

タンパク質のフォールディングを補助するシャペロニンの構造と働き

溝端 知宏・河田 康志
鳥取大学大学院工学研究科・鳥取大学大学院医学系研究科

Structure and function of chaperonins, molecular assistants of protein folding

Tomohiro MIZOBATA and Yasushi KAWATA
Graduate School of Engineering and Graduate School of Medical Science, Tottori University
Tottori 680-8552 Japan
E-mail: mizobata@bio.tottori-u.ac.jp

Abstract: Proteins in the cell are routinely exposed to various conditions that promote unfolding and irreversible aggregation. Chaperonins act to prevent protein denaturation and aggregation by sequestering aggregation-prone protein molecules and encouraging recovery. Chaperonin function is supported by various static and dynamic characteristics of its unique structure. This article summarizes some of our results regarding the structural characteristics that support the function of the *Escherichia coli* chaperonin GroE.

Keywords: Protein folding, Stress response, Molecular chaperones, Chaperonins

1. はじめに

タンパク質が生物の中で様々な生理的機能を果たす際、正しい立体構造が形成されている（フォールディングされている）ことが機能発現に不可欠である。環境要因によりこのタンパク質の構造が変化、もしくは失われる（変性する）とそのタンパク質の機能も失われ、大規模なタンパク質の変性は細胞の生存そのものを脅かす。生物にはこのようなタンパク質の大規模変性を防ぎ、細胞を守ることを専門とする分子シャペロンという一群のタンパク質が存在する [1]。

分子シャペロンは、細胞がストレスにさらされた際にタンパク質の構造の保護、タンパク質の増産、そして逆にタンパク質の分解促進など、タンパク質に関連するあらゆる経路のコントロールに関与する。分子シャペロンの中でもシャペロニンと呼ばれるタンパク質は、変性し、会合して沈殿を形成する恐れのあるタンパク質を直接認識し一時的に溶媒から隔離することで構造の再形成を促す。従って、シャペロニンの作用は細胞内におけるタンパク質の構造形成とその維持というシステムを理解する上で大変重要な位置を占める [2]。

2. 大腸菌シャペロニン GroE

大腸菌のシャペロニンタンパク質 GroE は代表的なシャペロニンタンパク質として国内外で熱心に研究されている。GroEL は大小 2 種類のタンパク質分子により構成され、分子量約 57,000 の GroEL タンパク質が 14 分子、分子量約 10,000 の GroES タンパク質が 7 分子会合し、合計 21 量体の複合体を形成する [3] (図 1)。複合体において GroEL は 7 員環のリング状構造を形成し、このリングが背中合わせに会合する形で 14 量体を構成する。GroES は 7 員環リング構造として複合体に結合する。

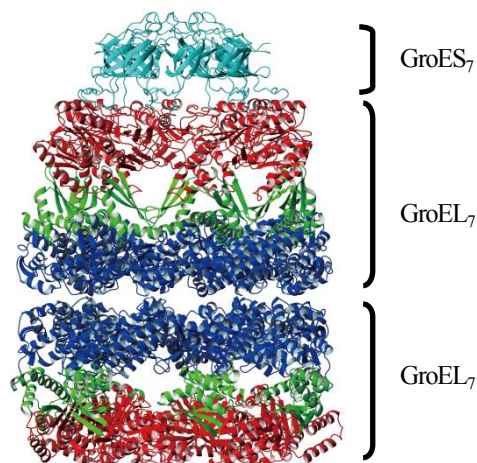


図 1. GroE の立体構造 [3]。GroEL はドメインを示す 3 色（赤、緑、青）で表示され、GroES はシアンで表示されている。本稿のタンパク質立体構造模式図は MOLMOL で作成した [4]。

図1に示したGroEL14量体の上下両端には変性タンパク質やGroESを結合する部位が1カ所ずつ存在する。GroELはアデノシン5'-三リン酸(ATP)を結合し、これを加水分解する活性をもっているが、興味深いことに、ATPを結合していないGroELは変性タンパク質と、ATPを結合したGroELはGroESと優先的に結合する性質を示す[5]。

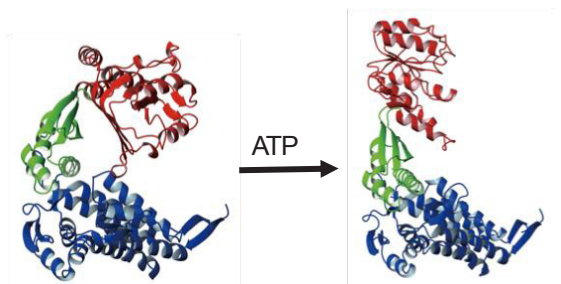


図2. GroESサブユニットのドメイン構造[3]。赤；頂上ドメイン，緑；中間ドメイン，青；赤道ドメイン。左側の構造がATPを結合していないGroELの構造で、ATPの結合に伴い、サブユニットの構造は右の構造へと変化する。

ATPの結合に応じて変性タンパク質とGroESに対する親和性を切り替えるGroELのサブユニット構造は3個の「ドメイン」と呼ばれる構造単位により構成される(図2)。赤道ドメイン(図2, 青)はGroELの7員環リング同士が会合する部位であり、14量体構造の中央(赤道)に位置する(図1参照)。ATPの結合・加水分解部位も赤道ドメイン内に存在する。GroELの頂上ドメイン(図2, 赤)はGroEL14量体の両端にある変性タンパク質・GroES結合部位を形成しており、ATPの結合状態に応じて変性タンパク質やGroESとの結合を切り替える働きを直接担当している。この2個のドメインの間に挟まれる形で中間ドメイン(図2, 緑)が存在し、赤道ドメインと頂上ドメインの間で情報を伝達する役割を担っている[6]。

GroEが変性タンパク質を認識し、GroESとともに自身の構造内部に取り込むまでの反応過程を図3に示した。疎水性の高い部位を露出させた変性タンパク質が近づくとGroELはその疎水部位を頂上ドメインで認識し、結合する。次に、変性タンパク質を結合した側のGroEL7員環にATPが結合するとGroELは大規模な構造変化を起

こし、GroESと結合する構造へと変化する。このとき、先に結合していた変性タンパク質はGroELのリング中央部に誘導され、この上にかぶさるようにGroESが結合してカプセル状のGroEL・タンパク質・GroES3者複合体を形成する。

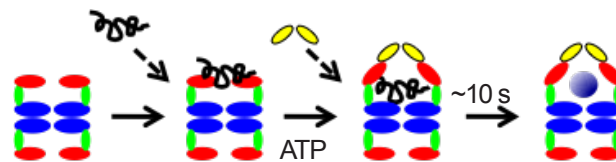


図3. GroEの反応メカニズムを示す模式図[2]。この図ではGroELが変性タンパク質と結合し、GroESとともにカプセル状の複合体に隔離して約10秒間、構造再形成を促すまでの反応過程を示す。

この複合体はGroELがATPをADPに加水分解するまで安定であり(10秒程度)、その後GroELのもう一方のリングに変性タンパク質やATPが結合することでGroESが解離し、そして閉じ込められたタンパク質が溶媒へ放出される。GroEはこのように変性タンパク質の結合と隔離を2つの部屋で交互に繰り返す、エンジンのような振る舞いを分子レベルで見せる。

我々は、大腸菌内におけるタンパク質の構造と機能維持に大きく関与するGroEの機能メカニズムをより詳細に理解することがタンパク質のフォールディング反応全般に対する理解につながると考え、様々な実験法を活用してGroEを解析し続けている。中でも、GroELのユニークな機能とそのサブユニットの構造との関係を明らかにするために、GroELの様々な変異体を用いて分子メカニズムの解析を続けてきた。

3. GroELサブユニットのドメイン間連携と機能：赤道ドメイン・中央ドメイン間ヒンジの役割

GroELサブユニットは3個の明確なドメインにより構成されているが、それぞれのドメインは蝶番(ヒンジ)と呼ばれる細い部位で連結されており、GroEの結晶構造解析によるとGroELはATPの結合と加水分解に応じてヒンジを支点にドメインの配置を変化させている。

GroEの機能発現にはGroELが変性タンパク質やGroESとのやりとりをダイナミックに変化させる必要があることが推定されたので、我々は特にドメインを連結

するヒンジ領域の重要性に注目し、ヒンジの動きに影響を及ぼすような遺伝子変異の導入とその性格付けを行ってきた。



図 4. Cys138 の位置。図は GroEL サブユニットの ATP を結合していない構造で、図中黄色が Cys138 を表す。

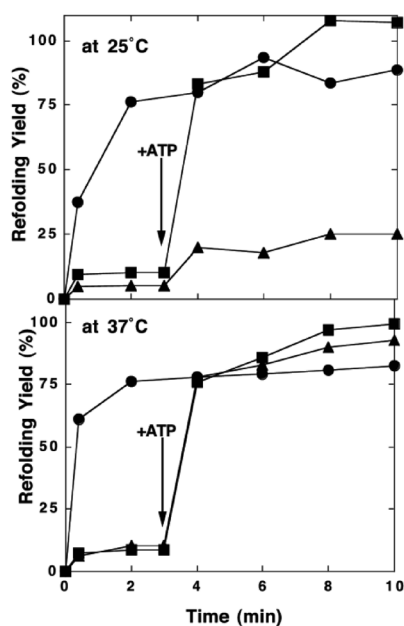


図 5. GroEL C138W 変異体は 37°C でタンパク質のフォールディングを補助するが 25°C では補助できない (文献 [7] より)。図中はトリオスリン酸イソメラーゼ (TIM) のフォールディング反応におけるシャペロニンの効果。TIM は自発的に活性構造を開封させる能力を持つが (図中●), GroE が存在するとこれに結合し、フォールディングが停止する。■は野生型の GroEL を添加した反応で、▲が GroEL C138W を添加した反応である。▲では、反応温度により TIM の回復率が大きく変化している。

GroEL の Cys138 はサブユニットにおいて赤道ドメイ

ンと中間ドメインを連結するヒンジ 1 部位に存在し、GroEL の分子表面に露出している (図 4)。このシステイン残基をより側鎖の大きいトリプトファン残基に置換した変異体 (GroEL C138W 変異体) は、不思議なことに 37°C では野生型と同じ機能を発揮したが、25°C では変性タンパク質のフォールディングを補助することができなかった [7] (図 5, ▲)。

GroEL C138W に導入したトリプトファン残基が周りの溶媒環境に敏感な蛍光を発する特徴を利用し、ストップ・フロー蛍光解析装置を用いて ATP の結合に伴う GroEL C138W の動きを追跡した。すると、37°C で GroEL C138W は大きなシグナル変化を見せたが、25°C ではこの信号はほとんど抑制された [7] (図 6)。ATP の結合に伴い、GroEL の赤道ドメインと中間ドメインはヒンジ 1 を中心にその配置を変化させるが、25°C ではトリプトワンの立体障害によりこの変化が大幅に制限されていた。この実験結果より Cys138 近傍の分子内自由度の重要性が示された。

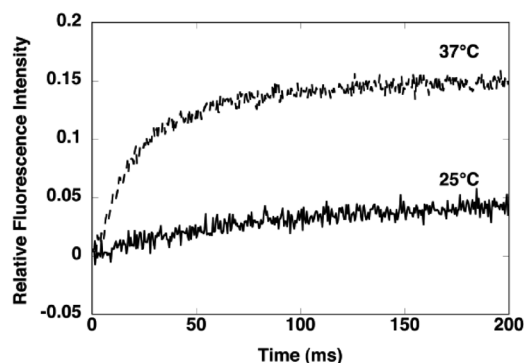


図 6. ATP の添加に伴う GroEL C138W のトリプトファン由来蛍光シグナル変化 (文献 [7] より)。ストップ・フロー蛍光解析により ATP 添加直後のシグナル変化を検出した。実験を行う温度に応じてシグナル変化の度合いが大きく異なることを観測した。

4. GroEL サブユニットのドメイン間連携と機能：中央ドメイン・頂上ドメイン間ヒンジの役割

GroEL の頂上ドメインと中間ドメインはサブユニット構造においてヒンジ 2 という別の部位により連結されている (図 7)。我々はこの部位にも立体障害を生み出すようなトリプトファン残基を導入することで C138W 変異と同じような性質を示す GroEL 変異体が作成できない

か、実験を試みた。

ヒンジ2の内部にはグリシン残基が3個含まれており (Gly374, Gly375, Gly192), この部位はきわめて自由度が高いことが推察された。この3カ所のアミノ酸残基をそれぞれトリプトファン残基に置換した。Gly374→Trp 変異と Gly375→Trp 変異については野生型と全く同じ性質

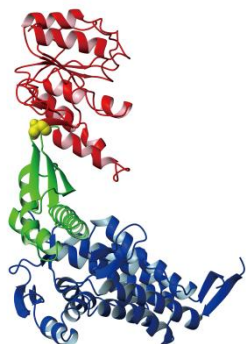


図7. Gly192の位置 (図中黄色)。GroELの構造はATPを結合した状態を表す。

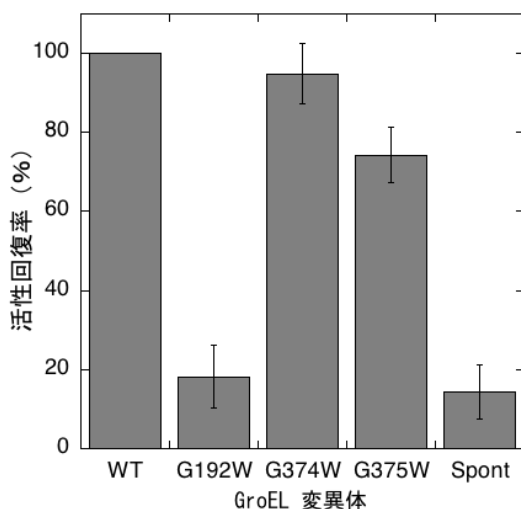


図8. ヒンジ2部位に導入されたGroELを用いたタンパク質のフォールディング反応 (文献 [8]より)。実験には牛由来ローダニーズを使用し、ローダニーズが完全変性状態から活性を回復する割合を百分率で示した。反応中に添加したGroE変異体の種類を横軸に示す。なお、WTは野生型GroELを添加した反応、SpontはGroEを含まない自発的な回復反応の結果。図5のTIMの場合とは異なり、ローダニーズは単独で完全変性状態から回復する能力に乏しく、GroEの補助を必要とするタンパク質である。

を示す変異体が得られたが、Gly192をトリプトファンに置換した場合、タンパク質のフォールディングを補助する能力が大幅に低下した変異体が得られた [8] (図8)。

より詳細な実験を行った結果、GroEL G192W変異体はATPが結合していない状態でもGroESと大変強く結合する性質を示すことが判明した。GroEL G192W変異体はヒンジ2にトリプトファン残基を導入した結果ATP結合時の構造にサブユニットが「ロック」された構造をとるようになった [8] (図9)。

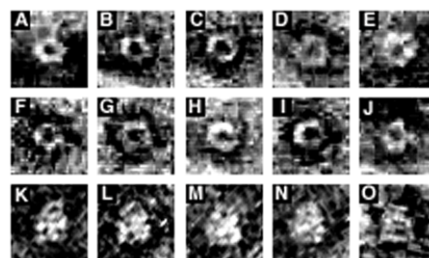


図9. GroEL G192W変異体の電子顕微鏡写真 (拡大図; 文献 [8]より)。図中A~JはATPを含まないGroEL G192Wサンプルの電子顕微鏡写真より分子を上から眺めたイメージをサンプリングしたもの、K~Oは同じ写真より分子を横から眺めたイメージをサンプリングしたものである。ATPが添加されていないにもかかわらずK~OのイメージではGroESを結合する構造に近いGroELの形状が確認できる (図1参照)。

GroELサブユニットの2箇所のヒンジにそれぞれ立体障害を導入するこれらの2種類の研究を通して、GroEの機能発現にはサブユニット全体の動的な振る舞い、特にヒンジを中心としたドメインオリエンテーションの変化がきわめて重要であることが明らかとなった。それと同時に、この2カ所のヒンジ部位はGroEの機能メカニズムにおいて異なる役割を持つこと：すなわちヒンジ2は変性タンパク質やGroESとの結合に対応する頂上ドメインの構造を切り替えるために重要で、ヒンジ1はより基盤的なGroELサブユニットの構造変化とGroELサブユニット間の連携に重要であることが明らかとなった。

5. 変性タンパク質を閉じ込める空間内部の環境とGroEの機能

表 1. GroEL の C 末端アミノ酸配列領域と C 末端アミノ酸残基削除変異体 (文献 [9]より)

EL-WT	…TTECMVTDLPKNDAAADLGAAGGMGGMGGMGM -548
EL-dC541	…TTECMVTDLPKNDAAADLGAAGGMGGM -541
EL-dC531	…TTECMVTDLPKNDAAAD -531
EL-dC525	…TTECMVTDLP -525
EL-NE	…TTECMVTDLP <u>GGGAAGL</u> LGAAGGMGGMGGMGM -548
EL-HB	…TTECMVTDLP <u>IGIAAI</u> LGAAGGMGGMGGMGM -548
EL-SC	…TTECMVTDLP <u>KNADDAL</u> LGAAGGMGGMGGMGM -548
EL-SH	…TTECMVTDLP <u>PRQEGGE</u> LGAAGGMGGMGGMGM -548

前述のように、GroEL・GroES が形成するカプセルに閉じ込められたタンパク質分子は、GroEL が ATP を ADP に加水分解するまでのおよそ 10 秒間、溶媒から隔離された状態で構造の回復を試みる (図 3, 右端)。変性タンパク質を閉じ込める GroE カプセルの内側にはグルタミン酸やアスパラギン酸残基が数多く存在し、GroE カプセルの内側はかなり親水性の高い環境であると推定されている。以前の研究において、この親水環境をより疎水性の性質に変化させる変異や、GroE カプセル内の容積 (空間内体積) を減少させる変異を導入すると GroE の機能が損なわれる実験結果が報告されている [10]。我々もまた、GroE カプセルの内部に面した GroEL の特定部位に対し、その役割を同定するために変異を導入し、その効果を調べた。

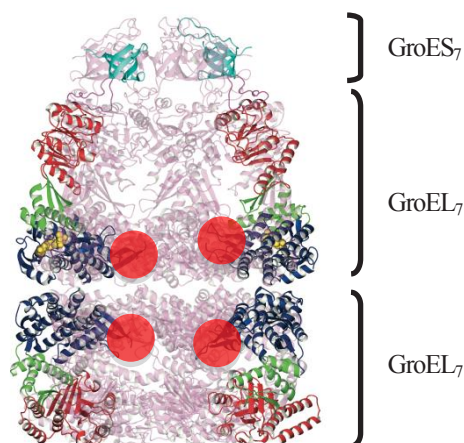


図 10. GroE の内部構造 (断面図) [9]。図 1 の構造を輪切りにし、内部の構造を可視化した。赤色の円で示した部位に GroEL の C 末端領域が含まれている。

GroEL ポリペプチド鎖の C 末端部位は GroEL サブユニット内では赤道ドメインの内部に相当し、更に C 末端部分は GroEL の立体構造においてカプセルの「底」の部分に相当する (図 10, 赤丸)。この部位のアミノ酸配列は「GGM」という 3 アミノ酸残基の配列が 4 回繰り返して連結している大変興味深い特徴がある (表 1)。X 結晶構造解析においては GroEL のこの C 末端配列領域の構造を確認することができず、変性タンパク質を閉じ込めるカプセルの形成にこの部位がどのように役立つのかを実験的に確認する必要を感じた。そこで、我々はこの特徴的なアミノ酸配列を段階的に削除し、アミノ酸の削除が GroEL の働きに及ぼす影響を調べることでこの興味深い配列領域の具体的な役割を調べることにした。

遺伝子操作により GroEL の C 末端アミノ酸配列を削除していき、特徴的な「GGM」配列をもたない GroEL の変異体をまず 3 種類 (EL-dC541, EL-dC531, EL-dC525) 作成した (表 1)。この変異体の働きを調べたところ、「GGM」配列の少し上流に存在する別の配列、「KNDAAAD」という配列部分を削除すると GroEL の機能が急激に損なわれることが明らかとなった (図 11) [9]。

この配列領域は負電荷をもつアスパラギン酸 (D) が 2 個、正電荷をもつリジン残基 (K) が 1 個含まれ、非常に親水性の強い配列領域であった。この配列領域を電荷の数がゼロの配列「GGGAAG」(EL-NE 変異体) や疎水性の強い配列「IGIAAI」(EL-HB 変異体) に置換した変異体は大腸菌の生育を支えることができなかった (表 1 および図 12, 左)。しかし「KNDAAAD」配列を並べ替えた変異体 (EL-SC 変異体; NKADDA) や、同数

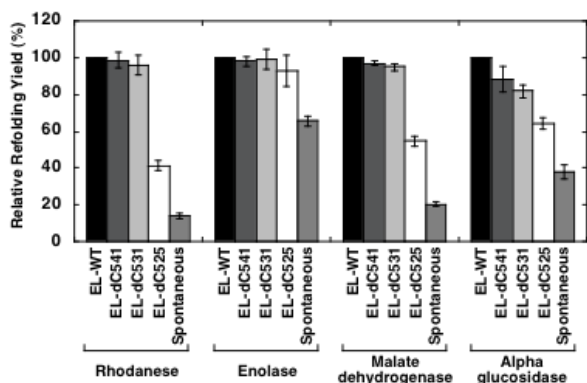


図 11. C-末端アミノ酸を順に削除した GroEL 変異体のフォールディング補助能力評価 (文献 [9]より)。4 種類のタンパク質のフォールディング反応を用いて GroEL と各変異体が活性の回復を補助するか、評価した。図中「100%」とは野生型 GroEL 存在下のフォールディング反応の活性回復率を指す。各酵素について、「Spontaneous」の値より大きいサンプルほど GroEL は積極的にフォールディングを補助していると判断できる。

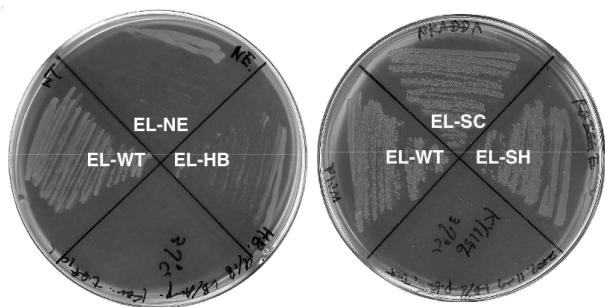


図 12. 各種 GroEL 変異体の機能を評価するための大腸菌生育実験 (文献 [9]より)。GroEL と GroES は大腸菌の生育に必須のタンパク質であり、その機能が失われると生育できない。そこで、野生型 GroEL 遺伝子の代わりに変異型の遺伝子を発現させ、大腸菌の生育の様子を観察することでその変異体が細胞内で機能するか否かを評価することができる。左の培養プレートでは EL-NE 変異体と EL-HB 変異体をもつ大腸菌は 37°C でほとんど生育できず、右のプレートでは EL-SC 変異体と EL-SH 変異体をもつ大腸菌は野生型 (EL-WT) GroEL をもつ大腸菌と同程度生育することが確認できた。

の電荷をもつアミノ酸配列に置換した変異体 (EL-SH 変異体; RQEGGE) は大腸菌の生育を支えることができた (図 12, 右) [9]。図 11, 図 12 の実験結果より、GroEL

の C 末端アミノ酸配列領域「KNDAAD」は、その静電的性質ゆえにシャペロニンの機能に重要であると考えられた。分子底部に電荷をもつアミノ酸残基を配置することで、カプセルの底面と変性タンパク質との不要な相互作用が防がれ、タンパク質が構造を回復するための微視的環境が整うと思われる。

6. 最後に

シャペロニンは原核・真核を問わずほとんどの生物において普遍的に存在し、細胞の生育に必要な重要な働きを担うタンパク質である。その構造はきわめて複雑で、GroEL・GroES・ATP が緻密に連携しながら多段階の反応メカニズムを実行し、変性したタンパク質のフォールディングを補助する。GroEL や GroES の複雑な構造に様々な変異を導入し、その変異の効果を機能的に評価する実験手法は GroE の反応機構に関する様々な興味深い側面を明らかにすることに貢献してきた。今後は、GroE の構造と機能との間に示唆されている様々な関係を更に解明するため、GroE の研究を積極的に行う。

参考文献

- [1]. Ellis, R. J. & van der Vies, S. M. (1991) Molecular chaperones, *Annual Review of Biochemistry*. 60, 321-347.
- [2]. Fenton, W. A. & Horwich, A. L. (2003) Chaperonin-mediated protein folding: fate of substrate polypeptide, *Quarterly Reviews of Biophysics*. 36, 229-256.
- [3]. Xu, Z., Horwich, A. L. & Sigler, P. B. (1997) The crystal structure of the asymmetric GroEL-GroES-(ADP)₇ chaperonin complex, *Nature*. 388, 741-750.
- [4]. Koradi, R., Billeter, M. & Wuthrich, K. (1996) MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures, *J Mol Graph*. 14, 51-55, 29-32.
- [5]. Jackson, G. S., Staniforth, R. A., Halsall, D. J., Atkinson, T., Holbrook, J. J., Clarke, A. R. & Burston, S. G. (1993) Binding and hydrolysis of nucleotides in the chaperonin catalytic cycle: implications for the mechanism of assisted protein folding, *Biochemistry*. 32, 2554-2563.
- [6]. Kawata, Y., Kawagoe, M., Hongo, K., Miyazaki, T.,

Higurashi, T., Mizobata, T. & Nagai, J. (1999) Functional communications between the apical and equatorial domains of GroEL through the intermediate domain, *Biochemistry*. 38, 15731-15740.

[7]. Miyazaki, T., Yoshimi, T., Furutsu, Y., Hongo, K., Mizobata, T., Kanemori, M. & Kawata, Y. (2002) GroEL-substrate-GroES ternary complexes are an important transient intermediate of the chaperonin cycle, *J Biol Chem*. 277, 50621-50628.

[8]. Machida, K., Fujiwara, R., Tanaka, T., Sakane, I., Hongo, K., Mizobata, T. & Kawata, Y. (2009) Gly192 at hinge 2 site in the chaperonin GroEL plays a pivotal role in the dynamic apical domain movement that leads to GroES binding and efficient encapsulation of substrate proteins, *Biochim Biophys Acta*. 1794, 1344-1354.

[9]. Machida, K., Kono-Okada, A., Hongo, K., Mizobata, T. & Kawata, Y. (2008) Hydrophilic residues 526 KNDAAD 531 in the flexible C-terminal region of the chaperonin GroEL are critical for substrate protein folding within the central cavity, *J Biol Chem*. 283, 6886-6896.

[10]. Tang, Y. C., Chang, H. C., Roeben, A., Wischnewski, D., Wischnewski, N., Kerner, M. J., Hartl, F. U. & Hayer-Hartl, M. (2006) Structural features of the GroEL-GroES nano-cage required for rapid folding of encapsulated protein, *Cell*. 125, 903-914.

(受理 平成22年10月22日)