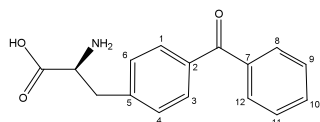


図1 pBpa の構造

(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。1種類の蛍光色素の

揺らぎを観察する蛍光相関分光法 (FCS) においては、大腸菌の1細胞を固定して観察したという報告がある (Cluzel et al., Science, 2000)。この手法を用いて、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) pBpa を GroES の GroEL 結合部位 (図2) に取り込ませ、pBPA と GroEL との間に紫外線照射によって架橋を形成させて細胞内で形成した GroEL 複合体の解析を行った。pBpa の導入部位の指定は、終始コドンの1つであるアンバーコドン (UAG) を用い、変異導入 GroES 遺伝子はアンバーサプレッサー tRNA、pBpa 特異的のアミノアシル 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 株を使用することで、大腸菌内のほとんどの GroES は変異型となる。大腸菌がある程度生育した後、紫外線を照射して細胞内 GroEL/GroES 複合体を光架橋し、Native PAGE による分離条件を検討し、ウェスタンブロッティングで解析したところ、細胞内において、1分子の GroEL に1分子の GroES が結合した“弾丸型” GroES-GroEL 複合体に加え、1分子の GroEL に2分子の GroES が結合した“フットボール型” GroES-GroEL-GroES 複合体が形成していることが確認できた (図3)。これにより、細胞内においても *in vitro* での知見と同様に、GroEL が同時に2分子の GroES を結合したフットボール型複合体を形成して機能していることが示唆された。また、培養時の温度を 37~42°C で変化させ、各複合体の量を比較したところ、いずれの条件でも3種の複合体が検出され、熱ストレスによる顕著な量的差異はなかった。

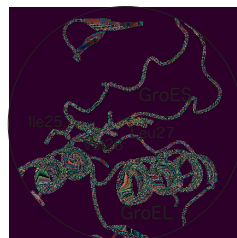


図2 アンバー変異導入部位

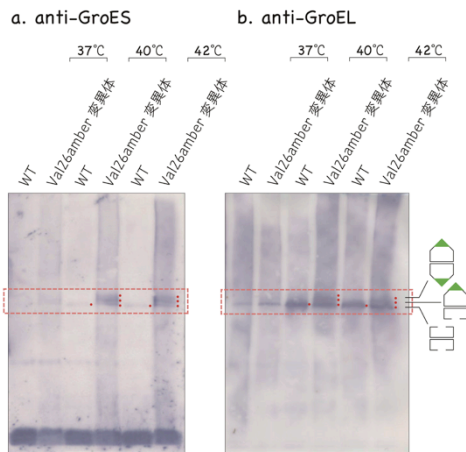


図3 GroEL-GroES 複合体の解析

(2) GFP 融合 GroES を大腸菌内で発現させて蛍光相関分光法 (FCS) を行ったところ、複合体分子量 (約 800kDa) に相当する分子の蛍光が観察できた。これにより、大腸菌内 GroEL/GroES の結合・解離の動的観察が可能となった。これを蛍光相互相関分光法 (FCCS) に展開するために、7 量体 GroES を 1 つの遺伝子で発現させた tandem-GroES を用いて (Nojima *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2008)、GroES7-GFP、GroES7-mOrange を発現させることに成功した (図 4)。2 種の GroES を同時に発現させた大腸菌の FCCS を行うことで、細胞内で GroEL/GroES フットボール型複合体が形成されていることを明らかにしていく。



図4 GFP 融合 GroES 発現系

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 2 件)

- ① Inoue Y, Kawai-Noma S, Koike-Takeshita A, Taguchi H, Yoshida M., Yeast prion protein New1 can break Sup35 amyloid fibrils into fragments in an ATP-dependent manner., *Genes Cells*, 査読有, 16, 2010, 545-56
- ② 依田ひろみ, 小池あゆみ, 新規ネガティブ染色剤を用いた透過型電子顕微鏡による生物試料の観察—分析電子顕微鏡システム利用研究成果、その XXIII (1) —, 神奈川工科大学研究報告 B 理工学編, 査読有, 37, 2013, 25-28

[学会発表] (計 9 件)

- ① 小池あゆみ, 横田幸範, 岡野舞姫, 増田恵, 田口英樹, 細胞内光クロスリンク技術を用いたシャペロニン複合体の解析, 日本蛋白質科学会, 2010 年 6 月 18 日, 札幌コンベンションセンター(札幌市)
- ② Ayumi Koike-Takeshita, Yukinori Yokota, Maki Okano, Megumi Masuda, Hideki Taguchi, In vivo evidence for the symmetric chaperonin GroEL-GroES complex revealed by site-directed in vivo photo-crosslinking., 日本分子生物学会, 2010 年 12 月 9 日, 神戸ポートアイランド (神戸市)
- ③ Ayumi Koike-Takeshita, Masasuke Yoshida, Hideki Taguchi, ASP-52 plays a critical role in ATP hydrolysis of GroEL, Cold Spring Harbor Asia Conference "Protein Homeostasis in Health & Disease", 2011 年 9 月 26-30 日, Suzhou Dushu Lake Conference Center (中国・上海)
- ④ Hiromi Yoda, Osamu Yamamoto, Ayumi Koike-Takeshita, GroEL mutant can encapsulates metal nano particles in each cavity, Pacific Rim Meeting, 2012 年 10 月 8 日 (Hawaii, Honolulu)
- ⑤ 依田ひろみ, 山本修, 小池あゆみ, シャペロニン GroEL 変異体のナノ粒子キャッピング剤としての利用, 日本生物工学会, 2012 年 10 月 26 日, 神戸国際会議場 (神戸市)
- ⑥ 依田ひろみ, 小池あゆみ, ナノサイズの空洞を持つ大腸菌シャペロニン GroEL の水溶性キャッピング剤としての利用, 平成 24 年度神奈川県ものづくり技術交流会, 2012 年 11 月 7 日, 神奈川県産業技術センター (海老名市) ポスター賞受賞

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

名称：シャペロニン複合体及びその製造方法

発明者：小池あゆみ、依田ひろみ、山本修

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 2012-70329

出願年月日：24年3月26日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.kanagawa-it.ac.jp/~14013/syo/kyo%20gyoseki.pdf>

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