

シャペロニン GroEL の構造変化に伴う動的プロセスに関する研究

2015年1月

水田 敏史

目次

本研究の要旨	I
略号	III

1. 序論

1-1. はじめに	1
1-2. 分子シャペロン	2
1-3. シャペロニン GroEL-GroES	6
1-3-1. シャペロニン GroEL の構造	6
1-3-2. シャペロニン GroES の構造	11
1-4. シャペロニン GroEL GroES の反応サイクル	12
1-5. GroEL の立体構造の遷移について	14
1-6. ストップト・フロー蛍光分析による構造解析	16
1-7. 円順列解析法 (Circular Permutation)	18
1-8. 本研究の目的	21

2. 材料と方法

2-1. 試薬と機器	22
2-2. プラスミド単離	28
2-3. アガロース電気泳動	28
2-4. 切り出し・DNA 断片の精製	29
2-5. 形質転換	29
2-6. DNA Sequence	30
2-7. GroEL R231W の作製	30
2-8. GroEL SR1-R231W の作製	30

2-9. GroEL D398A-R231W の作製.....	31
2-10. pETEL CP86 の作製(In-fusion Cloning).....	31
2-11. GroEL CP86 C4 (GroEL CP86 A3C G4C A552C G553C)の作製.....	31
2-12. GroEL CP86-R231W の作製.....	32
2-13. タンパク質定量.....	32
2-14. 大量培養.....	33
2-15. GroEL (野生型, 各種変異体)の精製.....	34
2-16. GroEL CP86 C4 の酸化処理.....	38
2-17. ATPase 活性測定 (モリブデンブルー法).....	38
2-18. MDH リフォールディング活性測定.....	39
2-19. Rhodanese リフォールディング活性測定.....	41
2-20. CD 測定.....	43
2-21. Gdn-HCl に対する構造安定性測定実験.....	43
2-22. 複合体分離実験.....	45
2-23. 電子顕微鏡観察.....	47
2-24. ストップト・フロー装置を用いた蛍光強度測定.....	47
2-25. FRET を利用した基質タンパク質の解離.....	49

3. 結果と考察

3-1. 円順列変異体 GroEL CP86 の機能解析.....	51
3-1-1. CD 測定(GroEL CP86).....	52
3-1-2. Gdn-HCl に対する構造安定性測定実験(GroEL CP86).....	53
3-1-3. ATPase 活性測定(GroEL CP86).....	54
3-1-4. Rhodanese, MDH リフォールディング活性測定(GroEL CP86).....	55
3-1-5. GroEL-GroES-基質, 複合体形成実験(GroEL CP86).....	56
3-1-6. 電子顕微鏡観察(GroEL CP86).....	59

3-2. 円順列変異体 GroEL CP86 C4 の機能解析	60
3-2-1. GroEL CP86 C4 の酸化処理	61
3-2-2. GroEL CP86 C4 の CD 測定	62
3-2-3. GroEL CP86 C4 の Gdn-HCl に対する構造安定性測定実験	63
3-2-4. GroEL CP86 C4 の ATPase 活性測定	64
3-2-5. Rhodanese, MDH リフォールディング活性測定	65
3-3. GroEL SR1-RW, D398A-RW の機能解析	66
3-3-1. ATPase 活性測定 (GroEL SR1-RW, D398A-RW)	66
3-3-2. GroEL SR1-RW のリフォールディング活性測定	67
3-4. GroEL 変異体のストップト・フロー蛍光分析	68
3-4-1. GroEL CP86-RW のストップト・フロー蛍光分析	68
3-4-2. シャペロニンサイクルの速度とアピカルドメイン構造変化の関連性	69
3-4-3. AMP-PNP がシャペロニン GroEL に及ぼす影響	70
3-4-4. 基質タンパク質存在下のストップト・フロー蛍光分析	71
3-4-5. 基質タンパク質存在下のストップト・フロー解析 (FRET 測定)	72
4. 総合考察	
4-1. 円順列変異体の GroEL CP86 の機能解析	74
4-2. ストップト・フロー蛍光分析によるシャペニン GroEL の機能解析	76
4-2-1. サブユニットを構成するドメイン間の繋がり	76
4-2-2. 2つのリングが形成する四次構造	77
4-2-3. ATP 加水分解活性	78
謝辞	80
引用文献	81

学位論文の概要及び要旨

シャペロニン GroEL は大腸菌の生存に必要不可欠なシャペロニンタンパク質であり、そのアミノ酸配列は他の生物種に由来するシャペロニンにおいてもよく保存されている。GroEL は 7 量体リングが背中合わせに重なった 14 量体ダブルリングを形成し、2 つのリングの中にはかご状の空間が存在する。GroEL は ATP の結合により立体構造を変化させ、コシャペロニン GroES が蓋をすることで外部と隔離された空間を形成し、主にこの空間の中でタンパク質の折りたたみを補助する。次に GroEL が ATP を加水分解すると、GroES が解離し、基質タンパク質が放出される。2 つのリングは協奏的に働き、ATP が結合し反応を行う側のリング（シスリング）、反対側のリング（トランスリング）において、交互に反応が繰り返される。GroEL のサブユニットは基質タンパク質との結合に関与するアピカルドメイン、ATP やリング間の結合に関与するエカトリアルドメイン、ドメイン間を繋ぐインターミディエイトドメインの 3 つのドメインで構成され、アピカルドメインは 3 つのドメインの中で最もダイナミックにその構造を変化させる。

これまでに、我々の研究グループではアピカルドメインに存在する 231 番目のアルギニン残基をトリプトファンに置換した変異体 (GroEL RW) を用いたストップト・フロー蛍光分析により、GroEL に ATP 及び GroES が作用することで、5 つの素過程からなる構造変化を引き起こすことを確認している。しかしながら、これらの過程が GroEL サブユニットのどのような構造変化を反映しているかは詳細に解明されていない。そこで、本研究では、ストップト・フロー解析で同定された各過程の構造変化、機能的役割を解明することを目的とし、GroEL における「サブユニットを構成するドメイン間の繋がり」、「2 つのリングが形成する四次構造」、そして「ATP 加水分解活性」の各側面に注視した GroEL RW を出発点にして作成した新たな変異体のストップト・フロー蛍光分析を行った。

GroEL の「サブユニットを構成するドメイン間の繋がり」を評価するため、ドメインをつなぐポリペプチド鎖を途中で切断することのできる円順列変異法を用いた。円順列変異体 (GroEL CP86) ではエカトリアルドメインとインターミディエイトドメインの間にポリペプチド末端を移動させたため、この 2 つのドメインをつなぐ 1 本の主鎖が切断された状態を模している。次に、「2 つのリングが形成する四次構造」を評価するにあたっては、シングルリング変異体 (GroEL SR1) を用いた。GroEL SR1 は本来 2 重リング、14 量体の GroEL が 7 量体のシングルリングを形成し、シスリング、トランスリングの協奏的な働きを欠損させている。野生型がもつダブルリング構造と比較することで、リング間の情報伝達に伴う構造変化について調査した。そして最後に、「ATPase 活性」に注目した評価については、ATPase 活性欠損変異体 (GroEL D398A) を用いた。この変異体は ATP 加水分解活性が野生型の 2% 程度であり、ATP 結合後の加水分解速度が非常に遅く、ATP 加水分解に関連した構造変化が観測されることが期待される。この構造変化をより詳細に調べるため、ATP と同じように結合するが、加水分解できない ATP アナログを用い調査を行った。

1. サブユニットを構成するドメイン間の繋がり

GroEL CP86 を用い、2 種類の変性タンパク質の折りたたみ能力を調査したところ、標的タンパク質の種類によって野生型と同程度の補助を実現する場合と、補助能力が大幅に低下する場合が存在することが分かった。これはポリペプチド末端の開裂が影響し、GroEL の基質特異性が変化したためと考えられた。そして、ジスルフィド結合を用いてポリペプチド鎖末端部位の再連結を試みたところ、ジスルフィド結合を形成した状態では折りたたみ能力が低下した基質タンパク質に対する補助能力が復活する様子が確認された。このため、GroEL のドメイン間の繋がりが見られることが示唆された。さらに、基質の種類によって選択的にフォールディング補助能力の違いが見られたことは、基質タンパク質の折りたたみ経路が複数存在する証拠であると考えられた。

2. 2つのリングが形成する四次構造

シングルリングの GroEL SR1 を用いた実験では変性タンパク質が結合した状態において、GroEL のアピカルドメインに起因する、ある構造変化が大幅に抑制された。アピカルドメインは変性タンパク質と GroES が結合した後でこのタンパク質分子を GroEL の中に閉じ込める際にダイナミックに構造を変化させることが知られているので、この実験結果はアピカルドメインの大規模な構造変化に GroEL の 2 つのリングが形成する「土台；基礎」が大変重要であることを示唆した。

3. ATP 加水分解活性

3 つ目の GroEL D398A 変異体では野生型と比べて観察される素過程の一部が消失する結果が得られていると当初考えられる結果を得た。ところが、より詳細な実験を行った結果、消失していると思われた構造変化は実はその速度が大幅に低下していることが明らかになった。GroEL D398A 変異体では ATP 加水分解活性が野生型の 2%、つまり 50 倍程度の速度低下を示すことが以前の実験で明らかになっていたため、ストップ・フロー解析で確認されたこの速度低下は ATP 加水分解活性の低下に起因するものと思われたが、さらなる実験の結果、この素過程の速度と GroEL D398A の ATP 加水分解速度は一致しなかったため、この速度低下は ATP 加水分解活性の律速段階を反映しないとおもわれた。加水分解されない ATP アナログを用い他実験などをさらに実施した結果、この過程は、398 番目のアミノ酸残基の近辺に存在する α ヘリックスが、GroEL に ATP が結合した後に配置する分子内イベントと深く関係することが明らかとなった。

以上のように、本研究では、3 種類の特徴的な変異体を用い、シャペロニン GroEL 構造変化に関連する新しい事実を明らかにし、シャペロニン GroEL の複雑な動的メカニズムについて新たな知見を得ることに成功した。

略号

- ADP : Adenosine 5'-diphosphate
Amp : Ampicillin Sodium
ATP : Adenosine 5'-triphosphate
BSA : Bovine Serum Albumin
DTT : Dithiothreitol
EDTA : Ethylenediamine-*N,N,N',N'*-tetraacetic Acid
FPLC : Fast Protein Liquid Chromatography
FRET : Fluorescence Resonance Energy Transfer
GFP : Green Fluorescent Protein
HEPES : 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic Acid
HPLC : High Performance Liquid Chromatography
HSP : Heat Shock Protein
MDH : Malate Dehydrogenase
MOPS : 3-Morpholinopropanesulfonic Acid
 β -NADH : β -Diphosphopyridine Nucleotide Disodium salt, Reduced form
OD : Optical Density
PCR : Polymerase Chain Reaction
PMSF : Phenylmethyl Sulfonyl Fluoride
SDS-PAGE : Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis
TEMED : *N,N,N',N'*-Tetramethylethylene Diamine

1. 序論

1-1. はじめに

タンパク質は生体内のあらゆる場所に存在し、生命活動を支える重要な物質である。タンパク質は 20 種類の天然 α アミノ酸を素材として成り立っており、これらのアミノ酸の重合による組み合わせでタンパク質は構成されている。タンパク質は、DNA を鋳型として転写されたメッセンジャーRNA の情報を元に、リボソーム及びトランスファーRNA により「ポリペプチド鎖」と呼ばれる一本の鎖として合成される。ポリペプチド鎖が機能を持ったタンパク質として生体内で作用するためには、正しい立体構造への折りたたみ（フォールディング）が行わなければならない。1957 年に Anfinsen らは、リボヌクレアーゼ A に尿素と還元剤を添加して変性させた後、透析により尿素と還元剤の濃度を薄めてもう一度適当な環境条件にすると、活性を示す立体構造に自発的に再び折りたたまれることを発見した。この実験では、尿素によりタンパク質の水素結合を切断、還元剤の 2-メルカプトエタノールによってジスルフィド結合を切断することで、リボソームによって翻訳直後のポリペプチド鎖の構造状態を模倣させている。この状態から再度折りたたみ（リフォールディング）が行われたことにより、リボソームから生まれた新生ポリペプチド鎖は、他の分子の補助を受けずに自発的に構造をとり、その構造は水中で最も熱力学的に安定な構造であると考えられた。この現象は、「Anfinsen のドグマ」と呼ばれ、1972 年にノーベル化学賞を受賞した¹。この実験は精製したタンパク質を用い、他の分子がほとんど存在しない低濃度条件下の実験であり、自発的なフォールディングは試験管内の一部の条件に限られることが分かってきた。一方、細胞内には様々な種類のタンパク質や核酸が 300~400 g/l という高濃度で存在し、様々な分子同士が絶えず相互作用している。新生ポリペプチドが正しくフォールディングする前に他のポリペプチド鎖に遭遇すると疎水性相互作用により会合凝集してしまい、正しくフォールディングされないといった問題がある²。この問題を回避するため、細胞中には分子シャペロンと総称されるタンパク質群が存在する。

1-2. 分子シャペロン

熱ショックによる細胞応答の研究は、1962年のRitossaらによる、ショウジョウバエに熱ショックを与えると唾液線染色体にふくらみが生じることの発見が起源とされている³。この実験により、熱ショックにより細胞内でmRNA誘導が生じ、それに伴い特定のタンパク質が過剰に発現していることが予測された。予測通り、1970年代には、熱ショックにより誘導されるHsp90, Hsp70, Hsp27などと呼ばれるタンパク質群が発見される。John Ellisはこれらの分子群を、「他のタンパク質の正しいフォールディングを仲介するがそれ自身は最終的に機能的構造の構成要素にはならないタンパク質ファミリー (heat shock proteins ; hsps)」として定義した⁴。分子シャペロンは熱ショックプロテイン (hsps) であり、正しい構造を持たない (ノンネイティブ) タンパク質と相互作用し、タンパク質のフォールディングにおける中間体を安定化させ、タンパク質の凝集を防ぐ。また、分子シャペロンは細胞内に豊富に存在するタンパク質ファミリーであり、通常の生育条件下において生育に不可欠な働きを担っている^{5,6}。そこで最近では、分子シャペロンとは、「異種タンパク質のネイティブ構造とは異なる不安定な配座異性体と結合して安定化し、フォールディング、オリゴマー会合、他の細胞機構要素との相互作用、細胞内輸送、あるいはタンパク質分解を単独かもしくは他の補因子の助けを借りて促進するタンパク質」と定義されている⁷。

分子シャペロンはその構造と機能、そして分子量の違いからいくつかのファミリーに分類されている。大腸菌内に発現する熱ショックプロテインであるシャペロニン GroEL は Hsp60 ファミリーに分類され、その補助シャペロニンである GroES は Hsp10 ファミリーに分類される。また、DnaK は Hsp70 ファミリー、ClpB は Hsp100 ファミリー、HtpG は Hsp90 ファミリー、Hsp27 は分子量 40 kDa 以下の低分子 Hsp ファミリー (sHSP) に分類されている。(表 1-1) 分子シャペロンは原核生物から真核生物まで広く保存されており、真核生物の小胞体には原核生物には見られない特異なシャペロンも存在する。シャペロニン (Hsp60, Hsp10 ファミリー) は構造の違いから、グループ I 型シャペロニン、グループ II 型シャペロニンに分類される。大腸菌 GroEL はグループ I 型シャペロニンに分類され、同一のサブユニットによる 14 量体

ホモオリゴマーで構成され、補因子の GroES を必要とする。一方、酵母細胞、動物細胞に存在する CCT はグループ II 型シャペロニンに分類され、8 種類のサブユニットがリング状に会合した 16 量体ヘテロオリゴマーで構成される。グループ I 型シャペロニンは補因子を必要とするが、CCT は補因子を必要とせず、単体でタンパク質のフォールディングを補助する⁸。

表 1-1. 大腸菌，酵母，動物細胞の主要な分子シャペロニン^{9,10}

	シャペロニン・システム			Hsp70システム		Hsp104	Hsp90	sHsp(Hsp27)
	Hsp60	Hsp10	Hsp70	Hsp40	ヌクレオチド交換因子			
大腸菌	GroEL	GroES	DnaK	DnaJ CbpA	GrpE	ClpB	HtpG	IbpA IbpB
酵母								
細胞質	CCT(TriC)		Ssa1~4 Ssb1~2	Ydj1 Sis1	Sn1p Fes1p	Hsp104	Hsp82 Hsc82	Hsp26 Hsp42
	小胞体		Kar2(Bip)	Sec63 Scj1				
ミトコンドリア	Hsp60	Hsp10	Sec1	Mdj1~2	Mge1	Hsp78		
動物細胞								
細胞質	CCT(TriC)		Hsp72 Hsc73	Hdj1			Hsp90 α Hsp90 β	α A-crystallin α B-crystallin
	小胞体		Bip(Grp78)	Mtj1			Grp94	
ミトコンドリア	Hsp60	Hsp10	Grp75	hTid1	mt-GrpE			

原核生物である大腸菌の細胞中では、タンパク質が正しくフォールディングするために様々な分子シャペロンが関与している。合成されたばかりのポリペプチド鎖はリボソームに結合した「トリガーファクター」という別の分子シャペロンによる補助を受ける。トリガーファクターは新生ポリペプチド鎖の疎水性残基を保護する役割やプロリルイソメラーゼ活性を持ち、リボソームの孔から出てきたポリペプチド鎖はこの疎水性残基を保護されながらフォールディングを開始する¹¹。約 70% のタンパク質がトリガーファクターと作用した後で、自発的にフォールディングが可能となる（図 1-2）。トリガーファクターの補助でフォールディングできないタンパク質は、次の段階として、DnaJ, DnaK などの Hsp70 システムが関与する。DnaJ, DnaK はタンパク

質分子の疎水性アミノ酸クラスターと選択的に結合して凝集を保護し, 5~18%のタンパク質がフォールディングされる。それでもまだフォールディングできないものは GroEL, GroES が関与し, 10~15%のタンパク質がフォールディングされる。

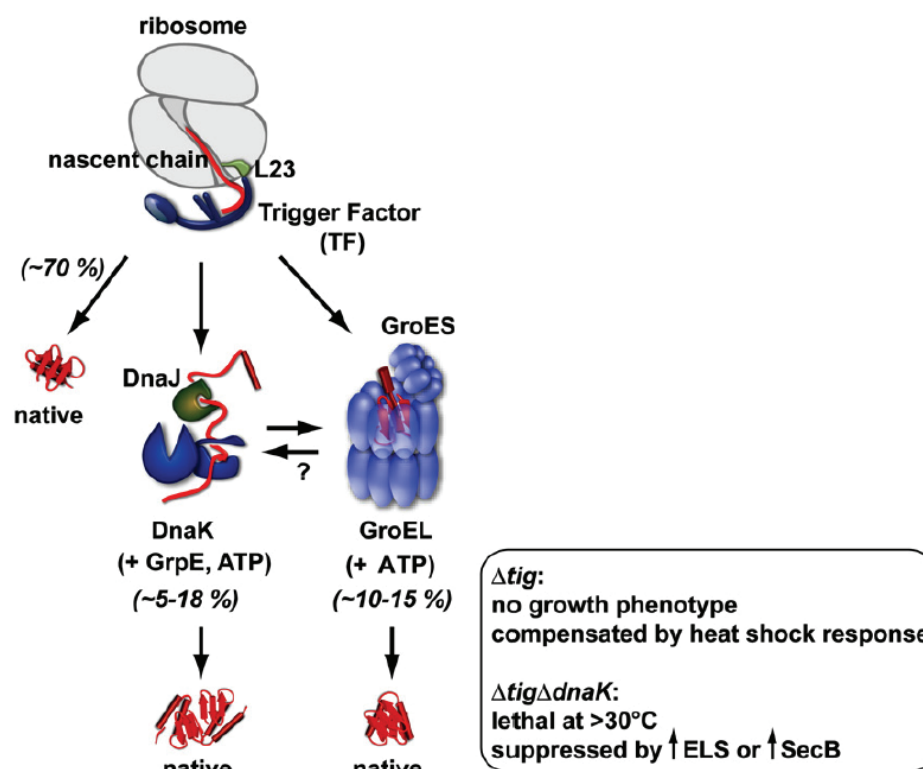


図 1-1. 大腸菌内でポリペプチド鎖がフォールディングする様子¹¹

リボソームにより合成されたポリペプチド鎖の 70%は, リボソームに結合した分子シャペロンのトリガーファクターに結合し, 自発的にフォールディングする。5-18%は HSP70 システム (DnaJ, DnaK, GrpE), 10-15%はシャペロニンシステム (GroEL, GroES) の補助によりフォールディングする。トリガーファクター遺伝子欠損 (Δtig) 大腸菌は表現系を示さず生育する。この変異に加えて, DnaK システム (DnaK, DnaJ, GrpE) を欠損 ($\Delta dnaK$) させると, 30°C 以上の条件のみ生育可能となる。タンパク質の安定化は GroEL と SecB の働きにより行われる。(SecB とは, 細胞質に存在する 16kDa のシャペロンタンパク質で, 合成後の分泌系タンパク質に結合し, 高次構造の形成を妨げる機能を保持している。)

タンパク質の進化は、原始タンパク質をベースとした変異と選択の繰り返しにより、新規機能を持つタンパク質が生じることによって押し進められる。アミノ酸変異が入ったタンパク質は構造が不安定になる場合が数多くあるが、そのようなタンパク質は分子シャペロンによって保護され、タンパク質の多様性に分子シャペロンが貢献しているといわれている。Tokuriki らは大腸菌内でランダムに変異を導入した酵素 (GAPDH) を導入し、GroEL-GroES の過剰発現の有無で、変異体の適応性を調査した。タンパク質の安定性とは、立体構造を持った天然状態のものと、立体構造を失った変性した状態の自由エネルギーの差 (ΔG) で表される。タンパク質は分子内の非共有結合により、数 kcal/mol~数十 kcal/mol で程度の安定性を保持している。GroEL-GroES を保持しない種で確認された変異体の不安定化エネルギーは 1 kcal/mol 程度であったのに対し、GroEL-GroES を過剰発現させたものは 3.5kcal/mol 程度であった。この研究により、GroEL-GroES は不安定化するタンパク質を安定化し、2.5 kcal/mol 程度の安定性の低下を緩衝していることが明らかとなった¹²。Hsp90 なども同様の機能があり、「進化的キャパシター」として働くことが知られている。酵母に Hsp90 (Hsp82) 機能阻害剤のラジシコールを与えると、染色体の異常が引き起こされる。それらの酵母を薬剤(ベノミル, フルコナゾール, ツニカマイシン)存在下に環境変化させると、Hsp90 阻害剤を与えなかった酵母は死滅したが、Hsp90 阻害剤を与えた株は薬剤環境に適応し、薬剤耐性を獲得した酵母が生まれることが確認されている¹³。遺伝子の変異が増加すると、変異タンパク質が蓄積されるが、それらの安定化はシャペロンが担い表現型にならずに潜在化している。環境の変化などでシャペロンの機能が低下した際に形態異常を持つ個体が現れ、環境に適応できる個体が生き残り、生物は進化してきたと考えられている。

以上のように、細胞内には多種多様な分子シャペロンが存在し、タンパク質の品質管理に重要な役割を果たしている。

1-3. シャペロニン GroEL-GroES

シャペロニン GroEL は大腸菌の生育に必須な分子シャペロンであり、変性タンパク質の凝集を抑制する。1989年に Lorimer らはリブローズビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ (Rubisco) を大腸菌内で活性を持った状態で発現させるためには、GroEL-GroES が必要であることを発見した¹⁴。同年、精製した Rubisco を変性剤で処理し、変性剤の濃度を低下させるだけでは Rubisco の活性は回復しないが、GroEL-GroES (ATP,Mg) 存在下で同様の実験を行うと、活性が回復することを発見した¹⁵。Lorimer らの研究により、GroEL は変性したタンパク質を特異的に結合し、ATP-Mg 依存的に、補助シャペロニンである GroES の協力のもと、変性タンパク質の非特異的凝集を抑えることで正しい折りたたみを補助することが明らかとなった。

1-3-1. シャペロニン GroEL の構造

大腸菌由来シャペロニン GroEL は、548 残基 (57,259 Da) から構成される同一の 7 個のサブユニットがリング状に会合し背中合わせに重なった合計 14 量体のダブルリング構造を形成している(図 1-2 左)。GroEL のサブユニットは、アピカルドメイン、エクアトリアルドメイン、インターミディエイトドメインの 3 つのドメインから構成される。また、GroES 7 量体が GroEL のアピカルドメインに結合し、GroEL-GroES セントラルキャビティを形成する(図 1-2 右)。このセントラルキャビティは、約 175,000 Å³ の容積を有し、理論的には 70 kDa 以上の球状タンパク質、またはより構造が拡がった状態のモルテングロビュール中間体さえも収容する能力を持っている¹⁶。研究の結果、GroEL はこのセントラルキャビティに変性タンパク質分子を「融離」することで非特異的な凝集を防いでいることが判明した。キャビティ内に収容される基質タンパク質の大半を 20 kDa から 60 kDa のタンパク質が占めており、 α/β ドメイン構造を持ったタンパク質が結合しやすいとされている¹⁷。GroEL-GroES キャビティでは、拡張されたキャビティの内側表面のほぼ全域に極性アミノ酸残基が存在する¹⁸。各ドメインの詳細な役割について、下記に示す。

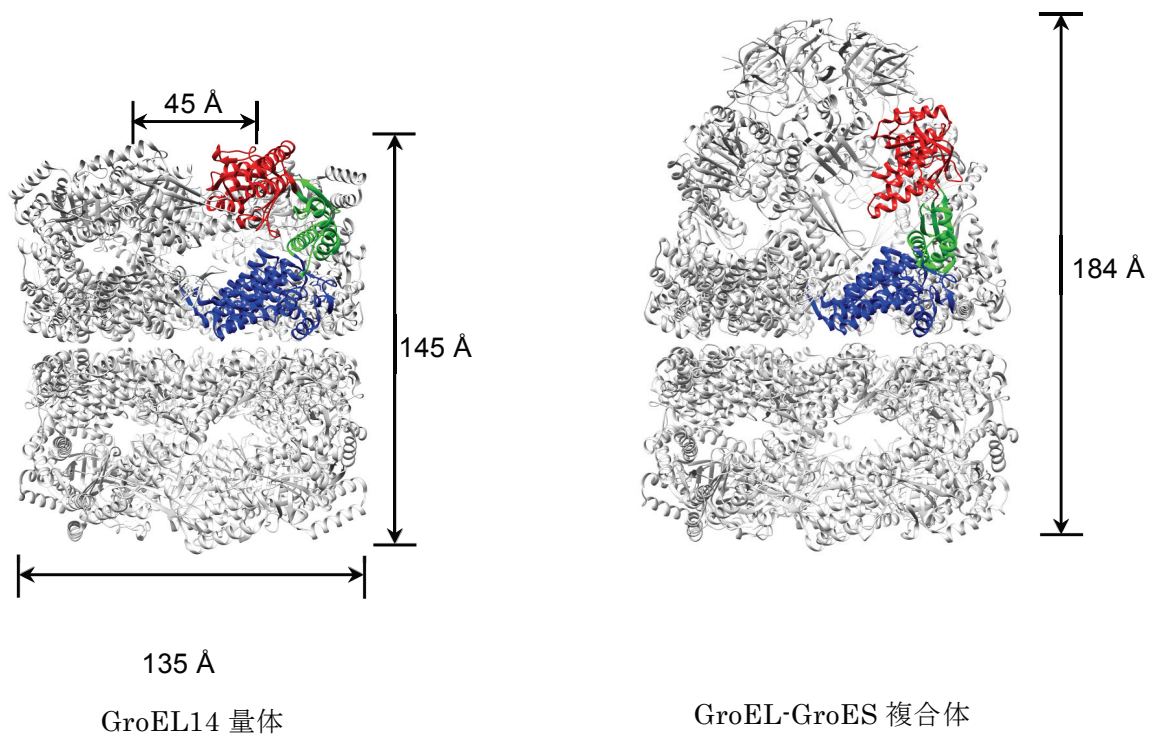


図 1-2. GroEL-GroES 複合体の構造

左の図は、GroEL14 量体。着色部分は GroEL サブユニットを表しており、赤色はアピカルドメイン、緑色はインターミディエイトドメイン、青色はエクアトリアルドメインを表している。GroEL の大きさは、高さ 145 Å、幅 135 Å、アピカルドメインが様式するリングには基質タンパク質が結合する 45 Å の孔が空いている。右の図は、GroEL-GroES 複合体を表しており、GroEL に GroES が結合することにより、全長は 184 Å 程度になる¹⁹。

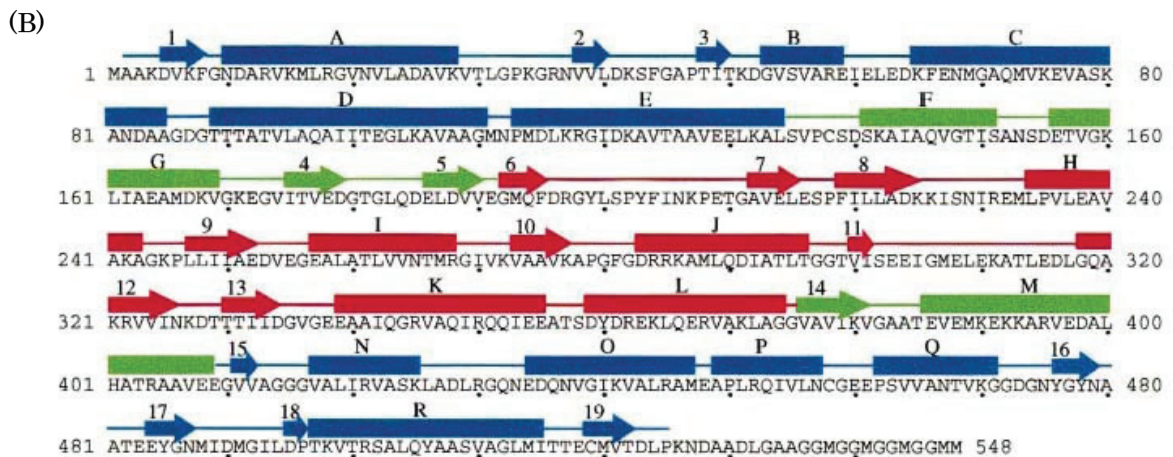
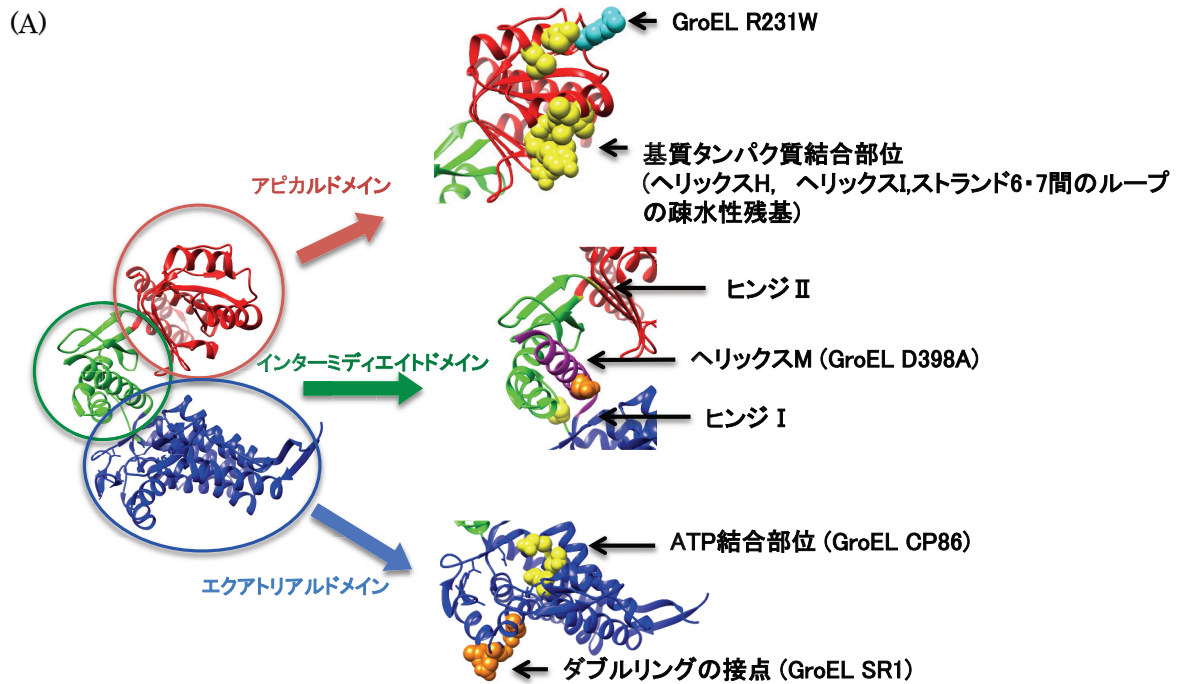


図 1-3. GroEL サブユニット構造及びアミノ酸配列

(A) GroEL のサブユニットを構成する 3 つのドメイン。(B) GroEL サブユニットのアミノ酸配列と二次構造。青色はエクアトリアルドメイン、緑色はインターメディアेटドメイン、赤色はアピカルドメイン。矢印のついた太線は α ヘリックス、太線は β シートを表している

・アピカルドメイン

アピカルドメイン (図 1-3 赤色, 191~376 アミノ酸残基) は GroEL オープンリングの頂上に位置し, 基質タンパク質, GroES が結合する。GroEL の基質結合部位は GroEL が 7 量体リング構造を形成する際のリングの入り口から内側付近に存在している。基質結合部位はストランド 6・7 間のループ (Tyr 199, Ser 201, Tyr 203, Phe 204), ヘリックス H (Leu 234, Leu 237), ヘリックス I (Leu 259, Val 263, Val 264) (図 1-3-A アピカルドメイン 黄色) に存在する。ノンネイティブポリペプチド鎖は疎水性残基が露出した状態にあるため, GroEL はこれらの疎水性残基を介して疎水性相互作用により基質タンパク質を認識し, 結合することが出来る¹⁶。基質タンパク質, GroES の結合や, ATP の加水分解に伴う反応により, 大きく立体構造が変化する。アピカルドメインの構造変化を観測するため, 当研究室の谷口氏により 231 番目のアルギニン残基 (図 1-3-A アピカルドメイン 水色) をトリプトファン残基に変異させた GroEL SR1-R231W が作製されており, GroES による ATP 加水分解活性の阻害効果や基質タンパク質のフォールディング活性などの機能解析が行われている²⁰。

・インターミディエイトドメイン

インターミディエイトドメイン (図 1-3 緑色, 134~190 及び 377~408 アミノ酸残基) はアピカルドメインとエクアトリアルドメインを繋ぐ柔軟性に富んだアミノ酸残基で構成された 2 つのヒンジ部位 (ヒンジ I : Pro 137, Gly 410, ヒンジ II : Gly 192, Gly 375) (図 1-3-A インターミディエイトドメイン 黄色) を含み蝶番の働きをして柔軟な構造変化をする。X 線結晶構造解析により, ヘリックス M (1-3-A インターミディエイトドメイン 紫色) の Asp398 (図 1-3-A インターミディエイトドメイン 橙色) は ADP の β -phosphate と Mg^{2+} との配位に作用することがわかっており, ATP の加水分解に必須である²¹。GroEL D398A は 398 番目のアスパラギン酸残基をアラニン残基に置換した変異体であり, 基質タンパク質や GroES, ATP に対しては通常通りの親和性を持ち, 結合することができるが, ATPase 活性が野生型の 2%程度と非常に低くなる性質がある^{22,23}。このため, ノンネイティブな基質タンパク質は GroEL

D398A-GroES-ATP 複合体によって一旦カプセル化されてフォールディングされるが、タンパク質の放出は抑制される²⁴。ヌクレオチド結合後の構造変化が非常にゆっくりと進むため、X線結晶構造解析や、クライオ電子顕微鏡を用いた構造解析に広く用いられている。

・エクアトリアルドメイン

エクアトリアルドメイン (図 1-3 青色, 6~133 及び 409~523 アミノ酸残基) は ATP を結合しリング間相互作用に関係する。GroEL の ATP 結合サイトはエクアトリアルドメインのヘリックス C - ヘリックス D 間の DGTTT 配列 (Asp 87 - Thr 91) (図 1-3-A エクアトリアルドメイン 黄色) に存在する。この結合サイトは ATP の β , γ リン酸と Mg^{2+} を結合する為に必須の残基である²¹。また, GroEL ダブルリング構造の主要な接点に, Arg452, Glu461, Ser463, Val464 の 4 残基 (図 1-3-A エクアトリアルドメイン 橙色) が存在する。これらを Arg452→Glu, Glu461→Ala, Ser463→Ala, Val464→Ala にそれぞれ変異させると 7 量体のシングルリング構造(SR1)を形成することが確認されている²⁵。シングルリング変異体 (SR1) は基質タンパク質を認識し, GroES と結合するが, トランスリング側のリングへの ATP の結合 によって制御される GroES 放出のシグナル伝達が消失しているため, GroES の解離が非常に起きにくくなっている。基質タンパク質はセントラルキャビティ内でネイティブ状態にフォールディングされ, このスペース内に留まる²⁶。

1-3-2. シャペロニン GroES の構造

GroES は、97 残基から構成される同一の 7 個のサブユニット (10,368 Da) がリング構造を形成した 7 量体リングを形成している。サブユニットは 9 個の β ストランドで構成され、ストランド 2 と 3 の間に非常に長いループ (Glu 16 - Ala 32) (図 1-4) を有している。このループ構造は “mobile loop” と呼ばれ、この領域の一部分を介して GroEL のアピカルドメインと結合する¹⁶。GroEL と結合する領域は、モービルループと呼ばれる非常に柔軟性に富む領域であり、疎水性残基 I25, V26, L27 を介してアピカルドメインのヘリックス H と I の間の残基 (L234, L237, V264) に結合している。

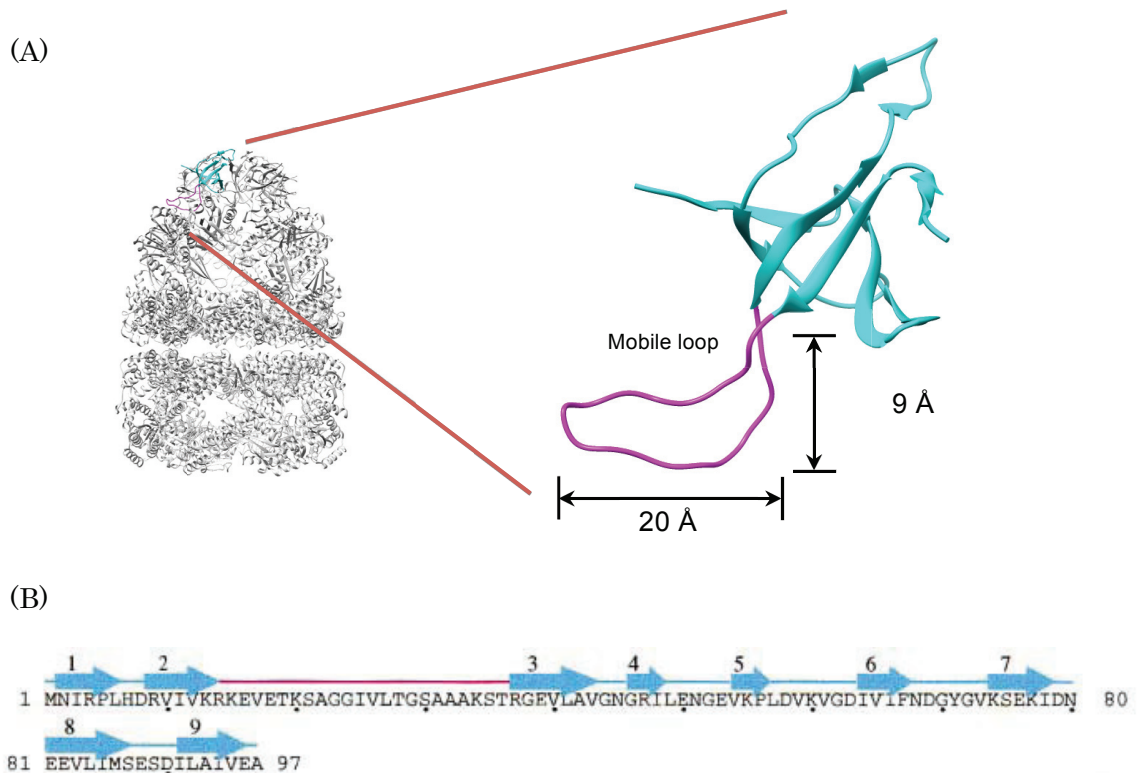


図 1-4. GroES サブユニット構造及びアミノ酸配列

(A) GroEL に結合した GroES のサブユニット構造。マゼンダは Mobile loop。(B) GroES サブユニットのアミノ酸配列と二次構造。矢印のついた太線は α ヘリックス、太線は β シート^{16,19}。

1-4. シャペロニン GroEL GroES の反応サイクル

GroEL-GroES は立体構造を駆使してタンパク質の凝集を抑え、フォールディングを補助する際に、以下のような手順からなる反応サイクルを用いて効果を発現していると考えられている。(図 1-5 A)。

(i) ノンネイティブ基質タンパク質がセントラルキャビティの内側の基質タンパク質結合部位に結合する。

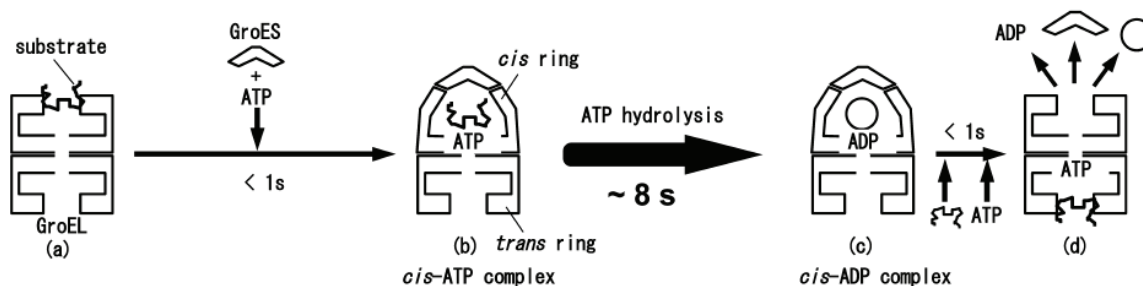
(ii) ポリペプチドを含んだ GroEL リングへの ATP の結合で GroES との結合が可能になり、同時にキャビティ内へのポリペプチドの解放が起きる (*cis*-ATP 複合体)。

(iii) 結合した ATP の加水分解 (*cis*-ADP 複合体) と続いて起こる GroEL (*trans*-ring) への ATP の結合で GroES が解放され、ネイティブ または 部分的にフォールディングされたタンパク質は GroEL からの解放が可能となる。最終的に *trans*-ring への ATP によって引き起こされる *cis*-ADP 複合体の解離は *trans*-ring への基質タンパク質の結合によって促進される²⁷。

以上が一般的な GroEL-GroES の反応サイクルである。このサイクルは 1 つの律速段階によって支配される (Single timer model)。現在はこのサイクルについての研究が進んでおり、*trans*-ring に結合した ATP が加水分解されるまでに 2 つの律速段階が存在することが GFP を基質として利用した蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) 法などによって提唱されている (Two timer model) (図 1-5. B)²⁸。

また、近年の研究によると野生型 GroEL と GroES が ATP 存在下でサイクルしているときにフットボール型複合体が弾丸型と同程度存在することが示されている。また、ADP/ATP 比が高いとフットボール形成が阻害されることも見出されている²⁹。さらに、ATP 加水分解能力が野生型の 2%程度の変異体 (GroEL D398A) に ATP 存在下で過剰の GroES を加えると両リングに GroES を結合したフットボール型複合体を安定に形成することが確認されている³⁰。さらに、酸化条件においてジスルフィド結合を形成し、オープンフォームで動作が停止する変異体 (GroEL A384C S509C [C all A]) を用いた実験においてもフットボール型複合体が確認されている³¹。

A. Single timer model



B. Two timer model

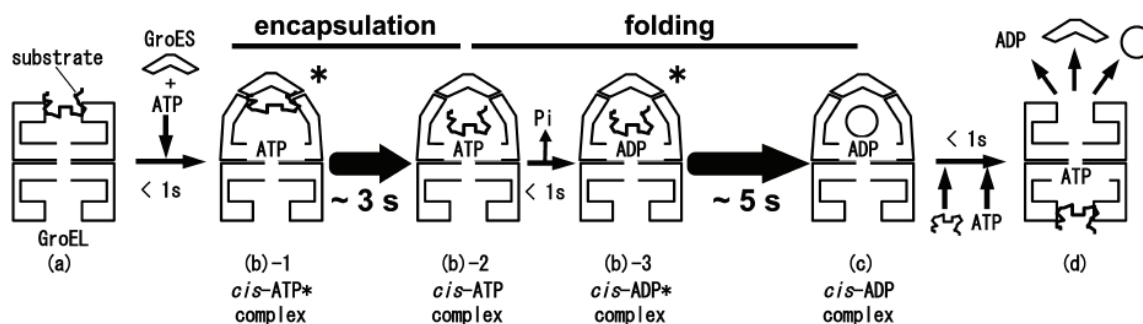


図 1-5. GroEL サイクルの Single timer model と Two timer model ³²

また、GroEL は ATP の結合の有無で T (Tense) 状態, R (Relaxed) 状態といった二種類のコンフォメーション変化を起こす。ATP が結合していない状態は T 状態であり、ヌクレオチドに対する親和性は低くノンネイティブタンパク質への親和性は高い。T 状態の GroEL に ATP が結合すると R 状態にシフトする。R 状態ではヌクレオチドとの親和性は高く基質との親和性は低くなる ³³。

1-5. GroEL の立体構造の遷移について

GroEL 及び GroES によるフォールディング反応は、GroEL の大規模な構造変化を伴うことが知られている。これまでに X 線結晶構造解析により、様々な GroEL の立体構造が解明されているが、近年のクライオ電子顕微鏡の技術により、構造遷移過程の立体構造が明らかとなっている。Clare らはクライオ電子顕微鏡を用いた研究により、ATP を結合した直後のシャペロニン(GroEL D398A)が形成する様々な微細構造を明らかにした³⁴。GroEL の構造変化は、Apo-GroEL に ATP が結合し、E255-K207, R197-E386 の塩橋が関与する Rs1 及び Rs2 へと構造が遷移し、E255-K207, R197-E386 の塩橋が外れた Rs-open へ遷移し、最終的に GroES との結合による構造変化の 5 つのステップで説明されることを示した。また、Apo-GroEL から Rs1 への構造変化は、アピカルドメイン及びインターミディエイトドメインがエクアトリアルドメイン を軸にして反時計回りに 35° 傾くが、ヘリックス M の再配置が構造変化に関与していることを示した。Rs-open への遷移でアピカルドメイン及びインターミディエイトドメインはキャビティの外側に 20° 傾き、GroES 結合の際にはアピカルドメインが時計回りに 100° 回転することで、基質タンパク質のキャビティ内への放出を促進すると考察した。GroEL の構造変化では、ヘリックス M の再配置が重要であり、GroEL D398A と ADP が結合した R 状態の立体構造はアピカルドメインの配置は対称性であるが、サブユニット間の塩橋(R197-E386)を壊した変異体(GroEL D83A/R197)はアピカルドメインの配置が非対称であることが示されている³⁵。また、GroEL と基質蛋白質 (Rubisco) との結合部位に化学修飾をした変異体 GroEL(EL43Py398A)を用いた構造解析においても、非対称性が確認されている³⁶。

GroEL が分子シャペロンとして機能するには大きな立体構造変化を伴うため、「ダイナミクス」の解析は極めて重要である。当研究室では、GroEL のドメインの中で最も構造変化の大きなアピカルドメインに蛍光ラベルを導入し、ストップト・フローによる解析を行っている (1-6)。また、GroEL は 3 つのドメインがそれぞれの役目を果たすことでシャペロニン機能を保持している。ドメイン間の繋がりに着目し、円順列変異法により作製した GroEL 円順列変異体を用い、機能解析を行っている (1-7)。

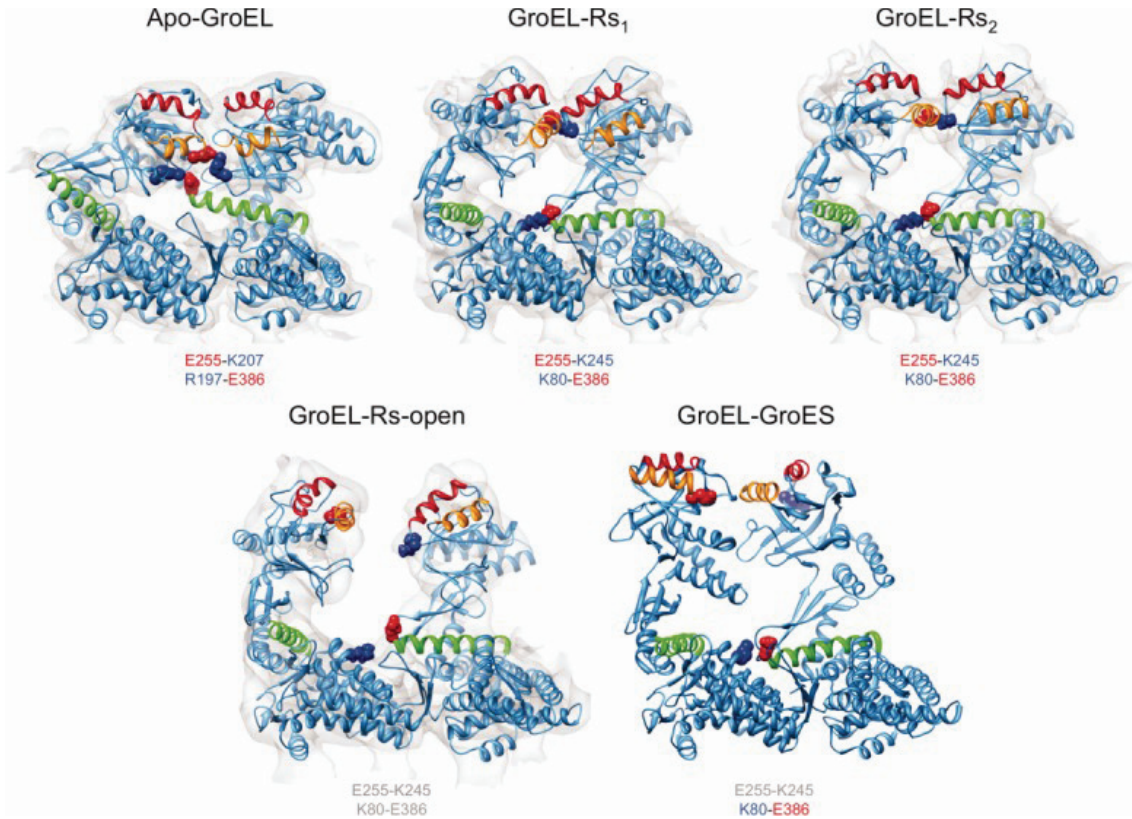


図 1-6. クライオ電子顕微鏡による GroEL の立体構造変化³⁴

Apo-GroEL に ATP が結合し, GroEL-Rs1→GroEL-Rs2→GroEL-Rs-open と構造が変化し, GroES の結合によって GroEL-GroES まで構造が変化する。赤色はヘリックス H, オレンジはヘリックス I, 緑色はヘリックス M, 図の下の赤色と青色のアミノ酸は塩橋を表している。

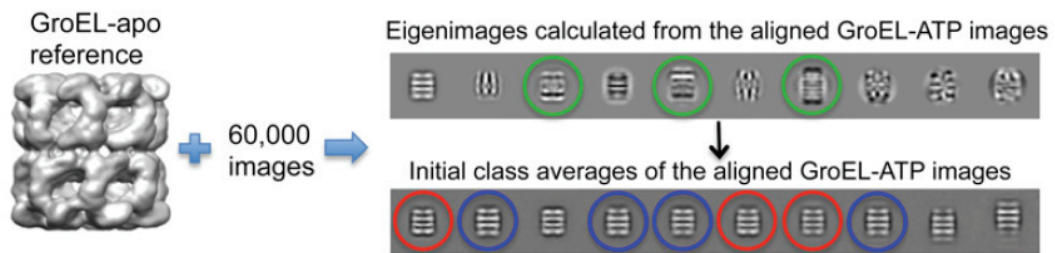


図 1-7. クライオ電子顕微鏡による GroEL の立体構造解析³⁴

電子顕微鏡によって得られた 60,000 のイメージ画像より, ATP の結合した GroEL の画像を抽出し, GroEL の X 線結晶構造を元に, 画像処理によって三次元の固有画像を作製する。

1-6. ストップト・フロー蛍光分析による構造解析

タンパク質の構造変化は、非常に速い過程を含み、反応開始後ミリ秒程度の時間領域での観測を必要とすることが多い。速い過程を含めて反応速度論を測定するために、様々な反応開始法が知られているが、その中の一つにストップト・フロー法がある。ストップト・フロー蛍光分析法は、ミリ秒程度の時間領域の反応を観測することが可能であり、非常に速い時間での動的構造変化の解析を行うことができる。タンパク質の蛍光測定においては、タンパク質の構成成分であるトリプトファン残基やチロシン残基が蛍光分子となる他、これらを持たないタンパク質においても、架橋反応により蛍光分子を結合することにより、構造変化を測定することが可能である。

GroEL, GroES によるタンパク質フォールディング反応において、数多くの構造変化が非常に速い速度で起こっている。変性状態の基質タンパク質や GroES との結合部位であるアピカルドメインの動きは分子機構において非常に重要であると考えられる。このドメインの大規模な動きを詳しく観測するために、当研究室の谷口氏がアピカルドメインに蛍光プローブを導入した変異体シャペロニン GroEL R231W を作製した。GroEL の 231 番目のアルギニン残基 をトリプトファン残基 に変異させた GroEL R231W は、野生型 GroEL (WT GroEL) と比べ、ATP 加水分解活性が約 1.5 倍と高いものの、GroES による ATP 加水分解活性の阻害効果は約 50% を示し、またシャペロニン活性においても WT GroEL と同等の機能を保持することが確認されている²⁰。この変異体導入部位は、GroES との結合や、標的となるタンパク質を認識するのに非常に重要であると考えられるヘリックス H と I を繋ぐループ間に存在するが、シャペロニンとしての機能への影響は最小限にとどめられたため、GroEL サブユニットの動的解析に適した変異体であった。

この変異体を用いて、蛍光ストップ・フロー法による速度論解析を行ったところ、3つの異なる蛍光強度変化が観測され³⁷、これらはATP結合によって引き起こされたアピカルドメインの構造変化であると考えられている。さらに、GroESの存在下でGroES結合を反映する蛍光強度変化も観測できることが明らかとなり、GroEL R231Wはアピカルドメインの構造変化と同時に、GroESの結合も捉えることができる変異体であることが確認されている³⁷。

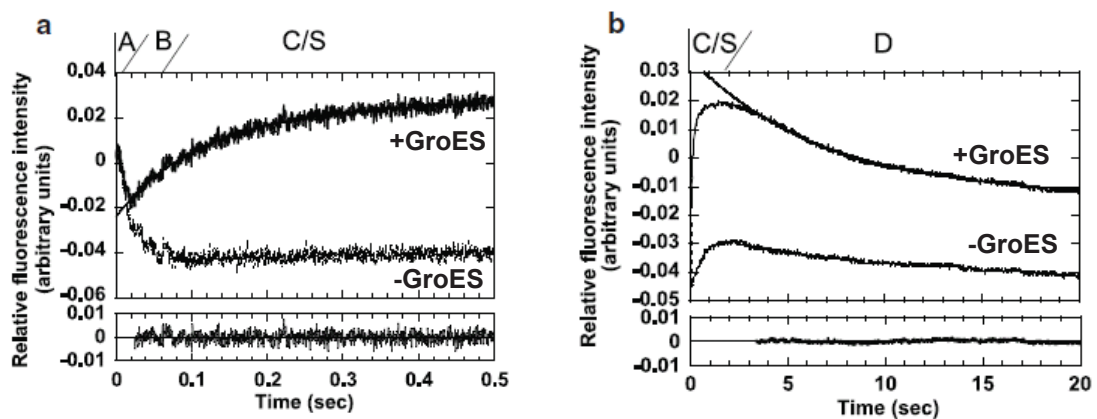


図 1-8. GroEL R231W のアピカルドメインの構造変化³⁷

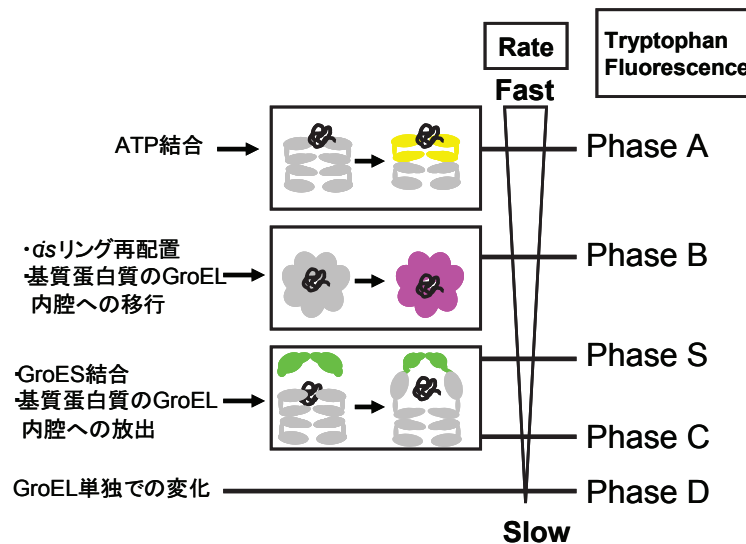


図 1-9. ストップ・フロー法によって観測された Phase と GroEL の構造遷移³⁷

1-7. 円順列解析法 (Circular Permutation)

円順列解析法 (Circular Permutation) は、N 末端と C 末端を適切なリンカーにより共有結合でつなぎ、環状ポリペプチドの一部を開裂させることによって新しい N 末端・C 末端を導入したポリペプチド鎖(円順列変異体)を創り出す方法である。GroEL の N 末端と C 末端は近接しているため、この手法が適応できると考えられる。この手法によりポリペプチド鎖のアミノ酸を別のアミノ酸に置換することなく、本来のアミノ酸配列を維持したままポリペプチド鎖の繋がりを変えることが可能となる。円順列変異体の機能解析を行うことにより、酵素活性に重要なアミノ酸配列領域、タンパク質のフォールディングに重要なアミノ酸配列領域を配列単位で解明ができると考えられる^{38,39}。Iwakura らは、ジヒドロ葉酸レダクターゼ (DHFR) をモデルタンパク質として用い、158 種類の網羅的な円順列置換変異体を作製した。すべての変異体について酵素活性および尿素変性における安定性を測定し、主鎖を切断した際にタンパク質が折りたたみ可能であるか調べた。その結果、安定な変異体を得られなかった部位および再生可能な封入体を得られなかった切断部位は、一次配列上特定の場所に偏在することなく連続したアミノ酸残基のまとまりとして分布し、アミノ酸配列上 10 箇所 (それぞれ 3-15 残基の連続した配列) に分かれて存在していることが分かった。また、二次構造要素とフォールディングに重要なアミノ酸配列との間の相関は小さいことがわかった。

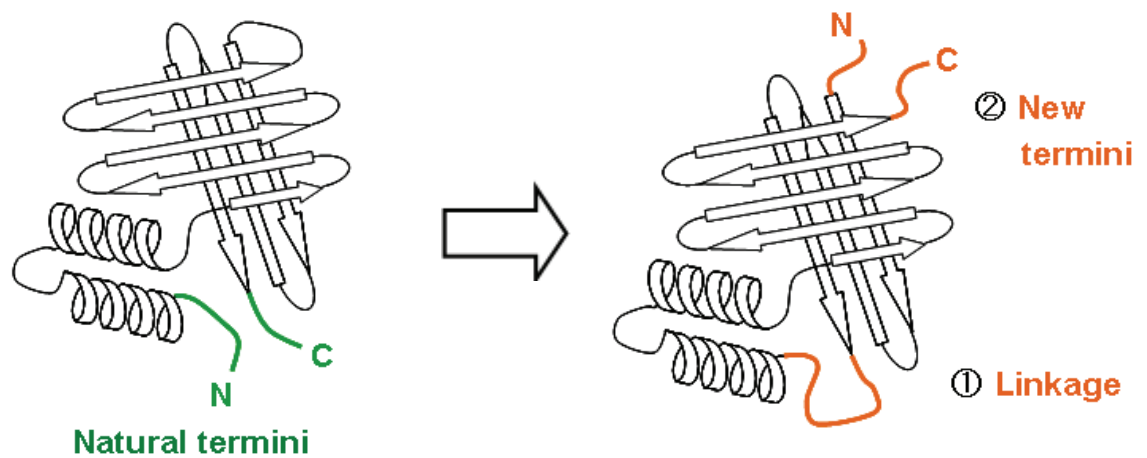


図 1-10.円順列解析法の模式図

通常、円順列変異法は、ポリペプチド鎖の全てのペプチド結合を1箇所ずつ順に切断していく方法であり、数百残基もあるようなタンパク質のペプチド結合を総括的に切断して調べるのは合理的ではない。この問題を解決するため、ランダム円順列解析法 (Random Circular Permutation) が考案された⁴⁰。Grafらはアスパラギン酸カルバモイルトランスフェラーゼ(ATCase)をモデルタンパク質としてランダムに円順列変異体を作成した。以下に具体的な実験手法を示す (図 1-11)。

- (i) 野生型タンパク質のコードされた N 末端と C 末端の遺伝子を適切なリンカー (GrafらはSGELDM) で繋ぎ、環状の遺伝子を作成する。
- (ii) DNase I /Mn²⁺ によりランダムに1ヵ所切断して直鎖化することにより、野生型とは異なる位置に新末端が導入された変異体遺伝子を作製する。
- (iii) DNase I により生じたニックやギャップを T4 DNA ligase, T4 DNA polymerase で修復後、適切な発現ベクターに挿入し、適当なスクリーニング法により安定なフォールディングが可能なタンパク質や活性を有するタンパク質変異体を得る。

この方法では目的遺伝子の特定の領域にターゲットを絞って変異体を作成することはできないが、一度に多くの変異体の作成を試みることができるといったメリットがある。そこで、当研究室の植村氏により、この手法が GroEL 遺伝子の変異に適応され、16 種類の GroEL 円順列変異体が作製された。新末端の導入は、各ドメインに均等に変異が分布しており、GroEL のドメイン間の繋がりに関して評価することが可能となった。これまでに、アピカルドメインのヘリックス H とヘリックス I の間に新末端が存在する GroEL CP254、インターメディアイトドメインとアピカルドメインのヒンジ部位に新末端が存在する GroEL CP376、エカトリアルドメインの ATP 結合部位付近に新末端が存在する GroEL CP86 の機能解析が行われている⁴¹。

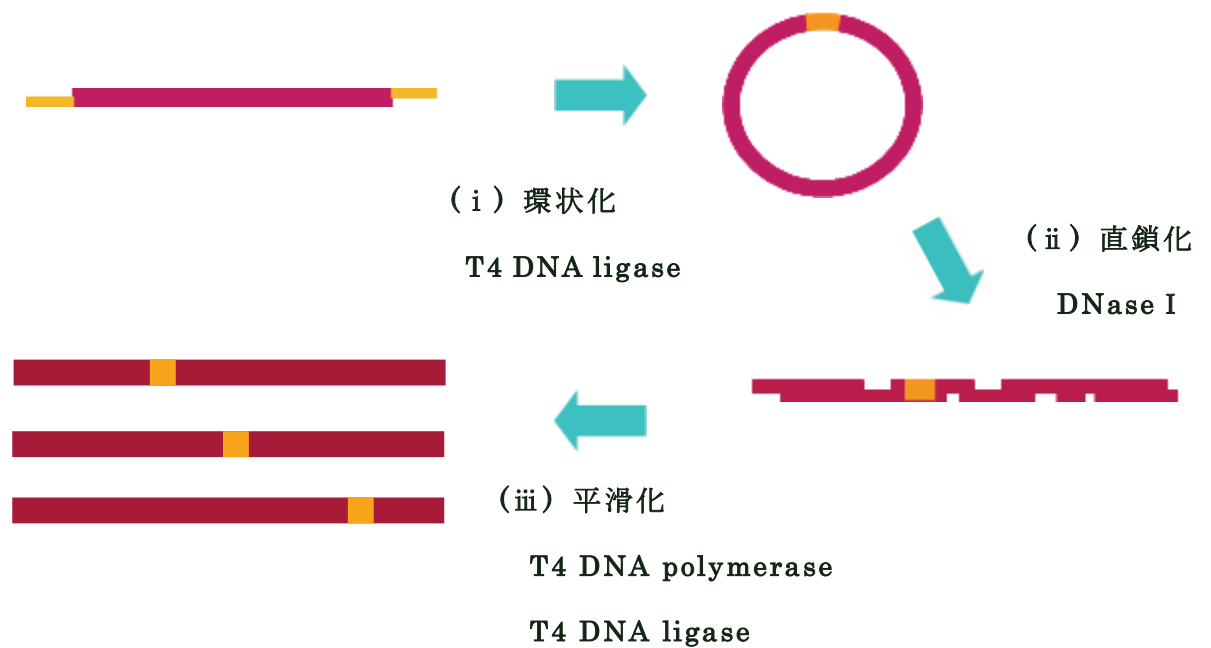


図 1-11. ランダム円順列変異の流れ

1-8. 本研究の目的

これまでに、我々の研究グループではアピカルドメインに存在する 231 番目のアルギニン残基をトリプトファンに置換した変異体 (GroEL RW) を用いたストップ・フロー蛍光分析により、GroEL に ATP 及び GroES が作用することで、5 つの素過程からなる構造変化を引き起こすことを確認している³⁷。しかしながら、これらの過程が GroEL サブユニットのどのような構造変化を反映しているかは詳細に解明されていない。そこで、本研究では、ストップ・フロー解析で同定された各過程の構造変化、機能的役割を解明することを目的とし、GroEL における「サブユニットを構成するドメイン間の繋がり」、「2 つのリングが形成する四次構造」、そして「ATP 加水分解活性」の各側面に注視した GroEL RW を出発点にして作成した新たな変異体のストップ・フロー蛍光分析を行った。また、Clare らがクライオ電子顕微鏡によって明らかにした 5 つの立体構造変化と比較して、ストップ・フローによって得られるアピカルドメインのシグナル変化について解明することを目的とした。「サブユニットを構成するドメイン間の繋がり」では、円順列変異体 GroEL CP86 を、「2 つのリングが形成する四次構造」では、シングルリング変異体 GroEL SR1 を、「ATP 加水分解活性」では、ATP 加水分解活性欠損変異体 GroEL D398A をそれぞれ用いた。

2. 材料と方法

2-1. 試薬と機器

培地

Agar powder . . . Wako

Ammonium Sulfate ((NH₄)₂SO₄) . . . Nacalai

Bacto Tryptone . . . DIFCO

Bacto Yeast Extract . . . DIFCO

Disodium Hydrogenphosphate (Na₂HPO₄) . . . Wako

Glycerol . . . Nacalai

Glycine . . . Wako

Lactose Monohydrate . . . Nacalai

Potassium Dihydrogenphosphate (KH₂PO₄) . . . Wako

Sodium Chloride (NaCl) . . . Wako

Buffer 関係

Acetic acid (CH₃COOH) . . . Wako

Adenosine 5'-triphosphate (ATP) . . . Oriental Yeast

Bovine Serum Albumin (BSA) . . . Wako

Dithiothreitol (DTT) . . . Wako

β -Diphosphopyridine Nucleotide Disodium salt, Reduced form (β -NADH) . . .

Wako

Ethylenediamine-*N,N,N',N'*-Tetraacetic Acid (EDTA · free acid) . . . Dojindo

Formaldehyde (HCHO) . . . Nacalai

Guanidine Hydrochloride (Gdn-HCl) . . . Wako

Glutathione Reduced Form . . . Sigma

L- Glutathione oxidized disodium salt . . . Sigma

2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic Acid (HEPES) . . . Dojindo

Hexaammonium Heptamolybdate Tetrahydrate . . . Wako

Iron(III) Nitrate ($\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$) . . . Nacalai

Isopropyl Acetate . . . Wako

Magnesium Chloride Hexahydrate ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) . . . Wako

Malachite Green Oxalate . . . Nacalai

Manganese(II) chloride Tetrahydrate ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) . . . Wako

2-Mercaptoethanol . . . Wako

3-Morpholinopropanesulfonic acid (MOPS) . . . Dojindo

Nitric acid (HNO_3) . . . Wako

Oxalacetic acid . . . Wako

Phenylmethylsulfonyl Fluoride (PMSF) . . . Wako

Potassium Chloride (KCl) . . . Nacalai

Potassium Cyanide (KCN) . . . Nacalai

Potassium Thiocyanate Solution (KSCN) . . . Wako

Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) . . . Nacalai

Sodium Hydroxide (NaOH) . . . Wako

Sodium Thiosulfate ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) . . . Wako

Streptomycin Sulfate . . . Wako

Trifluoroacetic Acid . . . Wako

Tris (Hydroxymethyl) aminomethane (Tris) . . . Wako

Triton X-100 . . . Nacalai

12 Tungsto(VI)silicic Acid 26-Water . . . Wako

Urea . . . Wako

DNA 操作関係

Agarose S . . . Wako

Agarose L . . . Wako

BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit Ver3.1 . . . Applied Biosystems

Ethanol . . . Wako

Isopropanol . . . Wako

illustra™ plasmid Prep Mini Spin Kit . . . GE Healthcare

QIAGEN QIAquick® Gel Extraction kit . . . QIAGEN

プライマー

Apical Bbe (+) : 5' - ATCAAAGTGGGTGCTGCTACCGAAGTT - 3'
(27 mer , Tm = 59.7°C)

Apical Aat (-) : 5' - ATACCTTCAACCACGTCCAGTTCGTCC - 3'
(27 mer , Tm = 61.3°C)

Seq 1140 (+) : 5' - TACCATCTCCGCTAACTCCGACGAAA - 3'
(26 mer , Tm = 59.5°C)

Seq 2255 (-) : 5' - ATCGTTTTTCGGCAGGTCGGTAACCA - 3'
(26 mer , Tm = 59.5°C)

ELD398A (+) : 5' - GCGTTGAAGATGCCCTGCACGCGA - 3'
(24 mer , Tm = 62.5°C)

ELD398A (-) : 5' -TCGCGTGCAGGGCATCTTCAACGCGTGCTT- 3'
(30 mer , Tm = 67.1°C)

R231W (+) : 5' - CCAACATCTGGGAAATGCTGCCGGTTC - 3'
(27 mer , Tm = 62.8°C)

R231W (-) : 5' - GCATTTCCCAGATGTTGGAGATTTTCT - 3'
(27 mer , Tm = 56.7°C)

M13 Reverse primer : 5' - ACACAGGAAACAGCTATGAC - 3'
(20 mer , Tm = 49.7°C)

M13 Universal primer : 5' - TTGTAACGACGGCCAGT - 3'
(19 mer , Tm = 48.9°C)

T7 promoter : 5' - TAATACGACTCACTATAGGG - 3'
(20 mer , Tm = 47.7°C)

T7 terminator : 5' - ATGCTAGTTATTGCTCAGCGG - 3'
(21 mer , Tm = 52.4°C)

pE TEL CP86 作成用プライマー

pE TEL 173 (+) : 5' - AAGCTTGCGGCCGCACTCGAGCA - 3'
(23 mer , Tm = 62.4°C)

pE TEL 192 (-) : 5' - GAATTCGGATCCGCGACCCATTTGC - 3'
(25 mer , Tm = 61.0°C)

pET-CP86 (+) : 5' - CTAGGATCCGAATTCTCCGCGCACGACACT - 3'
(30 mer , Tm = 65.7°C)

pET-CP86 (-) : 5' - AGGTGTTATTTAATTAGCCCCTGCAGTGCG - 3'
(31mer , Tm = 61.6°C)

※下線は In-Fusion ligation でベクターと相同な配列

pE TEL CP86 C4 作成用プライマー

CP86 A3C G4C (+) : 5' - ATGGCCTGCTGCGACGGTACCACCACTGCA - 3'
(30 mer , Tm = 68.5°C)

CP86 A3C G4C (-) : 5' - ACCGTCGCGCAGCAGGCCAT TATCTTTATTCC - 3'
(30 mer , Tm = 63.0°C)

CP86 A552C G553C (+) : 5' - ACGCTTGCTGCGCTAATTAAATAACACCTA - 3'
(30 mer , Tm = 58.9°C)

CP86 A552C G553C (-) : 5' - ATTAGCGCGCAGCAAGCGTCGTTTGCTTTAGA - 3'
(30 mer , Tm = 61.6°C)

※下線は変異導入部位

抗生物質

Ampicillin Sodium . . . Wako

基質蛋白質

Rhodanese (from bovine liver) . . . Sigma

Malate dehydrogenase (MDH : from pig heart) . . . Roche

κ -Casein (from bovine milk) . . . Sigma

カラム

RESOURCE-Q Anion Exchange Chromatography Column . . . GE Healthtcare

Superdex 200HR Gel Filtration Chromatography Column . . . GE Healthtcare

その他

Acrylamide . . . Wako

Bio-Rad Protein Assay Kit . . . Bio-Rad

Centricon YM100 . . . Millipore

N,N'-Methylene-bis-acrylamide . . . Wako

N,N,N',N'-Tetramethylethylene diamine (TEMED) . . . Wako

5-(((2-iodoacetyl)amino)ethyl)amino)naphthalene-1-sulfonic acid (1,5-IAEDANS) . . . invitrogen

Sequa-brene™ . . . Sigma

Amicon® Ultra . . . MILLIPORE

Amicon® Centricon . . . MILLIPORE

EnzCheck® Phosphate Assay Kit . . . invitrogen

使用機器

AKTA FPLC System (FPLC) . . . Amersham Biosciences

CHILLING/HEATING PLATE (ブロックヒーター) . . . FUNAKOSHI

CHIBITAN-II (遠心分離機) . . . MILLIPORE

FAS-II (トランスイルミネーター) . . . TOYOBO

FPLC system (FPLC) . . . Amersham Pharmacia

GeneAmp PCR System 9700 (PCR) . . . Applied Biosystems

GeneAmp PCR System 2400 (PCR) . . . Perkin Elmer

Gene SpecIII (分光光度計) . . . HITACHI

INCUBATOR SLI-450N (孵卵機) . . . EYELA THERMO

infinite M200 (プレートリーダー) . . . TECAN

Innova 4430 (振盪培養機) . . . NEW BRUNSWICK

J-820 spectropolarimeter (CD) . . . JASCO

JEM-1210 (透過型電子顕微鏡) . . . JEOL

KUBOTA 1920 (微量冷却遠心分離機) . . . KUBOTA

KUBOTA 6200 (高速冷却遠心分離機) . . . KUBOTA

KUBOTA 6500 (高速冷却遠心分離機) . . . KUBOTA

Mupid-2 plus (電気泳動) . . . ADVANCE

NanoVue (分光光度計) . . . GE Healthcare

NTT-1100 (恒温槽) . . . EYELA

PageRun (電気泳動) . . . ATTO

SX-20 stopped-flow Spectrophotometer (ストップト・フロー) . . . Applied
Photophysics

U-2000 Spectrophotometer (分光光度計) . . . HITACHI

V-630 Bio (分光光度計) . . . Jasco

Vibra cell (超音波破碎機) . . . Sonics & Materials INC

2-2. プラスミド単離

目的プラスミドの入った大腸菌のグリセロールストックを LB 液体培地 (Ampicillin 50 µg/ml) に植菌し, 37°C で Over night 振盪培養した。次にこの菌体を LB 寒天培地 (Ampicillin 50 µg/ml) に植菌し, 37°C で静置培養後, LB 液体培地 (Ampicillin 50 µg/ml) にシングルコロニー植菌を行い, 37°C で Over night 振盪培養した。この菌体を 3 ml 集菌し, illustra™ plasmid Prep Mini Spin kit を用いてプラスミドを単離した。プラスミドの溶出には TE Buffer を用いた。その後, NanoVue 又は Gene Spec を使用して 260 nm の吸光度を測定し, 溶液中のプラスミドの濃度を求めた。DNA の濃度計算は光路長 10 mm, 吸光度 1 のとき, 50 µg/ml となることを利用した。

[LB 培地]	[TE Buffer]
1.0% (w/v) Bacto Tryptone	10 mM Tris-HCl (pH8.0 at 25°C)
0.5% (w/v) Bacto Yeast Extract	1.0 mM EDTA
1.0% (w/v) NaCl	

2-3. アガロース電気泳動

アガロース S を 1.0 % になるように TAE Buffer に加え, 電子レンジで加熱しアガロースを完全に溶かした。人肌になるまで冷まし, エチジウムブロマイドを 0.1 µg/ml になるように加えゲル作製台に注ぎコームをさして固化した。固化したアガロースゲルを泳動槽にセットし, 泳動用の TAE Buffer を注ぎサンプルをゲルのウェルにアプライした。通電後, 目的とする BPB がゲルの 2/3 流れた時点で泳動をやめ, トランスイルミネーターを使用してバンドを確認した。

[TAE Buffer]

40 mM Tris-HCl (pH 8.0 at 25°C)

40 mM CH₃COOH

1.0 mM EDTA

2-4. 切り出し・DNA断片の精製

0.8 %アガロース Lにてアガロース電気泳動を行い、トランスイルミネーターを用いて目的のバンドを確認し、ナイフで目的のバンドを切り出した。エッペンドルフチューブに切り出したゲルを回収し、QIAGEN QIAquick® Gel Extraction kit を用いて DNA断片の精製を行った。その後、エタノール沈殿を行い、NanoVue 又は Gene Spec を使用して 260 nm の吸光度を測定し、溶液中の DNA 濃度を求めた。

2-5. 形質転換

プラスミド DNA をコンピテントセル 100 µl に加え、氷中で 30 分間インキュベートした。次に 42°C で 30 秒間保温することでヒートショックを行い、その後直ちに氷中に入れ、2 分間静置し、42°C に温めておいた 800 µl の SOC 培地を加え、37°C で 1 時間振盪した。培養溶液を LB 寒天培地 (Ampicillin 50 µg/ml) に塗布し、37°C で Overnight 培養した。

[SOC 培地 (pH 7.0)]

2.0 %(w/v) Bacto Tryptone

0.5 %(w/v) Bacto Yeast Extract

10 mM NaCl

2.5 mM KCl

10 mM MgCl₂

10 mM MgSO₄

20 mM Glucose

2-6. DNA Sequence

目的遺伝子の増幅は、BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit を用い、PCR によりの目的配列の増幅を行った。PCR 後、Milli-Q 水 10 μ l と 100%イソプロパノール 30 μ l を加え、ボルテックスミキサーで攪拌し、遮光後室温で 15 分間静置した。室温、14,000 rpm, 15 分間遠心し、遠心終了後に上清を除去した。室温 70 %エタノール 250 μ l を加え、軽く攪拌し、室温、14,000 rpm, 5 分間遠心して洗浄した。遠心終了後に上清を除去し、エタノールが除ける程度に乾燥させ、Milli-Q 水 20 μ l を加えてボルテックスした。遮光した状態で冷凍保存し、鳥取大学生命機能研究支援センターにシーケンス解析を依頼した。

2-7. GroEL R231W の作製

シャペロニン GroEL 変異体 R231W は、GroEL-GroES 発現プラスミド pUCESL を鋳型として、PCR を用いた overlap extension 法によって作製した。変異体のプラスミド pUCESL EL R231W をもちいて大腸菌 JM109 を形質転換し、DNA Sequencing により変異導入を確認した。

2-8. GroEL SR1-R231W の作製

シャペロニン GroEL 変異体 SR1-R231W は、東京大学の桑島邦博先生より供与して頂いた変異体 GroEL SR1 (図 1-3-A エクアトリアルドメイン 橙色) をコードしたプラスミド pEL-SR1 を鋳型として、QuikChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene) により作製した²⁵。変異体のプラスミド pEL-SR1-R231W をもちいて大腸菌 DH5 α を形質転換し、DNA Sequencing により変異導入を確認した。

2-9. GroEL D398A-R231W の作製

シャペロニン GroEL 変異体 D398A-R231W は, pUCESL/R231W を鋳型として, PCR を用いた overlap extension 法によって作製した。変異体のプラスミド pUCESL D398A-R231W をもちいて大腸菌 JM109 を形質転換し、DNA Sequencing により変異導入を確認した。

2-10. pETEL CP86 の作製(In-fusion Cloning)

pUCESL CP86 は植村氏がランダム円順列変異法によって作製した⁴¹。pUCESL CP86 は目的タンパク質(GroEL CP86)の発現量が少なかったため, 目的遺伝子を IPTG によって発現誘導可能な pET ベクターに導入した。In-fusion クローニングシステムは, ベクター, インサート断片の末端 15 塩基が相同であれば, In-Fusion 酵素がそれらの DNA 断片をシームレスに融合する。以下の反応組成, 反応条件でベクター, インサートを増幅後, 切り出し, DNA 断片の精製を行った。その後, In-Fusion® Advantage PCR Cloning Kit を用いて In-fusion クローニングを行った。

In-fusion 反応後, 反応液を TE buffer で 5 倍希釈し, 希釈反応液 10 μ l を用いて JM109 (DE3) (100 μ l) を形質転換し、DNA Sequencing により変異導入を確認した。

2-11. GroEL CP86 C4 (GroEL CP86 A3C G4C A552C G553C) の作製


GroEL CP86 の N 末端, C 末端にシステイン残基を導入し, ジスルフィド結合の形成による末端部位の結合を目指した。変異導入部位は, 野生型の 85 番目, 86 番目に相当するアミノ酸をシステインに置換し, その一つ外側のアミノ酸残基もシステインに置換した。pETEL CP86 を鋳型にして, PCR を用いた overlap extension 法によって作成した。

GroEL CP86

N 末端側 C 末端側

...D A A G A N M A A G D G T T T A T... ※ 緑は ATP の β , γ リン酸と Mg^{2+} を結合するのに必須な配列

... 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 ... (野生型に相当するアミノ酸残基)



GroEL CP86 C4 (GroEL CP86 A3C G4C A552C G553C)

N 末端側 C 末端側

...D A C C A N M A C C D G T T T A T... ※ 緑は ATP の β , γ リン酸と Mg^{2+} を結合するのに必須な配列

... 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 ... (野生型に相当するアミノ酸残基)

2-12. GroEL CP86-R231W の作製

シャペロニン GroEL 変異体 GroEL CP86/R231W は、pETEL CP86 を鋳型として、PCR を用いた overlap extension 法によって作製した。変異体のプラスミド pETEL CP86/R231W をもちいて大腸菌 JM109(DE3) を形質転換し、DNA Sequencing により変異導入を確認した。

2-13. タンパク質定量

5 倍希釈した Bio-Rad 社製 Protein Assay 溶液を検量線作製用試験管 6 本とサンプルの濃度測定用の試験管に各 2 ml ずつ分注した。検量線用の試験管に濃度の BSA (0.5 mg/ml) と Milli-Q 水を次のように加え、検量線を作製した。

濃度 (mg/ml)	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
BSA (ul)	0.0	8.0	16	24	32	40
Milli-Q (ul)	40	32	24	16	8.0	0.0

次にサンプルを適宜希釈して 0~0.5 mg/ml の範囲に収まるように Protein Assay 溶液に加え、サンプル全量が 40 μ l になるように Milli-Q 水を加えた。次に 595 nm での吸光度を測定し、比色定量により濃度を求めた。

2-14. 大量培養

LB 培地(Glycerol 添加)又は Auto Induction 培地 (ZYP-5052) ⁴²を用い、大量培養を行った。全ての培養は 37°Cで行った。培地組成ならびに手順を以下に示した。

ZY 培地

1.0% (w/v) Bacto Trypton

0.5% (w/v) Bacto Yeast Extract

20×P

1 M Na₂HPO₄

1 M KH₂PO₄

0.5 M (NH₄)₂SO₄

50×5052

25% (w/v) Glycerol

2.5% (w/v) Glucose

10% (w/v) β -lactose monohydrate

あらかじめ 20×P, 50×5052 を作製し、どちらも非常に解けにくいので、湯煎で解かし、これらをオートクレーブした。20×P, および 50×5052 を各組成の終濃度がそれぞれ 50 mM Na₂HPO₄, 50 mM KH₂PO₄, 25 mM (NH₄)₂SO₄, 0.5% Glycerol, 0.05% Glucose, 0.2% β -lactose monohydrate になるよう ZY 培地に添加し 1L バッフル付きフラスコ 各 300 mL に分注し、オートクレーブした。培地 300 mL に対して 20×P は 15 mL, 50×5052 は 6 mL が添加されている。オートクレーブ後、1 M MgCl₂を終濃度 2 mM, Ampicillin を 50 μ g/mL になるように添加した。

[LB 培地 (Glycerol 添加) (pH 7.4)]

Polypepton 1.0 %

Yeast Extract 0.5 %

NaCl 1.0 %

Glycerol 0.1 %

菌体は形質転換後, LB/Amp プレートで Over night 静置培養した。シングルコロニーを単離し, 5 ml の LB 培地 (試験管) に植菌し, OD₆₀₀≒0.8 になるまで振盪培養した。次に 300 ml の Auto Induction 培地又は LB 培地 (Glycerol 添加) に培養溶液 300 μl を植菌し, Auto Induction 培地 : 15h, LB 培地 (Glycerol 添加) : 12 h 振盪培養した。培養終了後, 8000 rpm, 20 min, 4°C で遠心分離により集菌した。

2-15. GroEL (野生型, 各種変異体) の精製

GroEL 精製を行うために, FPLC を用いて Superdex 200HR によるゲルろ過クロマトグラフィー, 続いて Resource-Q による陰イオン交換クロマトグラフィー (NaCl, KCl) を行った。精製に用いた Buffer と手順を以下に示した。

—使用 Buffer—

[Tris Buffer]

50 mM Tris-HCl (pH 7.8 at 4°C)

2 mM EDTA

2 mM DTT

100 mM NaCl

[ゲルろ過クロマトグラフィー用 Buffer]

50 mM Tris-HCl (pH 7.8 at 4°C)

2 mM EDTA

2 mM DTT

100 mM NaCl

[陰イオン交換クロマトグラフィー用 Buffer]

50 mM Tris-HCl (pH 7.8 at 4°C)

2 mM EDTA

2 mM DTT

100 mM NaCl or 1 M NaCl

(または, 100 mM KCl or 1 M KCl)

[透析用 Buffer]

50 mM Tris-HCl (pH 7.8 at 4°C)

2 mM EDTA

2 mM DTT

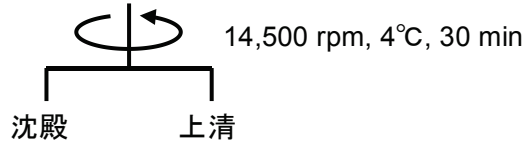
1. 集菌した菌体を 10 倍量 (w/v) の Tris Buffer に懸濁し, これに 1/100 量のリゾチームを加え 37°C, 30 min インキュベート後, 室温で 30 min 攪拌した。次に氷中で 1 h 攪拌し, 超音波破碎機を用いて菌体破碎を行った。遠心分離 (14,500 rpm, 30 min, 4°C) により沈殿物を除去し, 上清画分を回収した。
2. 菌体破碎後の上清画分に同体積の 5 % ストレプトマイシン溶液をゆっくりと滴下し氷中で 1 h 攪拌して除核酸を行った。攪拌後, 遠心分離 (14,500 rpm, 30 min, 4°C) により沈殿した核酸を除去し, 上清画分を回収した。
3. 除核酸後の上清画分に, 氷中で攪拌しながら硫酸アンモニウムを終濃度 55 % になるまでゆっくりと添加し, 添加後さらに 1 h 攪拌した。攪拌後, 遠心分離 (14,500 rpm, 30 min, 4°C) により沈殿画分を得た。
4. この沈殿画分を適量の Tris buffer に溶解し, 遠心分離 (14,500 rpm, 30 min, 4°C) により沈殿した変性蛋白質を除去し, 上清画分を回収した。これを FPLC に設置したゲルろ過クロマトグラフィー (superdex 200HR) にアプライした。ピーク画分を SDS-PAGE で確認し, GroEL が溶出した画分を回収した。
5. 回収した各画分を FPLC に設置した陰イオン交換クロマトグラフィー (Resource-Q) にアプライした。GroEL WT は 0.1–0.55 M を 15 カラム体積分 (90 ml), GroEL CP86 は 0.1–0.46 M を 15 カラム体積分 (90 ml) のグラジエントで溶出した。ピーク画分を SDS-PAGE で確認し, GroEL が溶出した画分を回収した。

6. 透析用 buffer で一晩透析を行い，透析後 Protein Assay Kit を用いて蛋白定量を行った。その後，SDS-PAGE により精製標品の確認を行った。
7. 陰イオン交換クロマトグラフィー後，精製標品の純度を高くする場合はアセトン沈殿を行った。GroEL(約 6mg/ml)を攪拌しながらアセトンを終濃度 45%になるまで氷中でゆっくりと添加し，氷中で 5 min インキュベートした。攪拌後，遠心分離(13,000 rpm, 30 min, 4℃)により沈殿した変性蛋白質を除去し，上清画分を回収した。遠心分離後，上清，沈殿を SDS-PAGE によって確認した。

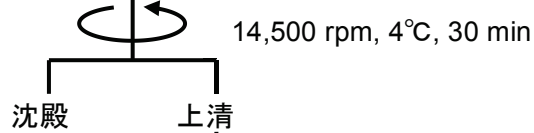
精製の流れ (GroEL)

(1 L バッフル付き三角フラスコ, 37°C, 120 rpm innova)

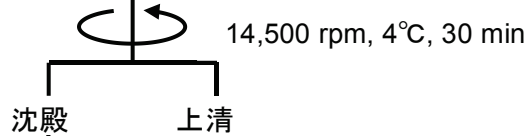
← 全量が湿菌体重量の10倍量になるよう, Tris Bufferで懸濁
菌体破碎 (Amplitude 60, Pulser 1, 30 min, on ice)



除核酸 (終濃度2.5% ストレプトマイシン) ←スターラーで1時間攪拌



硫酸分画 (55%硫酸アンモニウム飽和) ←スターラーで1時間攪拌



← 少量のTris bufferに溶解

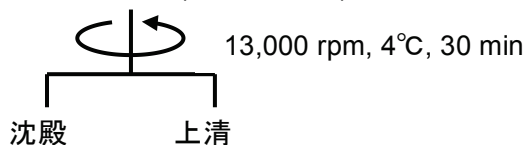
ゲルろ過クロマトグラフィー (Superdex 200HR 10/30)

陰イオン交換クロマトグラフィー (RESOURCE Q) 0.1~0.55 M NaCl

透析 (Dialysis membrane size 20)

濃縮 (Amicon Ultra, 50,000 MWCO)

アセトン沈殿(45%アセトン)



透析 (Dialysis membrane size 20)

濃縮 (Amicon Ultra, 50,000 MWCO)

2-16. GroEL CP86 C4 の酸化処理

還元条件で精製した GroEL CP86 C4 を ATP 依存下でジスルフィド結合の形成を促した。精製後のサンプルを以下の反応組成で 37°C, 1h インキュベートし, 透析にて ATP, グルタチオンを除去した。透析後のサンプルを「酸化サンプル」, 還元状態を維持し, 未処理のものを「還元サンプル」とした。

[ATPase 用 Buffer]

50 mM Tris-HCl (pH 7.8 at 37°C)

10 mM Mg(CH₃COO)₂

20 mM KCl

1 mM EDTA

5 mM GSSG

1 mM GSH

2 mM ATP

[透析用 Buffer]

50 mM Tris-HCl (pH 7.8 at 4°C)

2 mM EDTA

2-17. ATPase 活性測定 (モリブデンブルー法)

マラカイトグリーンは酸性条件下で無機リン酸と緑色の複合体を形成する⁴³。GroEL が ATP の加水分解により遊離したリン酸イオンを定量することで、ATPase 活性を測定した。ATPase 活性は、25°C または 37°C において測定を行った。緩衝液組成・反応液組成・測定手順を以下に示した。

[比色検定に用いた試薬]

[A 溶液] 0.045 % Malachite Green

[B 溶液] 4.2 % Hexaammonium Heptamolybdate Tetrahydrate in 4 N HCl

[C 溶液] Triton X-100

[D 溶液] 34 % Sodium Citrate Dihydrate

[ATPase 用 Buffer]

50 mM Tris-HCl (pH 7.8 at 25°C or 37°C)

10 mM Mg(CH₃COO)₂

20 mM KCl

2 mM DTT (還元条件)

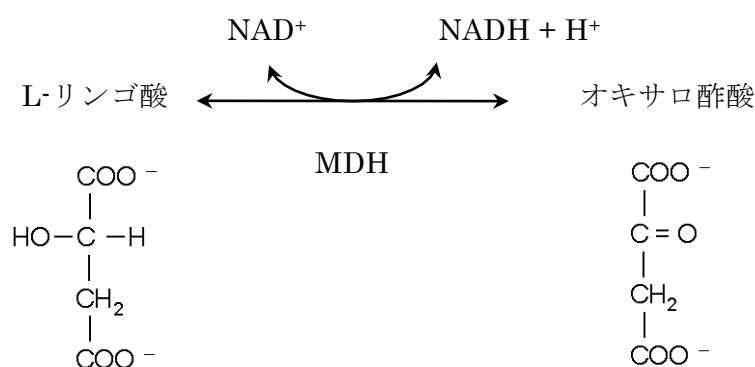
発色溶液は A 溶液と B 溶液を 3:1 の割合で混合し、遮光して 20 分以上攪拌した後、混合溶液の 1000 分の 1 量の C 溶液を添加し 10 分以上攪拌後 whatman ろ紙 No.5 で遮光しながらろ過し調製した。

1 μ M に調製した GroEL または GroEL-GroES を含む反応溶液を 10 min, 25°C または 37°C でインキュベートした。次に ATP が終濃度 2 mM になるように添加し、これを 0 min として反応を開始した。反応開始から 10 min おきに反応溶液から 50 μ l とり、7%過塩素酸溶液 550 μ l と混合し攪拌して反応を停止、氷中保存した。全てのサンプルを採取し終えた後 30 min 氷中でインキュベートし、これを遠心(15000 rpm, 10 min, 4°C) して反応溶液中の蛋白質を除去した。得られた上清 50 μ l を発色溶液 800 μ l に加えて攪拌し、1 min 後に D 溶液 100 μ l を加えて攪拌した後遮光して 30 min インキュベートした。その後、それぞれのサンプルについて 660 nm における吸光度を測定し、標準リン酸溶液を用いて作製した検量線から濃度を算出した。結果で示すデータは、GroEL の関与していない、ATP の自発的な加水分解によって生じた遊離リン酸の量を差し引いた値を記した。

2-18. MDH リフォールディング活性測定

GroEL WT, 各 GroEL 変異体のシャペロニン活性を測定するために, Malate dehydrogenase : リンゴ酸デヒドロゲナーゼ (二量体 : 約 70 kDa) のリフォールディング活性測定を行った⁴⁴。

MDH は以下の反応を触媒する。



MDH は L-リンゴ酸を基質としてオキサロ酢酸と NADH を生成する反応を触媒するが, 平衡はリンゴ酸生成に偏っているため, オキサロ酢酸の過剰存在下における NADH の減少を 340 nm の吸光度を測定することによって MDH の酵素活性を定量することができる。コントロールとして GroEL WT も同時に測定した。リフォールディング Buffer の組成を以下に示す。

[リフォールディング Buffer 組成]

30 mM MOPS-KOH (pH 7.4 at 25°C)

10 mM KCl

10 mM Mg(CH₃COO)₂

[Assay Buffer 組成]

100 mM Tris-HCl (pH 7.8 at 25°C)

1.67 mM オキサロ酢酸

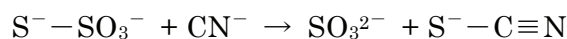
0.254 mM β -NADH

8 M Gdn-HCl を添加し 37°C で 30 min 変性させた MDH 溶液を、予め 0.5 μ M に調製しておいた GroEL または GroEL-GroES を含むリフォールディング Buffer に、最終濃度が 0.5 μ M となるように添加し 25°C で反応を開始した。直ちに反応溶液から 50 μ l 採取し、Assay Buffer 1.45 ml に添加して 340 nm での吸光度により NADH の減少量を 1 min 継続して測定した。これを 0 min とし、5 min 後に ATP (2.0 mM, 0.5 mM) を添加し、以降、反応開始から 10 min 毎にサンプリングを行った。結果で示すデータは、ネイティブ MDH の活性を 100 として活性回復率を百分率で記した。

2-19. Rhodanese リフォールディング活性測定

GroEL WT, 各 GroEL 変異体のシャペロニン活性を測定するために、Rhodanese (単量体: 約 33 kDa) のリフォールディング活性測定を行った⁴⁵。

Rhodanese は次のような反応を触媒する。



チオシアン酸 ($\text{S}^- - \text{C}\equiv\text{N}$) は、さらに KSCN となる。KSCN は 460 nm に吸収を持つので、溶液の 460 nm における吸光度を測定する事で KSCN の存在量を求めることが出来る。Rhodanese Refolding Assay は、6 M Gdn-HCl を用いて変性させた Rhodanese を GroEL 存在下でリフォールディングさせ、基質を含む溶液中で反応させた後、KSCN の量を測定することでロダナーゼの活性回復率の指標とした。コントロール

ールとして GroEL WT も同時に測定した。以下に活性溶液，発色溶液，リフォールディング Buffer の組成を示す。

[発色溶液組成]	[活性溶液組成]
HCHO 1.61 %	9.8 mg/ml KCN
Fe(NO ₃) ₃ 0.87 %	50 mM Na ₂ S ₂ O ₃
HNO ₃ 1.13 %	40 mM KH ₂ PO ₄

[リフォールディング Buffer 組成]

Non- permissive Buffer

30 mM Tris-HCl (pH 7.2 at 25°C)

50 mM KCl

10 mM Mg(CH₃COO)₂

Rhodanese を終濃度 6 M Gdn-HCl で 25°C，1 h 変性させ，予め 0.69 μM に調製しておいた GroEL または GroEL/GroES オリゴマーを含むリフォールディング Buffer に，終濃度が 0.46 μM となるように添加し 25°C で反応を開始した。5 min 後に ATP を終濃度 2 mM となるように添加した。反応開始から 10 min おきに，反応溶液から 50 μl 採取し活性溶液 250 μl と混合して 25°C で 9 min インキュベートした。次にこの溶液 200 μl と発色溶液 2 ml と混合して 25°C で 11.5 min インキュベートした。この時点での 460 nm における吸光度を測定し，標準 KSCN 溶液を用いて作製した検量線から濃度を算出した。結果で示すデータは，ネイティブのロダナーゼの活性を 100 とし活性回復率を百分率で記した。

2-20. CD 測定

GroEL WT と各 GroEL 変異体の二次構造を調べるために、CD 測定を行った。

[測定溶液組成]

50 mM Tris-HCl (pH 7.8 at 25°C)

50 µg/ml GroEL

[測定機器及び測定条件]

測定機器 : JASCO – J-820 spectropolarimeter

光路長 : 1 mm

測定時温度 : 25°C

測定波長 : 222 nm

2-21. Gdn-HCl に対する構造安定性測定実験

GroEL CP86, CP86 C4 の構造安定性について調べるため、Gdn-HCl による変性曲線を作成した。測定方法としては、チロシン蛍光と CD の 2 種類の測定方法で行った。チロシンの蛍光はチロシン側鎖が溶媒にさらされていない、つまり立体構造が形成されて中に埋もれていると強度が高く、逆に立体構造が崩れてきてチロシン側鎖が溶媒に露出してくると強度が低くなる。この強度変化を測定することで GroEL の変性を知ることが出来る。また CD 測定では蛋白質全体の二次構造の変化を知ることが出来る。GroEL は全体的に α ヘリックス構造に富んでいるため、 α ヘリックスの典型的なシグナルである波長 222 nm 付近での負の極大値の減少度を測定することで GroEL の変性を知ることが出来る。

[構造安定性測定用 buffer 組成]

10 mM HEPES-KOH (pH 7.8 at 25°C)

10 mM KCl

5 mM Mg(CH₃COO)₂

0.1 mM DTT

[測定機器及び測定条件]

〈蛍光〉

測定機器 : JASCO FP-6300

光路長 : 10 mm

測定時温度 : 25°C

励起波長 : 278 nm

測定波長 : 308 nm

〈CD〉

測定機器 : JASCO – J-820 spectropolarimeter

光路長 : 1 mm

測定時温度 : 25°C

測定波長 : 222 nm

はじめに、シリコナイズドした 1 ml メスフラスコに構造安定性測定用 buffer を加え、目的の終濃度 (0~4 M) になるよう 8 M Gdn-HCl 及び milli-Q 水を加えて 1 ml とし、25°C で 2 h インキュベートした。この間に、GroEL の入っていない各 Gdn-HCl 濃度の Buffer 溶液を 1 ml ずつ調製しておいた。

測定はチロシン蛍光及び CD を用い、上記した条件で測定波長の前後 4 nm を測定した。測定後、試料溶液の測定スペクトルから buffer 溶液の測定スペクトルを差し引き、

GroEL のみによるチロシンの蛍光強度及び CD シグナルを算出した。

グラフの作成において、Gdn-HCl 濃度 0 M をネイティブ状態、4 M を完全変性状態とし、Gdn-HCl 濃度 0 M を構造の完全性が 100%，4 M を 0%とした。

2-22. 複合体分離実験

GroEL WT はフッ化ベリリウム (BeFx) 存在下で基質蛋白質, GroES, ATP を添加するとフットボール型の GroEL-GroES-基質蛋白質三者複合体 (GroEL : GroES : 基質蛋白質=1 : 2 : 2) を形成した状態でシャペロンサイクルが停止することが分かっている。この三者複合体に対して Proteinase K を作用させても、基質蛋白質は GroEL-GroES キャビティに守られて分解から免れる。これは基質蛋白質がカプセル化されていることを示している⁴⁶。これを利用して、GroEL CP86 が基質蛋白質のカプセル化を行うか調査した。

※ BeCl₂ は有害で毒性の強い物質なので吸い込んだり、目、皮膚及び衣類に触れないように注意すること。Be(ベリリウム)の混入した実験廃液は Be(ベリリウム)専用の廃液入れに廃棄すること。粉塵が発生すると危険なので、粉塵が発生しないように廃液中の水分量を確認すること。

－基本となる操作－

[反応液組成]

2×Rhodanese 再生用 Buffer

0.5 μM GroEL

2.0 μM 変性 Rhodanese

1 mM BeCl₂

10 mM NaF

1.0 μM GroES

1 mM ATP

1. 上記した反応液組成を調製した。添加する順番は上記した組成の上から順に混合していき、変性 Rhodanese まで添加し攪拌した後、Rhodanese が GroEL に完全にトラップされるように 25°C で 10 min インキュベートした。
 2. 全てを反応液へ添加して攪拌し、25°C で 30 min インキュベートした。
 3. 複合体を形成していない余剰蛋白質を分解して除くため、0.1 mg/ml Proteinase K を終濃度 1 μg/ml になるように添加し攪拌、25°C で 30 min インキュベートした。
 4. Proteinase K の反応を停止させるため、200 mM PMSF を終濃度 1 mM になるように添加し攪拌した。
 5. Centricon YM100 に反応液を入れ、さらに 4 倍量の 1×Rhodanese 再生用 Buffer を加えた後、4°C、2500 rpm、10 min 遠心分離した。
 6. 上清を回収し、Protein Assay Kit を用いて蛋白定量を行った。
 7. TCA 濃縮を行い、15% SDS-PAGE ゲルの各レーンに一定の蛋白質量をアプライした。
- 以上の操作を基本とし、Proteinase K 処理を行わない条件においても実験を行った。

※ Proteinase K (PK) : セリンプロテアーゼの一種。広い基質特異性を有し、特に疎水性、含硫、芳香族アミノ酸の C 末端に隣接するペプチド結合を優先的に分解する。分子量は約 30 kDa (279 残基)。

2-23. 電子顕微鏡観察

GroEL-GroES-Rhodanese 複合体分離実験において、GroEL CP86 と GroES の複合体の形成を確認するため、電子顕微鏡観察を行った。複合体分離実験 (2-22) で得られたサンプル 5 μ l をカーボンコートコロジオンメッシュ膜 (日新 EM) にアプライし、1 分間室温でインキュベート後、ろ紙でサンプルを吸い上げた。洗浄のため Milli-Q 水 5 μ l をアプライ後、直ちに溶液を吸い上げた。1%ウラニル酢酸で 20 秒ネガティブ染色を行い、再びろ紙でサンプルを吸い上げた。乾燥後に JEM-1210 (電子顕微鏡) を用い、電圧を 80 kV に設定して観察を行った。

2-24. ストップ・フロー装置を用いた蛍光強度測定

GroEL のアピカルドメインに導入したトリプトファンの蛍光強度変化を指標として、Stopped-Flow 装置を用いて測定し、トリプトファン由来の蛍光強度変化を速度論的に解析した。使用する緩衝液は、以下に示す Stopped-Flow Buffer を用いた。295 nm の波長で励起し、320 nm 以下の光を遮断する WG320 フィルターを通して蛍光を観測した。

Stopped-Flow Buffer	変性 MDH 組成
50 mM Triethanolamine (pH 7.5 at 25°C)	5.0 mg/ml MDH
50 mM KCl	6.25 mM DTT
20 mM MgCl ₂	3 M Gdn-HCl
測定溶液 A	測定溶液 B
1.25 μM GroEL (各種 R231W 変異体)	2 mM ATP
±1.25 μM 変性 MDH	±1.25 μM GroES

－基本となる操作－

1. Stopped-Flow Buffer 中に 0.5 g/L の Acid-washed charcoal (活性炭) を添加し、タンパク質サンプルを室温で一晩透析した。遠心分離 (15,000 rpm, 4°C, 10 min) により沈殿物を除去した後、上清を回収した。
2. 基質タンパク質には MDH を用い、変性 MDH は組成を基準に作成し、恒温槽で 37°C, 30 min 変性させた。
3. 測定溶液 A, B を調製し、25°C で 10 min インキュベートした。両液をシリンジへ移し 1:1 の割合で混合し励起波長 295 nm, 観測波長 320 nm 以上, 測定温度 25°C で測定した。
4. データの解析は、5 回～25 回分を平均したものをを用い、以下に示す Single もしくは Double Exponential, Triple Exponential の式に適用し、見かけの速度定数およびアンプリチュードの値を求めた。

Single Exponential

$$y = A_1 \exp(-k_1 \cdot t) + C_1$$

Double Exponential

$$y = A_1 \exp(-k_1 \cdot t) + A_2 \exp(-k_2 \cdot t) + C_2$$

Triple Exponential

$$y = A_1 \exp(-k_1 \cdot t) + A_2 \exp(-k_2 \cdot t) + A_3 \exp(-k_3 \cdot t) + C_3$$

※上記の式で示した A_1 , A_2 , A_3 はアンプリチュードの値を,

k_1 , k_2 , k_3 は見かけの速度定数を, C_1 , C_2 , C_3 は $t = \infty$ における y の値を示す。

2-25. FRET を利用した基質タンパク質の解離

FRET を利用し, 基質タンパク質の解離を観測することで, GroEL R231W, SR1-R231W, D398A-R231W における基質タンパク質の結合様式および, 内包化メカニズムの違いを調べた。

蛍光修飾サンプル組成

20 mg/ml GroEL-WT

5 mM 1,5-IAEDANS

酸変性 WT GroEL 組成

20 mM Glycine-HCl (pH2.0 at 25°C)

31.25 μ M AEDANS-GroEL-WT

測定溶液 A

1.25 μ M GroEL(各種 R231W 変異体)

\pm 1.25 μ M 変性 WT GroEL

測定溶液 B

2 mM ATP

\pm 1.25 μ M GroES

－基本となる操作－

WT GroEL を 50 mM Tris-HCl (pH 7.5 at 25°C) で 3 h → over night 透析した。

1. 上記の組成で蛍光ラベル修飾を行った。
2. 25°C, 30 min インキュベート後, 10 mM β -Me で反応を停止し, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5 at 25°C), 活性炭 0.5 g/L で over night 透析した。
3. JASCO により吸光度を測定し, AEDANS の 336 nm におけるモル吸光係数 ($5,700 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$) より AEDANS モル濃度を求め, Bio-RAD PROTEIN ASSAY によりタンパク濃度を決定し, GroEL サブユニットあたりの AEDANS 修飾率を求めた。
4. AEDANS 修飾後の WT GroEL を Glycine-HCl 中で 25°C, 1h で変性させた。
5. 測定溶液 A, B を調製し, 25°C, 10 min インキュベート後, 両液を 1 : 1 の割合で混合し, 測定を行った。
6. データ解析は 10~25 回分の測定データを積算したものをを用い, Double Exponential の式に適用し, 見かけの速度定数およびアンプリチュードの値を求めた。

FRET 測定条件は以下のとおりである。

励起波長 295 nm (Trp : Ex.295 nm, Em.340 nm, AEDANS : Ex.336 nm, Em.470 nm)

観測波長 420 nm 以上 (420 nm cut の Filter 使用), 温度 25°C

3. 結果と考察

3-1~3-3 ではストップ・フローで用いた GroEL 変異体（円順列変異体, シングルリング変異体, ATP 加水分解欠損変異体）の機能解析を行った。各種変異体の性質を明らかにし, 3-4 ではストップ・フローによりアピカルドメインの構造変化について調査した。

3-1. 円順列変異体 GroEL CP86 の機能解析

GroEL CP86 は野生型 (GroEL WT) の C 末端と N 末端をリンカーでつなぎ, 86 番目のアミノ酸を新たな N 末端とした変異体である。GroEL CP86 の N 末端はエクアトリアルドメインのヌクレオチド結合部位付近に位置する。GroEL CP86 の機能解析を行い, サブユニットを構成するドメイン間の繋がりがシャペロニン機能に及ぼす影響を調査した。

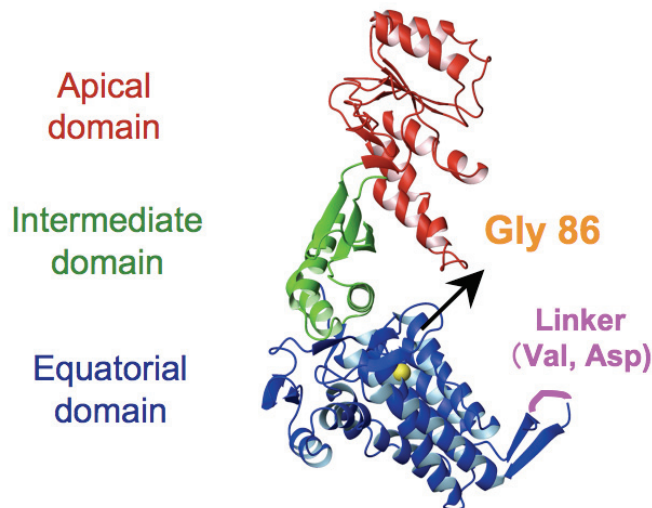


図 3-1. GroEL C86 の新末端導入位置

3-1-1. CD 測定(GroEL CP86)

円順列変異体は、新末端の導入により、野生型と異なる二次構造を形成している可能性があった。GroEL WT と GroEL CP86 の二次構造レベルでの違いを調べるために、CD 測定を行った。

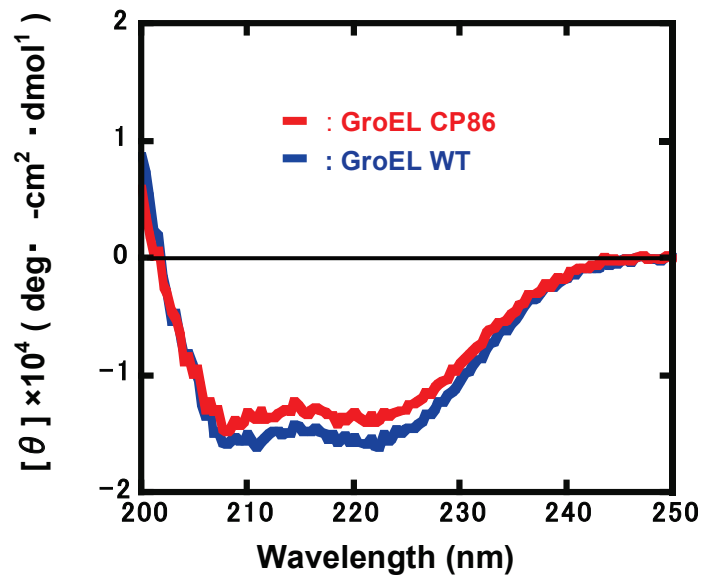


図 3-2. GroEL CP86 の CD 測定

GroEL WT は立体構造中に α ヘリックス構造を多く含んでいるため、 α ヘリックス構造に特有のシグナルである 210 nm 付近と 220 nm 付近の負の極大が観測される。GroEL CP86 のシグナルは GroEL WT のシグナルよりも若干低下しているものの、ほぼ同等のシグナルが得られた。エクアトリアルドメインの 86 番目残基付近に新末端が導入されたことによる GroEL 二次構造への影響は少ないと考えられた。

3-1-2. Gdn-HCl に対する構造安定性測定実験(GroEL CP86)

新末端導入による構造安定性への影響を調べるため、Gdn-HCl に対する構造安定性を評価した。0~4 M Gdn-HCl 存在下における Tyr 蛍光測定と CD 測定を行った。

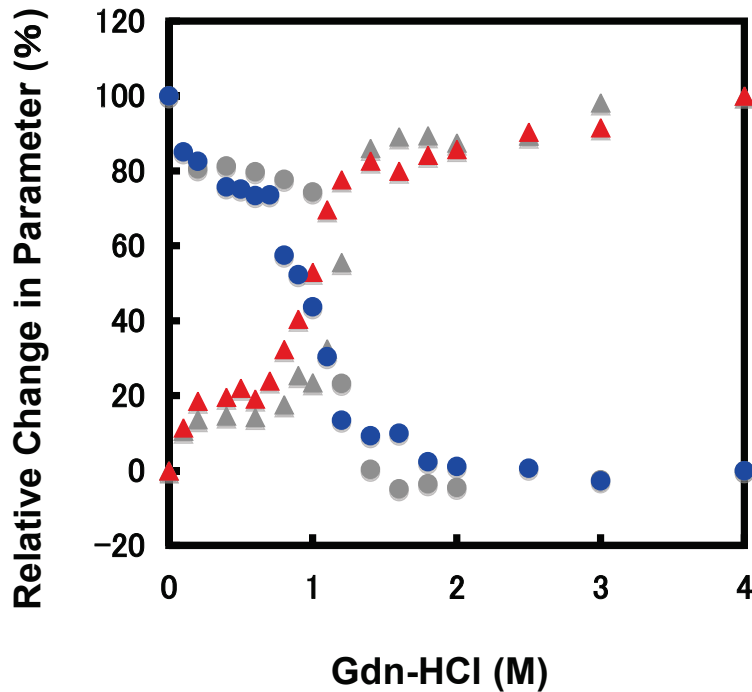


図 3-3. GroEL CP86 の Gdn-HCl に対する構造安定性測定実験

GroEL CP86 ●:Tyr 蛍光測定 ▲:CD 測定
GroEL WT ●:Tyr 蛍光測定 ▲:CD 測定

GroEL CP86 と GroEL WT は両者とも 2 段階の変性曲線を示した。1 段階目 (~0.5 M Gdn-HCl) の変化は何らかの立体構造変化を示していると考えられ、2 段階目 (0.5 ~1.5 M Gdn-HCl) の大きな変化は実際に両 GroEL の立体構造が崩れていることを示していると考えられた。GroEL CP86 は、この 2 段階目の変化が GroEL WT よりも約 0.1 M 低濃度で観測された。GroEL CP86 の構造安定性は野生型よりも若干低下していると考えられた。

3-1-3. ATPase 活性測定(GroEL CP86)

新末端導入による ATP 加水分解能への影響を調査するため、GroEL CP86 の ATPase 活性測定を行った。37℃及び 25℃において ATPase 活性測定を行い、コントロールとして GroEL WT も同時に測定した。

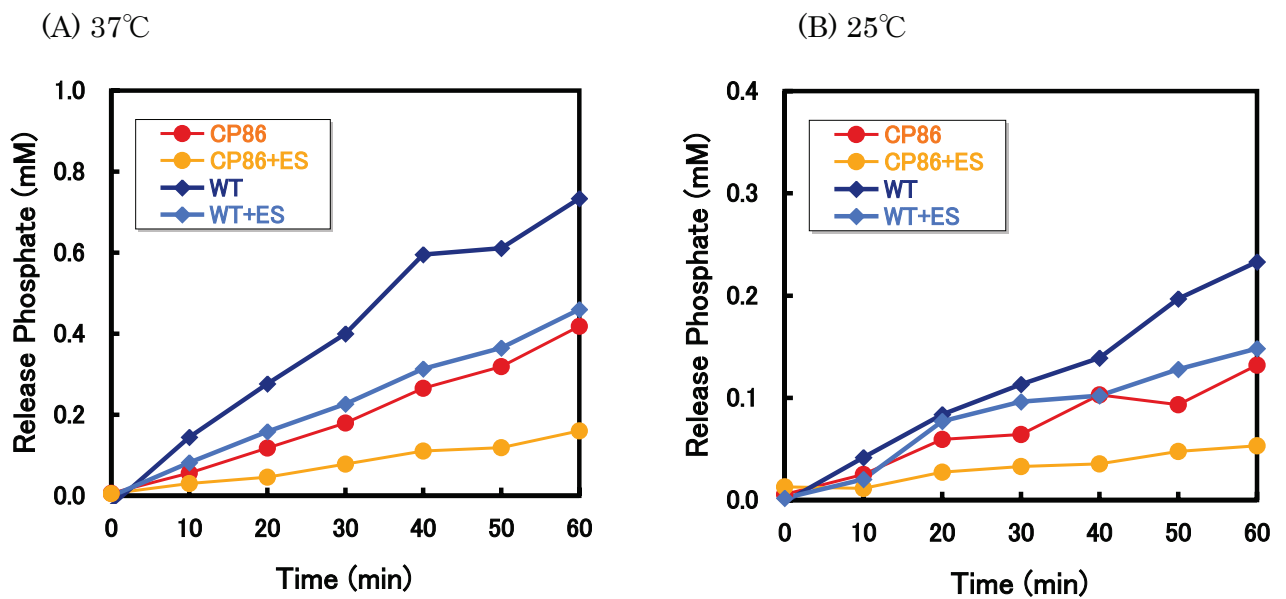


図 3-4. GroEL CP86 の ATPase 活性測定

37℃、25℃どちらの条件においても GroEL CP86 は GroEL WT の半分程度の ATPase 活性を保持していることが明らかになった。また、GroES の添加によって ATPase 活性が抑制されるため、GroES との相互作用は維持され、ATPase 活性を抑制する能力は保たれていたものと考えられた。

3-1-4. Rhodanese, MDH リフォールディング活性測定(GroEL CP86)

GroEL CP86 のシャペロニン活性を測定するために、Rhodanese, MDH のリフォールディング活性測定を行った。コントロールとして GroEL WT も同時に測定した。

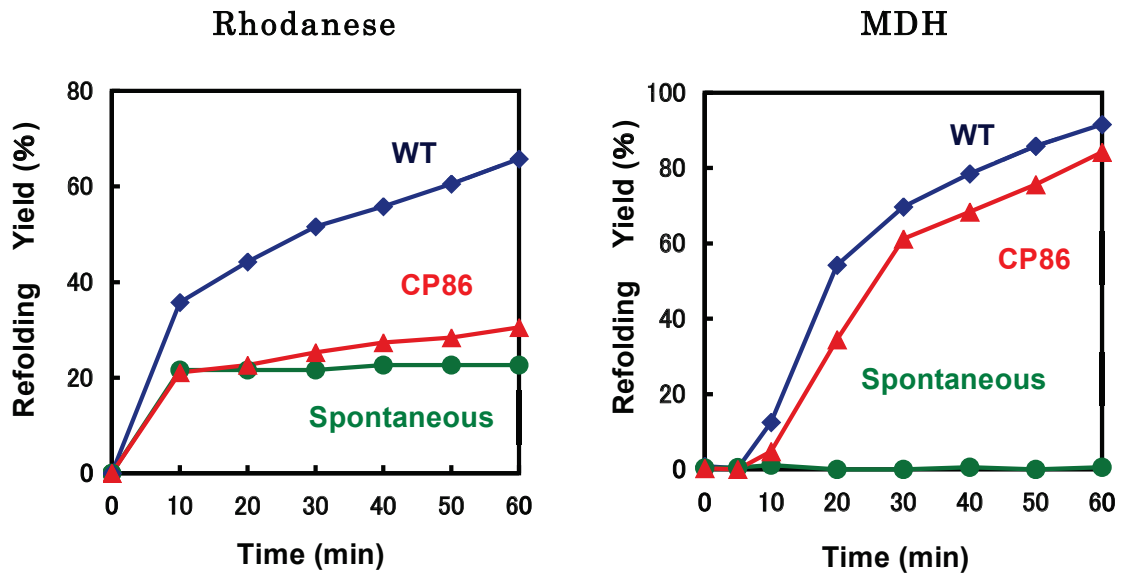


図 3-5. GroEL CP86 リフォールディング活性測定

Rhodanese リフォールディング実験では、GroEL CP86 は Rhodanese の活性を 30% ほどしか戻しておらず、Spontaneous よりも少し高い程度であり、リフォールディング補助能力は野生型の 1/5 程度であった。一方、不思議なことに MDH リフォールディング実験では、GroEL CP86 は野生型に近いリフォールディング能を保っていることが確認された。基質の種類によってシャペロニン能力が異なる結果となった。また、MDH は二量体で活性を示すため、GroEL キャビティ内に取り込んだ基質を再び溶媒に放出するステップを維持していることが示唆された。

3-1-5. GroEL-GroES-基質,複合体形成実験(GroEL CP86)

GroEL CP86 が基質蛋白質(Rhodanese)を完全にカプセル化するか, GroEL WT と比べて GroES, 基質蛋白質との結合割合に変化があるか調査を行った。GroEL は BeFx 存在下で基質蛋白質, GroES, ATP を添加するとフットボール型の GroEL-GroES-基質蛋白質三者複合体 (GroEL : GroES : 基質蛋白質=1 : 2 : 2) を形成した状態でシャペロニンサイクルが停止することが分かっている⁴⁶。BeFx を添加して ATP 存在下でフットボール型を形成させ, Proteinase K (PK) 処理を行ってカプセル化されていない基質蛋白質を除去, Microcon YM100 でフットボール型複合体のみを抽出し, SDS-PAGE で確認した。

A. Rhodanese を基質とした複合体形成実験(PK 処理なし)

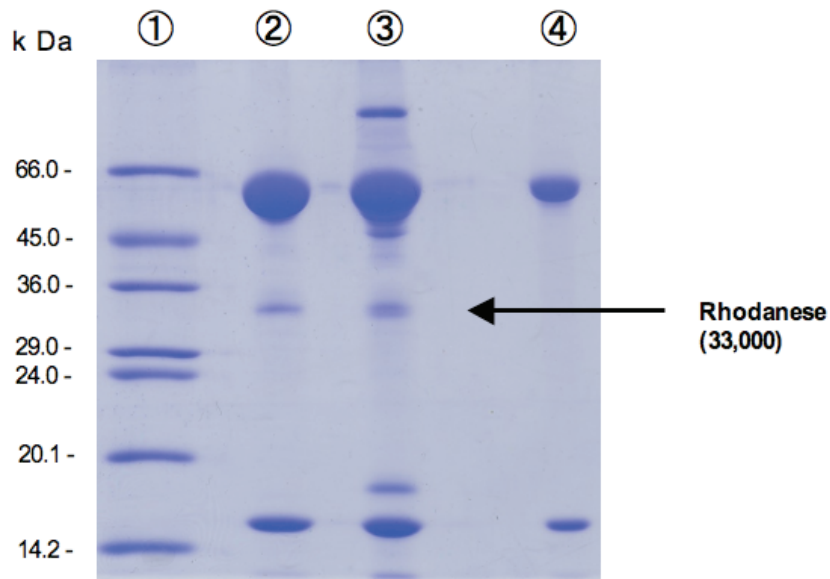


図 3-6. 複合体形成実験(PK 処理なし)

① 分子量マーカー ② GroEL WT ③ GroEL CP86 ④ ELS マーカー

B. Rhodanese を基質とした複合体形成実験(PK 処理 30 min)

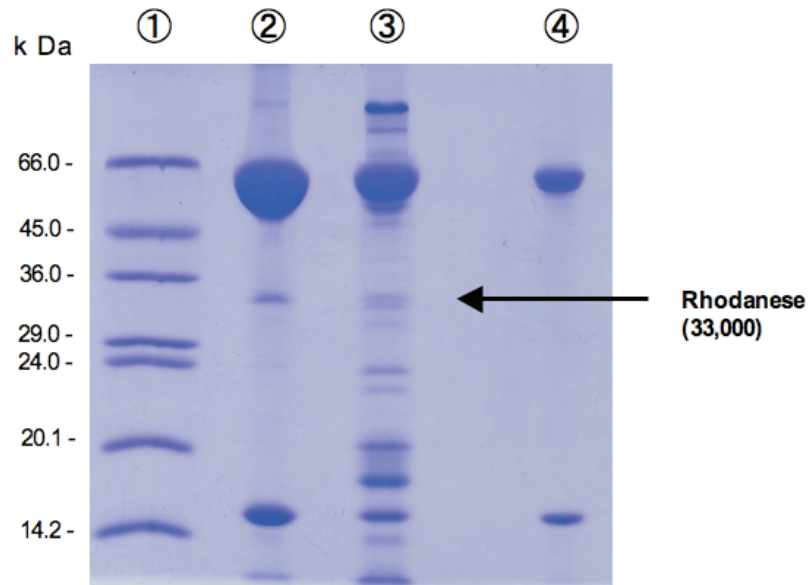


図 3-7. 複合体形成実験(PK 処理 30 min)

① 分子量マーカー ② GroEL WT ③ GroEL CP86 ④ ELS マーカー

(A) PK 処理を行わなかった場合、野生型、変異体ともに GroEL, Rhodanese, GroES の 3 つのバンドがはっきりと観察できた。GroEL CP86 は Rhodanese と複合体を形成することが確認された。また、GroES, Rhodanese の結合量は GroEL WT と同等であるように見てとれた。

(B) PK 処理を行った場合、GroEL WT では GroEL, Rhodanese, GroES の 3 つのバンドがはっきりと観察できた。GroEL CP86 においても GroEL, Rhodanese, GroES の 3 つのバンドが観察されたため、Rhodanese をキャビティ内部で保護していると考えられる。しかし、GroEL CP86 は PK 処理を行わなかったものと比較してバンドの数が増加した。バンドの増加には、Rhodanese の分解以外に、GroEL CP86 の分解、夾雑タンパク質の分解が考えられたため、アセトン沈殿により高純度に精製した GroEL CP86 サンプルを用いて、同様の実験を行った。

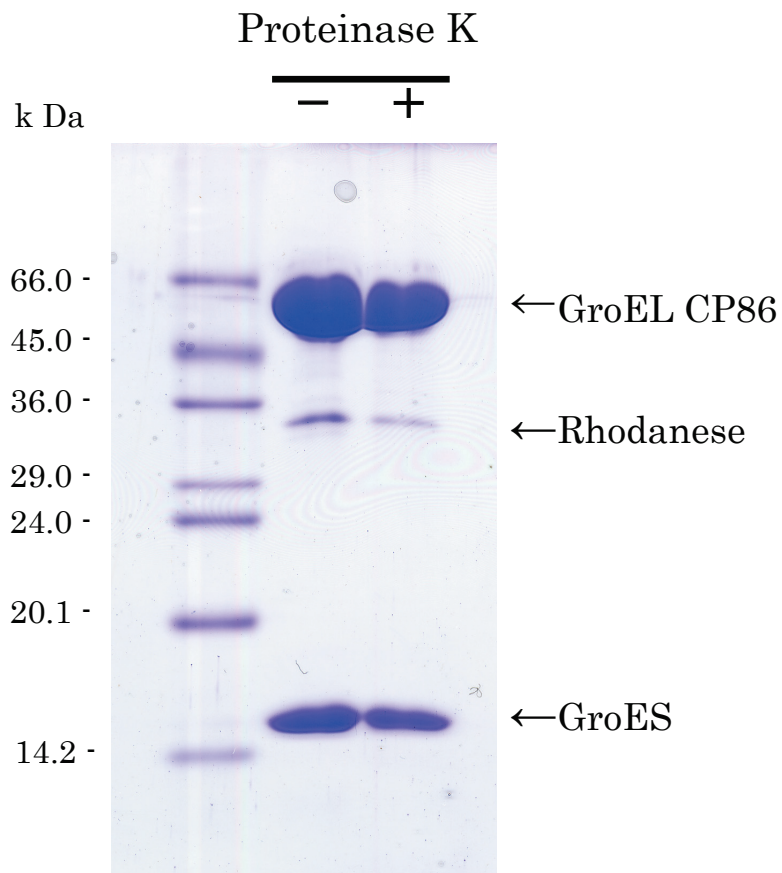


図 3-8. 複合体形成実験（アセトン沈殿後）

PK 処理を行わなかった場合、野生型、変異体ともに GroEL, Rhodanese, GroES の 3 つのバンドがはっきりと観察できた。PK 処理を行った場合においても、GroEL, Rhodanese, GroES の 3 つのバンドがはっきりと観察できた。GroEL CP86 は、Rhodanese をキャビティ内部に保護していると考えられる。

3-1-6. 電子顕微鏡観察(GroEL CP86)

GroEL CP86-基質蛋白質(Rhodanese)複合体形成実験 (3-1-5) のサンプルが複合体を形成しているのか確認するため、電子顕微鏡観察を行った。

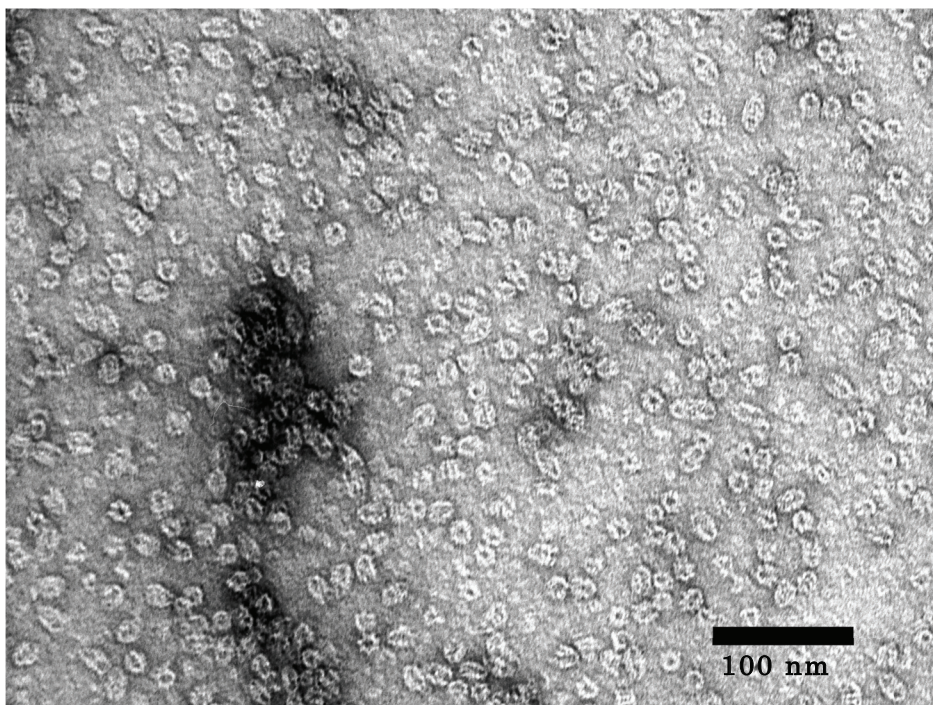


図 3-9. 電子顕微鏡による GroEL CP86 の確認

弾丸型複合体及びフットボール型複合体が確認されたため、GroEL CP86 は GroES と複合体を形成することが分かった。また、基質タンパク質 (Rhodanese) をキャビティ内部で保護していることが示唆された。

3-1 の実験結果より、GroEL CP86 は ATPase 活性が野生型の半分程度、GroES による ATPase 活性の抑制は野生型と同じく 50%程度であることが分かった。また、MDH のリフォールディング能は野生型と同程度であったが、Rhodanese のリフォールディング能力は 1/5 程度に減少していた。ポリペプチド鎖への円順列変異導入 (エクアトリアルドメインのポリペプチド鎖の開裂) が原因でシャペロニン機能が一部低下したものと考えられる。

3-2. 円順列変異体 GroEL CP86 C4 の機能解析

GroEL CP86 は、ポリペプチド鎖の開裂により機能低下が生じたと考えられたため、末端同士の間によりシャペロン機能の回復が見られるのか疑問が生じた。そこで、末端同士を連結可能させるため、N 末端、C 末端付近にそれぞれシステイン残基を導入した変異体 (GroEL CP86 C4) を作製した。この変異体は還元条件下で末端部位が切断された状態にあるが、酸化条件下では末端部位でジスルフィド結合を形成し、切断された末端を修復することを期待して設計した。

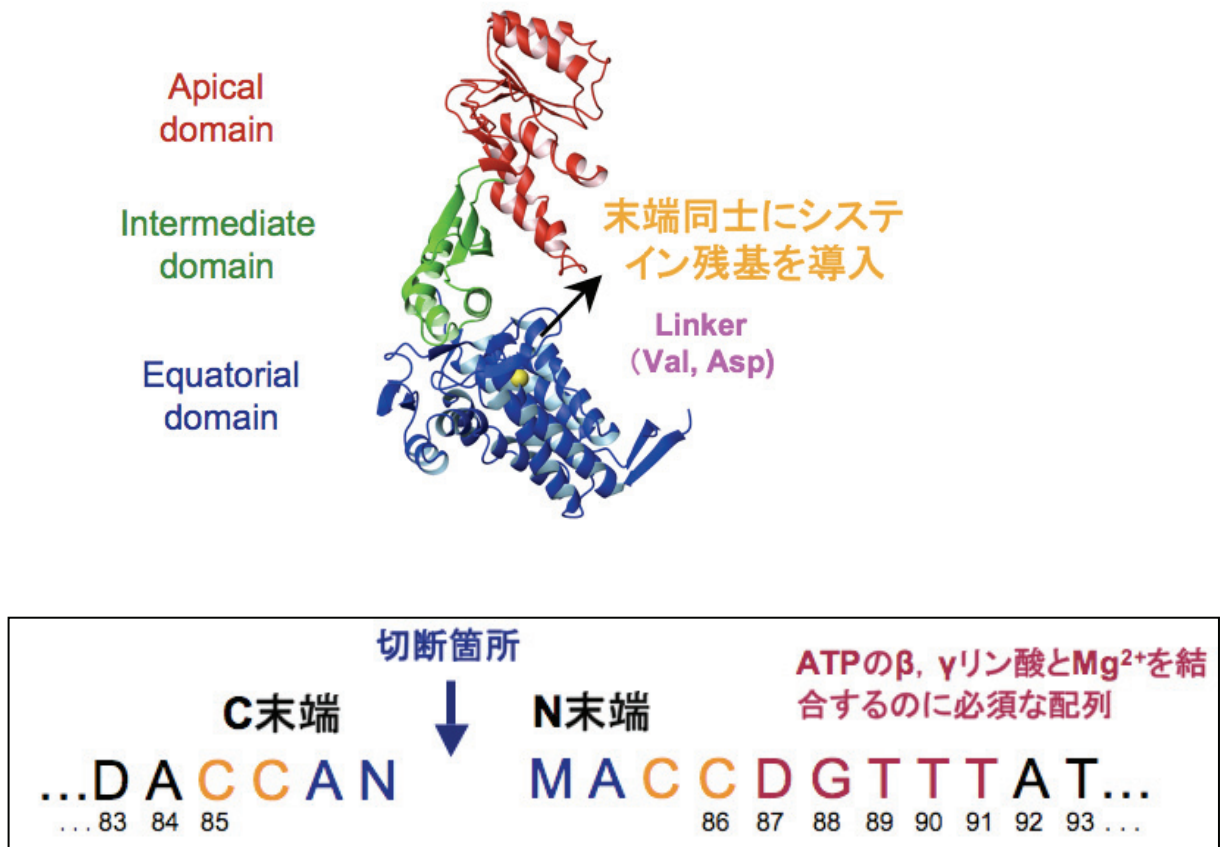


図 3-10. GroEL C86 の新末端導入位置とシステイン残基の導入位置

3-2-1. GroEL CP86 C4 の酸化処理

GroEL CP86 C4 を精製し，酸化サンプル，還元サンプルを作製した。酸化処理（ジスルフィド結合の形成）により，還元サンプルと比較して SDS-PAGE の電気泳動度に変化が見られるか確認を行った。

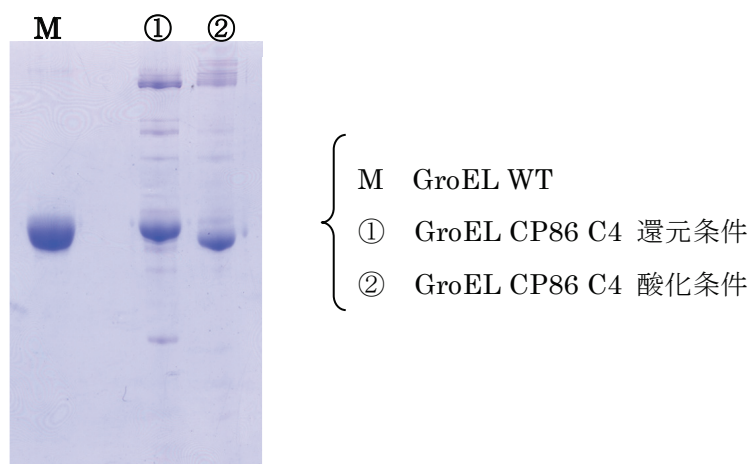


図 3-11. 酸化処理後の電気泳動度の確認

※ GroEL WT の分子量は 57,259，GroEL CP86 C4 の分子量は 58,086。

酸化サンプルと還元サンプルを SDS-PAGE で解析した結果，電気泳動の移動速度に違いが見られた。酸化サンプルのバンドは還元サンプルよりもわずかに下向きにシフトしたため，ジスルフィド結合の形成により，電気泳動の移動速度に違いが見られたと考えられた。

3-2-2. GroEL CP86 C4 の CD 測定

末端部位の連結に伴う GroEL 二次構造への影響を調べるため、GroEL CP86 C4 酸化条件、還元条件の CD 測定を行った。

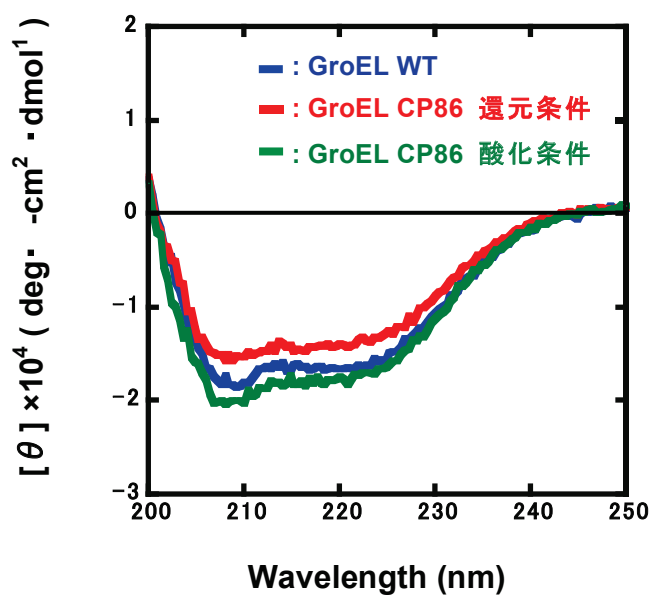


図 3-12. GroEL CP86 の CD 測定

GroEL WT は立体構造中に α ヘリックス構造を多く含んでいるため、 α ヘリックス構造に特有のシグナルである 210 nm 付近と 220 nm 付近の負の極大が観測された。各サンプルで多少のばらつきは見られたが、GroEL CP86 C4 のシグナルは酸化条件、還元条件共に GroEL WT のシグナルとほぼ同等であった。

3-2-3. GroEL CP86 C4 の Gdn-HCl に対する構造安定性測定実験

酸化条件下の GroEL CP86 C4 の構造安定性について調べるため、Gdn-HCl に対する構造安定性を評価した。0~4 M Gdn-HCl 存在下における Tyr 蛍光測定と CD 測定を行った。

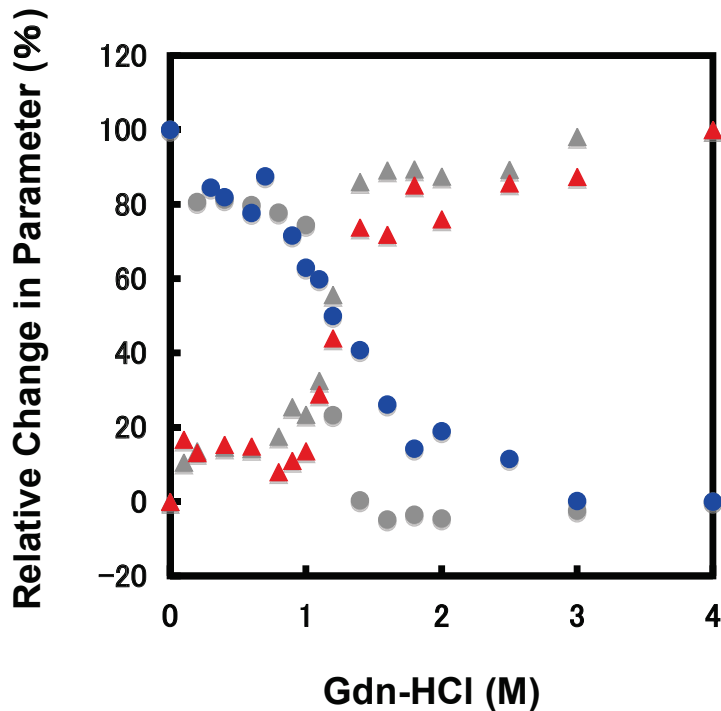


図 3-13. GroEL CP86 C4 の Gdn-HCl に対する構造安定性測定実験

GroEL CP86 C4 ●:Tyr 蛍光測定 ▲:CD 測定
GroEL WT ●:Tyr 蛍光測定 ▲:CD 測定

GroEL CP86 C4 と GroEL WT は両者とも 2 段階の変性曲線を示した。1 段階目 (~0.5 M Gdn-HCl) の変化は何らかの立体構造変化を示していると考えられ、2 段階目 (0.5 ~1.5 M Gdn-HCl) の大きな変化は実際に両 GroEL の立体構造が崩れていることを示していると考えられた。GroEL CP86 C4 の変性曲線は、GroEL WT とほぼ同様の曲線を描いており、構造安定性は野生型と同程度、もしくはそれ以上であると示唆された。

3-2-4. GroEL CP86 C4 の ATPase 活性測定

末端部位の連結による ATPase 活性への影響を調査するため、GroEL CP86 C4 酸化サンプル、還元サンプルを用いて ATPase 活性測定を行った。

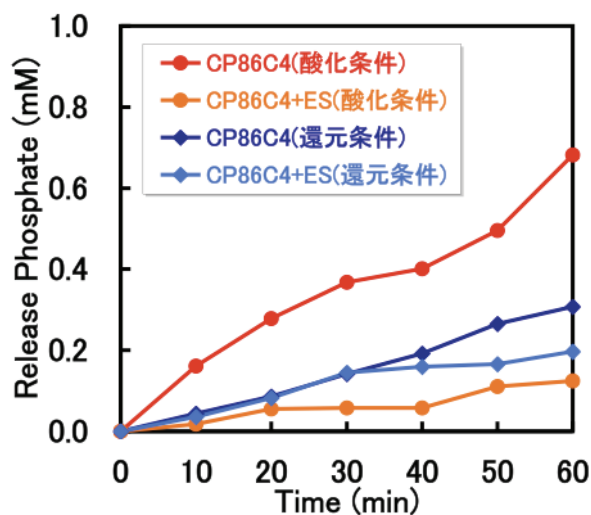


図 3-14. GroEL CP86 C4 の ATPase 活性測定

還元サンプルの ATPase 活性は GroEL CP86 の ATPase 活性（図 3-4）と同程度であったが、GroES 非存在下の酸化サンプルにおいて、ATPase 活性の上昇が確認された。GroEL CP86 酸化条件下のリン酸濃度は、反応開始 1 時間後に約 0.7 mM となっており、野生型の約 0.8 mM（図 3-4）に近い値となった。酸化処理により、末端部分が修復され ATPase 活性が回復したことが示唆された。

3-2-5. Rhodanese, MDH リフォールディング活性測定

GroEL CP86 C4 酸化条件のシャペロニン活性を測定するために、Rhodanese, MDH のリフォールディング活性測定を行った。コントロールとして GroEL WT を同時に測定した。

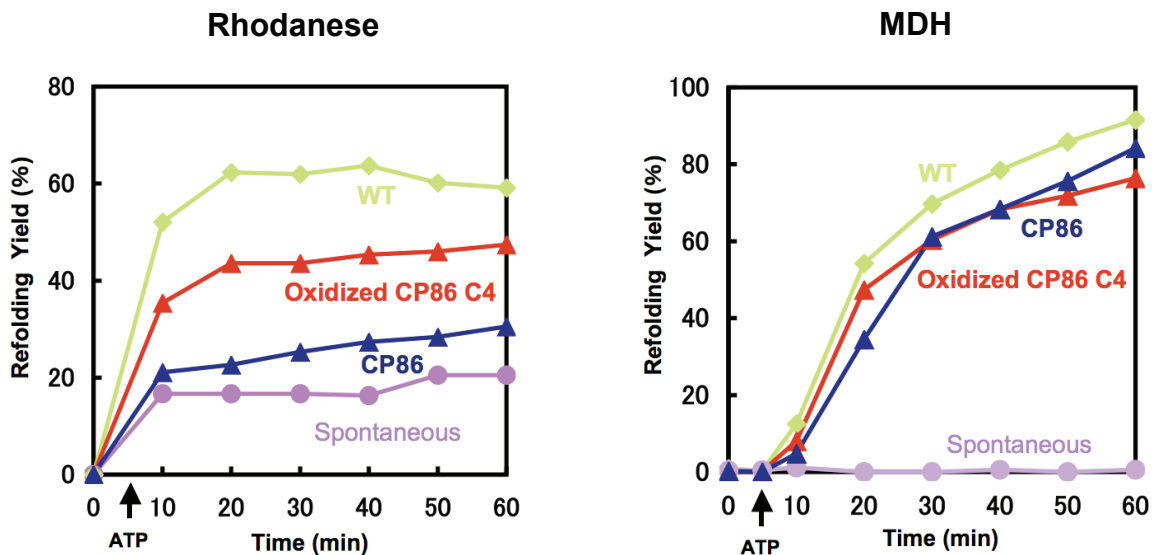


図 3-15. Rhodanese, MDH リフォールディング活性測定

Rhodanese の Refolding 実験では、GroEL CP86 C4 のリフォールディング効率は約 45%、GroEL CP86 の Refolding 能は約 30%であった。システイン残基を導入し、酸化させることでリフォールディング効率の向上が確認された。MDH のリフォールディング活性測定では、GroEL CP86 C4 のリフォールディング能は GroEL CP86 と同程度であり、野生型と同程度のリフォールディング能を保持していた。

3-2 の実験結果より、GroEL CP86 C4 は、酸化条件下において構造安定性の向上が確認された。また、ATPase 活性、Rhodanese のリフォールディング能力が向上し、野生型に近づいた。これらの結果より、エクアトリアルドメインのヌクレオチド結合部位付近のつながりが野生型 GroEL の機能に密接に関係していると考えられた。

次に、2つのリングが形成する四次構造、ATP加水分解活性の寄与を探るためにシングルリング変異体 (GroEL SR1), ATP加水分解能欠損変異体 (GroEL D398A) を用いて実験を行った。

3-3. GroEL SR1-R231W, D398A-R231W の機能解析

R231W 変異がシャペロニン機能に及ぼす影響を調べるため、GroEL SR1-R231W, D398A-R231W の ATPase 活性測定 (3-3-1), 基質タンパク質のリフォールディング活性測定 (3-3-2) を行った。

3-3-1. ATPase 活性測定 (GroEL SR1-R231W, D398A-R231W)

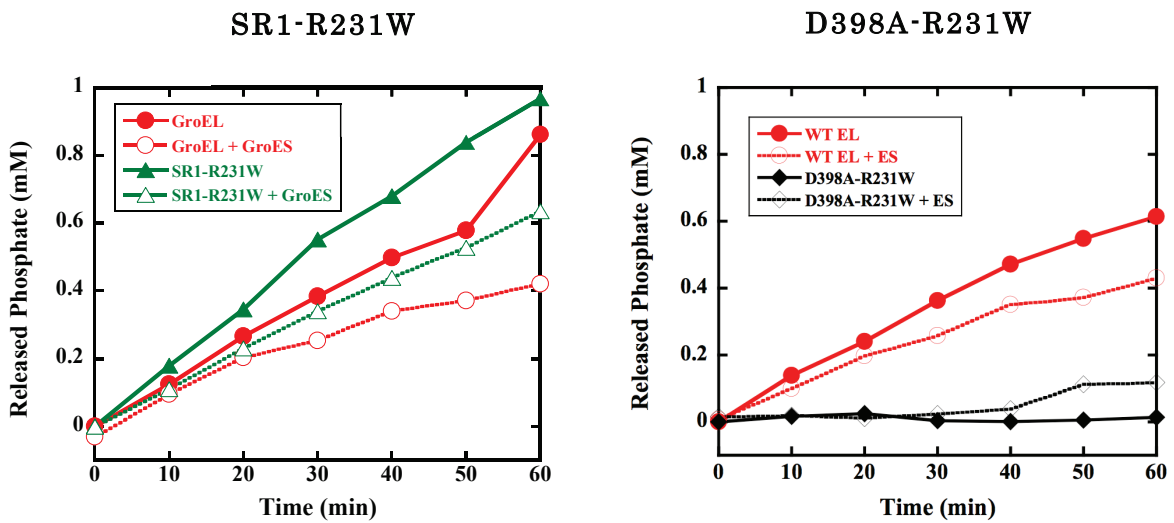


図 3-16. SR1-R231W, D398A-R231W の ATPase 活性測定

谷口氏の研究により、GroEL R231W は野生型よりもわずかに高い ATPase 活性を持つことが報告されている²⁰。GroEL SR1-R231W は野生型よりも 1.1 倍程度高い ATPase 活性が確認された。また、GroES によって ATPase 活性が半分程度抑制されることが確認された。GroEL D398A-R231W の ATPase 活性は野生型と比較して非常に低いことが確認された。GroEL D398A の ATPase 活性は野生型の 2 パーセント程

度であることが確認されている²²。アピカルドメインへの R231W 変異導入による影響は少ないことが確認された。

3-3-2. GroEL SR1-R231W のリフォーディング活性測定

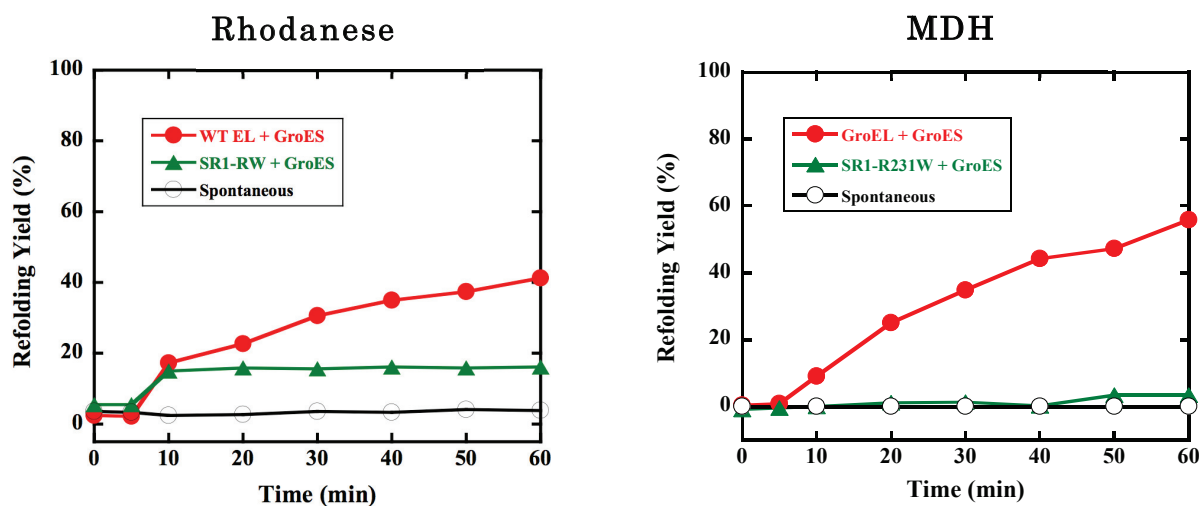


図 3-17. SR1-RW のリフォールディング活性測定

GroEL SR1-R231W の Rhodanese のリフォールディング能力は、自発的なフォールディングよりも上昇したが、野生型よりも低い活性が確認された。GroEL SR1 はトランスリング側の制御が欠如しているため、シャペロニンサイクルが動作しない。Rhodanese は単量体で活性を持つため、キャビティの中に入った基質の一部が活性を回復していると考えられる。一方、MDH のリフォールディング能力は確認されなかった。MDH は二量体で活性を持つため、単量体がキャビティの中で結合し、活性を持つ状態にならなかったと考えられる。

一連の実験を通してトリプトファン残基の導入 (R231W 変異) によるシャペロニン変異体の機能への影響は少ないと判断し、次にストップ・フロー解析を行った。

3-4. GroEL 変異体のストップ・フロー蛍光分析

アピカルドメインに存在する 231 番目のアルギニン残基をトリプトファンに置換した変異体(R231W 変異体)を用いたストップ・フロー蛍光分析により, シャペロニン GroEL アピカルドメインの蛍光強度変化を観察した。野生型 (GroEL R231W), 円順列変異体(GroEL CP86-R231W), ATP 加水分解欠損変異体(GroEL D398A-R231W), シングルリング変異体 (GroEL SR1-R231W) を用いて実験を行った。

3-4-1. GroEL CP86-R231W のストップ・フロー蛍光分析

ドメインの開裂による GroEL 機能への影響を調べるため, 円順列変異体 (GroEL CP86) を用いてストップ・フロー蛍光分析を行った。

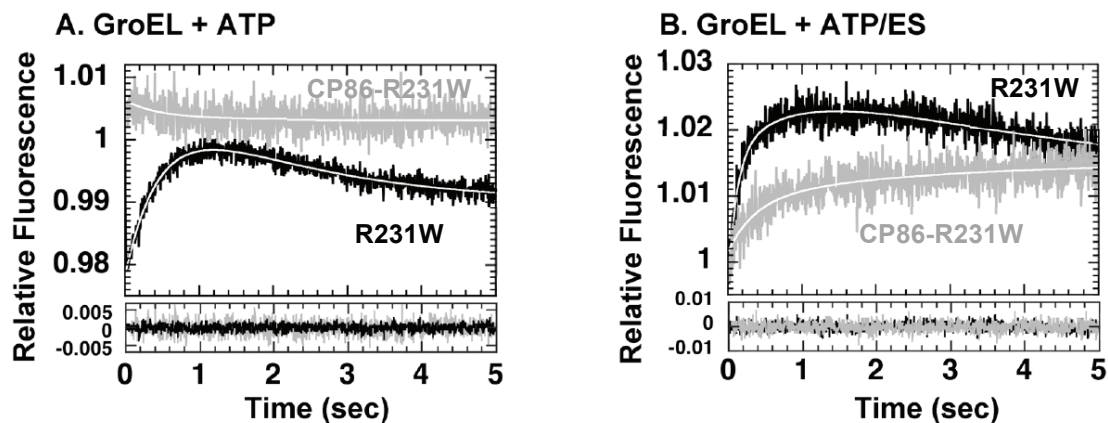


図 3-18. GroEL CP86-RW のストップ・フロー蛍光分析

(A) GroEL+ATP の条件下では, 蛍光強度変化が R231W と比較して大きく減衰しており, 蛍光強度変化がほとんど観測されなかった。反応開始直後の蛍光強度の増加 (Phase A) と, それに続く非常にゆっくりとした蛍光強度の減少 (Phase B) がわずかに観測された。エクアトリアルドメインへのポリペプチド鎖の開裂により, エクアトリアルドメインからアピカルドメインへの情報伝達に障害が生じたと考えられる。

(B) GroEL CP86-RW に GroES を添加することで, 蛍光強度変化 (Phase C, Phase S) が確認された。しかしながら, 野生型(GroEL R231W)と比較すると, 反応速度の低下

が確認された。Phase C は(R231W $k=0.75\pm 1.2\text{ s}^{-1}\rightarrow\text{CP86-R231W } k=0.43\pm 0.26\text{ s}^{-1}$), Phase S は (R231W $k=7.5\pm 0.86\text{ s}^{-1}\rightarrow\text{CP86-R231W } k=2.7\pm 0.87\text{ s}^{-1}$) であった。GroES の結合によりアピカルドメインの動きが促進されると考えられる。

3-4-2. シャペロニンサイクルの速度とアピカルドメイン構造変化の関連性

Phase C に起因するアピカルドメイン反応速度は ATP の濃度依存的に働くことが報告されている⁵²。そこで、ATP 加水分解能欠損変異体 (GroEL D398A-R231W) を用いて ATPase 活性の低下がアピカルドメインの動きにどのように影響するか解析を行った。

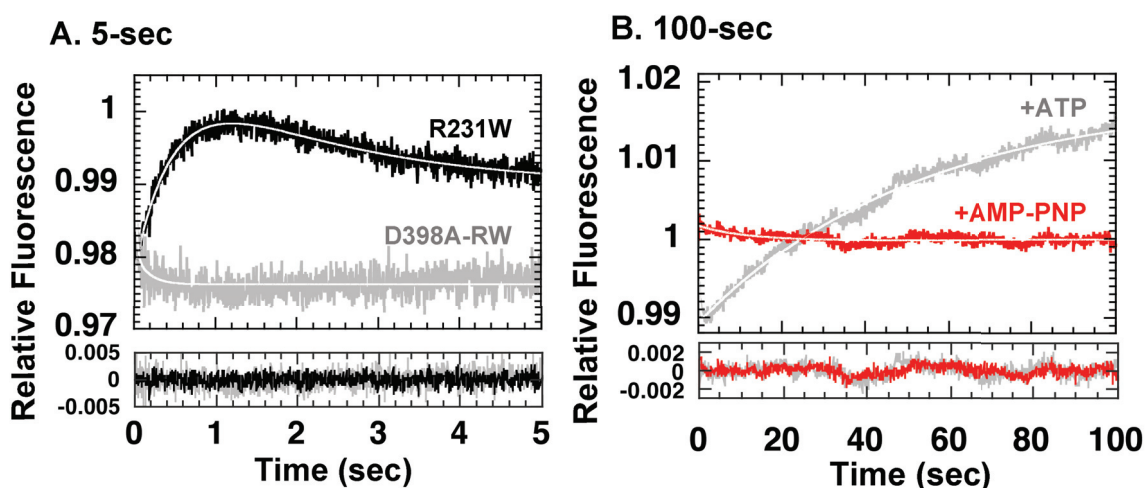


図 3-19. GroEL D398A-RW のストップ・フロー蛍光分析

(A) GroEL R231W において蛍光強度変化が確認される 5 秒測定を行った結果、GroEL D398A-R231W では Phase C に相当する蛍光強度変化が観測されなかった。

(B) 5 秒測定では、蛍光強度変化が観測されなかったため、測定時間を延長して実験を行った。100 秒間測定を行った結果、ゆるやかな Phase C に対応する蛍光強度変化が観測された ($k=0.019\pm 0.00029\text{ s}^{-1}$)。GroEL R231W の Phase C ($k=2.1\pm 0.11\text{ s}^{-1}$) と比較すると、110 倍程度遅いことが分かった。以前の研究で、GroEL CP376-R231W のストップ・フロー解析により、Phase C は ATP の加水分解の律速段階であることを考

察した⁵³が、GroEL D398A の ATP 加水分解の速度（野生型の 2%, $k=0.12 \text{ s}^{-1}$ ）と異なるため、その可能性は低い。そこで、Phase C が ATPase 活性の律速段階でないことを確認するため、加水分解できない ATP アナログ（AMP-PNP）を用いて実験を行った。AMP-PNP 存在下では蛍光強度変化が抑制され、Phase C は観察されなかった。この結果より、Phase C は ATP 加水分解の影響を強く受ける可能性もあるが、AMP-PNP の効果について詳細に調べる必要があると考えられた。

3-4-3. AMP-PNP がシャペロニン GroEL に及ぼす影響

AMP-PNP の結合が GroEL アピカルドメインに及ぼす影響を調べるため、野生型に近い GroEL R231W を用いて実験を行った。

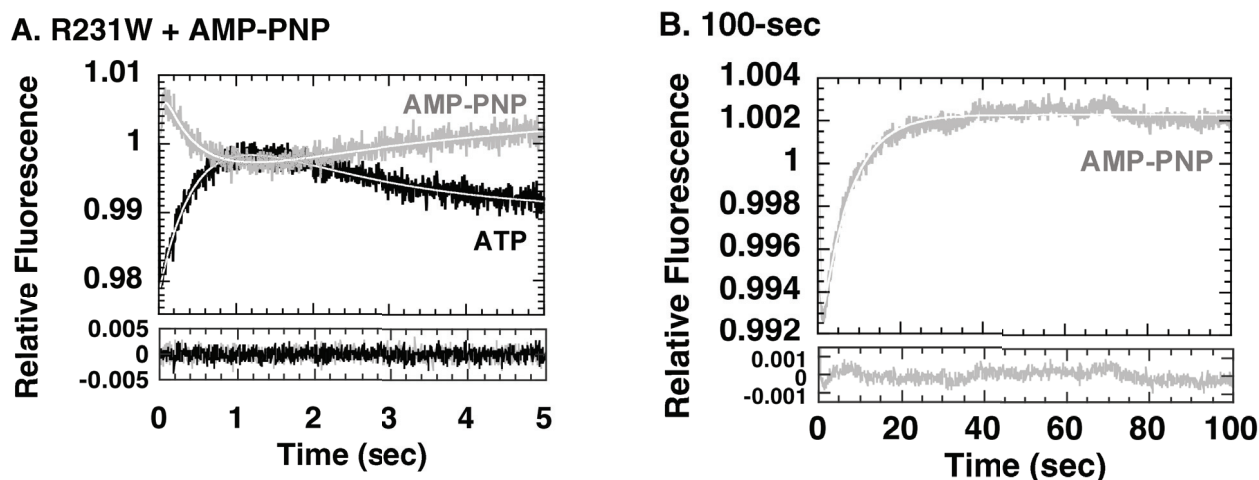


図 3-20. GroEL R231W のストップ・フロー蛍光分析(AMP-PNP)

(A) AMP-PNP を用いた 5 秒測定では、ゆるやかな蛍光強度変化変化が観測された。

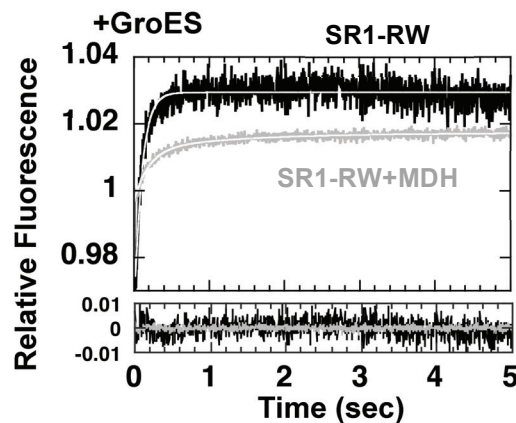
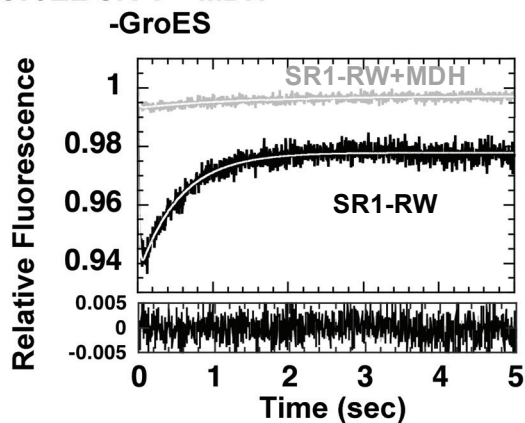
(B) AMP-PNP を用いた 100 秒測定においてもゆるやかな蛍光強度増加（Phase C）が観測された。ATP 存在下の GroEL R231W の Phase C の反応速度は $k=2.1\pm 0.11 \text{ s}^{-1}$ であったが、AMP-PNP 存在下では $k=0.29\pm 0.084 \text{ s}^{-1}$ と、7 倍以上反応速度が低下している。Phase A, PhaseB も同じように遅くなっており、AMP-PNP は反応速度が遅くな

るようには作用していると考えられる。以上の結果より、Phase C の開始と ATP 加水分解の相互依存に関連がないと考えられる。

3-4-4. 基質タンパク質存在下のストップ・フロー蛍光分析

シングルリング変異体 GroEL SR1-R231W は、ストップ・フローで観察される Phase D の緩やかな蛍光強度の減少が見られない³⁷。そこで、リング間の情報伝達に着目し、基質タンパク質（変性 MDH）を添加した際の蛍光強度変化を測定した。

A. GroEL SR-1 + MDH



B. GroEL R231W + 2MDH

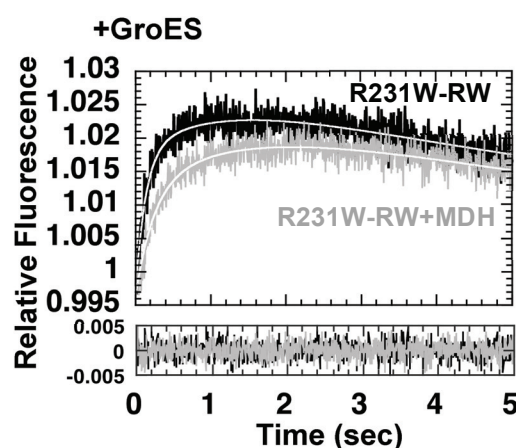
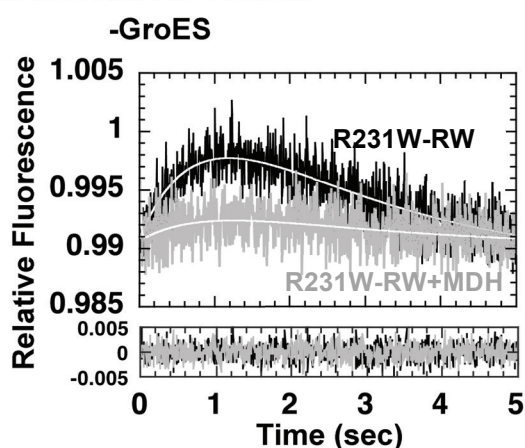


図 3-21. 基質存在下のストップ・フロー蛍光分析

(A) GroEL SR1-RW は、MDH 存在下において、Phase B と Phase C に対応する蛍光強度変化が減少した。GroES 非存在下 (A-左図) において、MDH 非存在下の Phase C

の Amplitude は -0.043 ± 0.00055 , MDH 存在下は -0.0042 ± 0.00011 となり, 10 倍の差が確認された。GroES 存在下においても, 基質タンパク質が存在すると蛍光強度変化が減少しており, 基質タンパク質の結合により, アピカルドメインに負荷がかかっていると考えられる。

(B) 以前の研究で, ダブルリングの GroEL R231W に基質タンパク質が結合することにより, Phase C, PhaseD に蛍光強度の減少が確認されている³⁷。GroES 及び基質タンパク質存在下において, シングルリングの GroEL SR1-R231W は Phase S の蛍光強度変化の減少が観察されたが, ダブルリングの GroEL R231W は Phase S の蛍光強度変化の減少は観察されなかった。シングルリング変異体は, 基質タンパク質の内包化, 結合様式が野生型 GroEL と異なる可能性がある可能性が示唆される。

3-4-5. 基質タンパク質存在下のストップ・フロー解析 (FRET 測定)

GroEL に変性タンパク質が結合した後の解離について調べるため, FRET 測定を行った。AEDANS を結合させた変性 GroEL を基質として用い, ATP 及び GroES の結合による基質タンパク質の解離に伴う蛍光強度変化を観察した

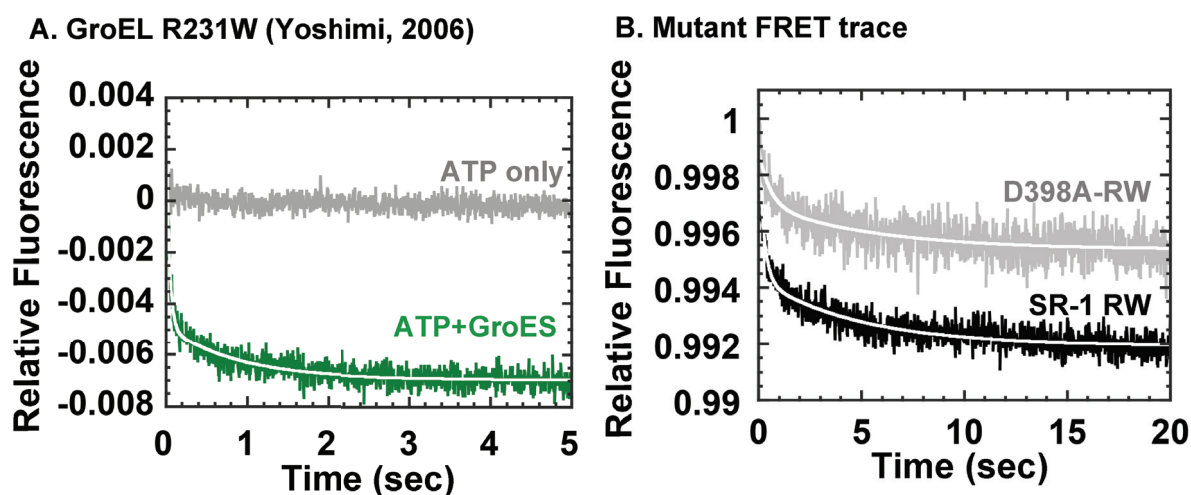


図 3-22. 基質タンパク質存在下のストップ・フロー解析 (FRET 測定)

(A) GroEL R231W は GroES の添加により反応速度の増加が確認されている³⁷。(k=43±8.7s⁻¹)

(B) GroEL D398A-RW 及び GroEL SR1-R231W の蛍光強度変化は GroEL R231W と比較して小さい値となった (GroEL D398A-R231W k=1.8s⁻¹ , GroEL SR1-R231W k=4.1s⁻¹)。これらの結果より, GroEL D398A-R231W, GroEL SR-1-R231W の基質タンパク質の解離は, 野生型よりも遅いことが分かった。シングルリング変異体は, 基質タンパク質の内包化, 結合様式が野生型 GroEL と異なる可能性があると考えられる。

4. 総合考察

4-1. 円順列変異体 GroEL CP86 の機能解析

GroEL CP86 は Equatorial domain に新末端が導入されており，N 末端から数えて 4 残基から 8 残基に ATP の β ， γ リン酸と Mg^{2+} の結合に必要な配列が存在する（図 3-1）。ATP 結合サイトが末端部位に近い場所にあるため，ATP との結合，又は加水分解能の抑制が予想された。ATPase 活性測定の結果，GroEL CP86 の ATPase 活性は野生型の半分程度であったが，ATP と結合，加水分解することが分かった。また，GroES の添加により ATPase 活性が約半分となり，GroEL と GroES が野生型と同じような仕組みで機能していると考えられる（図 3-4）。GroEL CP86 のアピカルドメイン，インターミディエイトドメインのアミノ酸配列は野生型と同一であるため，GroES との相互作用に影響が少なかったと考えられる。

GroEL CP86 の MDH のリフォールディング能は野生型 GroEL よりも若干低い程度であった（図 3-5）。MDH は二量体であるので，キャビティ内への落とし込み，GroES の解離による GroEL からの放出がなければ活性は回復しない。よって GroEL CP86 のシャペロニンサイクルは働いていると考えられる。Rhodanese のリフォールディング能は，野生型 GroEL の 20% に低下した。（図 3-5）。Rhodanese のリフォールディング能が低くなった原因の一つとして，基質タンパク質との相互作用が減少し，キャビティ内部に基質を落としこみにくくなった可能性が考えられる。しかし，BeFx を使用した GroEL-GroES-Rhodanese 複合体形成実験の結果，Rhodanese をキャビティ内部に取り込んでいることが分かった（図 3-7）。基質の種類によって選択的にフォールディング補助能力の違いが見られたことは，基質タンパク質の折りたたみ経路が複数存在する証拠であると考えられた。

また，円順列変異型 GroEL の末端部位の開裂による影響を調べるため，末端部位をジスルフィド結合により連結する変異体（GroEL CP86 C4）の機能解析を行った。GroEL CP86 C4 は CD 測定の結果，酸化サンプル，還元サンプルともに二次構造は野

生型とほぼ同等であった（図 3-10）。Gdn-HCl を用いた構造安定性の実験においては野生型 GroEL と同程度の構造安定性を保持していた（図 3-12）。末端同士の再連結により、構造安定性が増加したと考えられる。ATPase 活性測定では、酸化処理を行うことにより、ATPase 活性が上昇した（図 3-13）。また、Rhodanese リフォールディング実験では酸化サンプルのリフォールディング能は、GroEL CP86 のリフォールディング能よりも増加した（図 3-14）。末端部位の連結によって、シャペロニン機能の改善が見られたため、エクアトリアルドメインのヌクレオチド結合部位付近のつながりが野生型 GroEL の機能に密接に関係していると考えられた。

円順列変異体は野生型の N 末端と C 末端が繋がった状態にあるため、野生型 GroEL の N 末端と C 末端が繋がった変異体と比較して機能解析を行うことが望ましい。野生型 GroEL の末端部位を連結した変異体の Rhodanese のリフォールディング能が GroEL CP86 C4 のリフォールディング能と同等であれば、末端部位の再連結による機能性の向上についてさらに強く説明することができるものと思われる。ただし、円順列変異型 GroEL の立体構造解析は未だになされていない。円順列変異によるポリペプチド鎖の開裂がシャペロニン機能に及ぼす影響を、立体構造と比較して解析することで GroEL の機能性に関するさらなる知見が得られるものと考えられる。

表 4-1. GroEL CP86, CP86-C4 の機能解析

	WT	CP86	CP86 C4
ATPase Activity	100%	50%	100%
Interaction with GroES	◎	◎	◎
MDH Refolding	○	○	○
Rhodanese Refolding	100%	20%	60%
Stability	○	○	◎

4-2. ストップト・フロー蛍光分析によるシャペロニン GroEL の機能解析

近年のクライオ電子顕微鏡を用いた研究により、Clare らは、GroEL に ATP が結合した後の 5 段階の立体構造 (T, Rs₁, Rs₂, R-open, R-ES) を示した (図 1-6) ³⁴。ストップト・フロー蛍光分析で得られる素過程も 5 段階 (Phase A, B, C, D, S) が確認されており ³⁷、電子顕微鏡により明らかとなった主要な構造変化の数と一致する。ストップト・フロー蛍光分析によって得られる素過程と Clare らの立体構造との比較に加え、基質タンパク質存在下におけるアピカルドメインの構造変化より、シャペロニンサイクルについて考察を行った。

4-2-1. サブユニットを構成するドメイン間の繋がり

円順列変異体 (GroEL CP86-RW) のストップト・フロー蛍光分析では、野生型 GroEL で観測される大きな動的变化の一部が観察されなくなり、反応開始直後の Phase A とゆるやかな Phase B に相当するシグナルが確認された (図 3-17)。よって、アピカルドメインの構造変化がほとんど生じないことが明らかとなった。しかしながら、この変異体は基質タンパク質のリフォールディング能を保持し (図 3-5)、GroEL-GroES-Rhodanese の複合体を形成した (図 3-7)。以上の結果より、GroEL と GroES の結合、基質タンパク質の保護にはアピカルドメインの大きな構造変化を伴わないことが示唆された。よって、ストップト・フロー蛍光分析で観察される Phase A は ATP と GroES の結合に関連すると考えられる (図 4-1)。また、GroEL の反応初期段階にあたるため、Clare らが明らかにした立体構造変化の初期段階 T→Rs₁ に相当すると考えられる。

GroEL CP86-RW は、GroES 非存在下では動的变化がほとんど観察されなかったが、GroES 存在下では Phase S にあたる動的变化が観察された (図 3-17)。GroES との結合による構造変化が確認されたため、GroES との相互作用により、Rs₁~R-open への構造変化が進行したと考察される。また、Phase S の動的变化は、他の変異体 (GroEL SR1-RW, GroEL CP376-RW) ⁴¹ においても確認されたため、GroES との結合は変異

導入による様々な制約に関係なく進行すると考えられる。そこで、GroES の結合 (R-ES) による構造変化と、GroEL サブユニットの R-open に至る構造変化 ($R_{S1} \rightarrow R_{S2} \rightarrow R\text{-open}$) は独立して動いていることが示唆される。

4-2-2. 2 つのリングが形成する四次構造

当研究室の谷口氏の研究により、GroEL SR1-RW は Phase D に相当する動的变化が観察されないことが確認されている²⁰。本研究では、GroEL SR1-RW に変性タンパク質を結合した後でストップ・フロー蛍光分析を行ったところ、基質タンパク質が結合した状態において、Phase B および Phase C の Amplitude が 10 倍抑制された (図 3-20)。この結果より、GroEL SR1-RW は基質タンパク質の結合によるアピカルドメインへの負荷に敏感であると考えられる。GroEL SR1-RW はシングルリングで働くため、Phase B 及び Phase C は 7 量体リング内で生じる構造変化 (ダブルリングによって調節されない構造変化) を表していると示唆される (図 4-1)。

また、GroES 及び基質タンパク質存在下において、GroEL SR1-RW, GroEL R231W では、Phase S の蛍光強度変化に差が見られたことより、GroES の結合によるアピカルドメインの構造変化は GroEL ダブルリングの存在によって作用されると考えられる。アピカルドメインは変性タンパク質と GroES が結合した後でこのタンパク質分子を GroEL の中に閉じ込める際にダイナミックに構造を変化させることが知られているので、これらの実験結果はアピカルドメインの大規模な構造変化に GroEL の 2 つのリングが形成する「土台 ; 基礎」が大変重要であることを示唆した。

また、アピカルドメインに結合した変性タンパク質の解離を FRET 測定により確認したところ、GroEL D398A-RW, GroEL SR-1-RW の基質タンパク質の解離速度は、野生型よりも遅いことが分かった。シングルリング変異体は、基質タンパク質の内包化、結合様式が野生型 GroEL と異なる可能性があると考えられる。

4-2-3. ATP 加水分解活性

GroEL D398A は ATP 加水分解速度が非常に遅い変異体であり、ATP 結合後 5 秒間の測定では、Phase C の動的変化が観察されなかった (図 3-18)。当研究室の吉見氏の研究により、GroEL にあらかじめ変性 MDH を結合することによって、Phase C の動的変化が減少することが確認されている³⁷。また、アピカルドメインとインターミディエイトドメインのヒンジ部位が開裂した円順列変異体 (GroEL CP376-RW) においても Phase C の動的変化が観察されなかった⁵⁰。以上の結果より、Phase C は、GroEL-GroES-ADP 複合体 (図 1-2) に特徴される「GroEL-Open 構造」に移行する際の大きな立体構造変化に相当すると予測される。

GroEL D398A-RW の動的変化について詳細に調べるため、測定時間を 5 秒から 100 秒にして観察したところ、消失していると思われた構造変化は、その速度が大幅に低下していることが明らかになった (図 3-18)。GroEL D398A-RW の Phase C の速度 ($k=0.019\pm 0.00029\text{ s}^{-1}$) と ATP 加水分解の反応速度 ($k=0.12\text{ s}^{-1}$) を比較すると、2つの反応速度が一致しなかったため、Phase C は ATP の加水分解と関連がないことが示唆された。そこで、Phase C と ATPase 活性との関連を解明するため、加水分解されないヌクレオチドアナログ AMP-PNP を用い解析を行ったところ、Phase C が観察されなかった (図 3-18)。

この結果は、Phase C が ATPase 活性と関連することを支持する結果となったが、GroEL D398A は野生型と異なる性質を持つため、野生型に近い GroEL R231W を用いて AMP-PNP の実験を行った。実験の結果、5 秒測定および 100 秒測定において、ゆるやかな動的変化が観察され、Phase C が消失することはなかった (図 3-19)。よって、AMP-PNP は GroEL の反応速度が遅くなるように作用しており、Phase C の開始と ATP 加水分解の相互依存に関連がないと考えられる。

398 番目のアスパラギン酸の側鎖は、ATP の γ リン酸と相互作用し、後のヘリックス M の配向の安定化に寄与する。Clare らの示した T \rightarrow R_{s1} の構造変化に

よって生じるヘリックス M の再配置が Phase C の速度増加に関連すると考えられる。

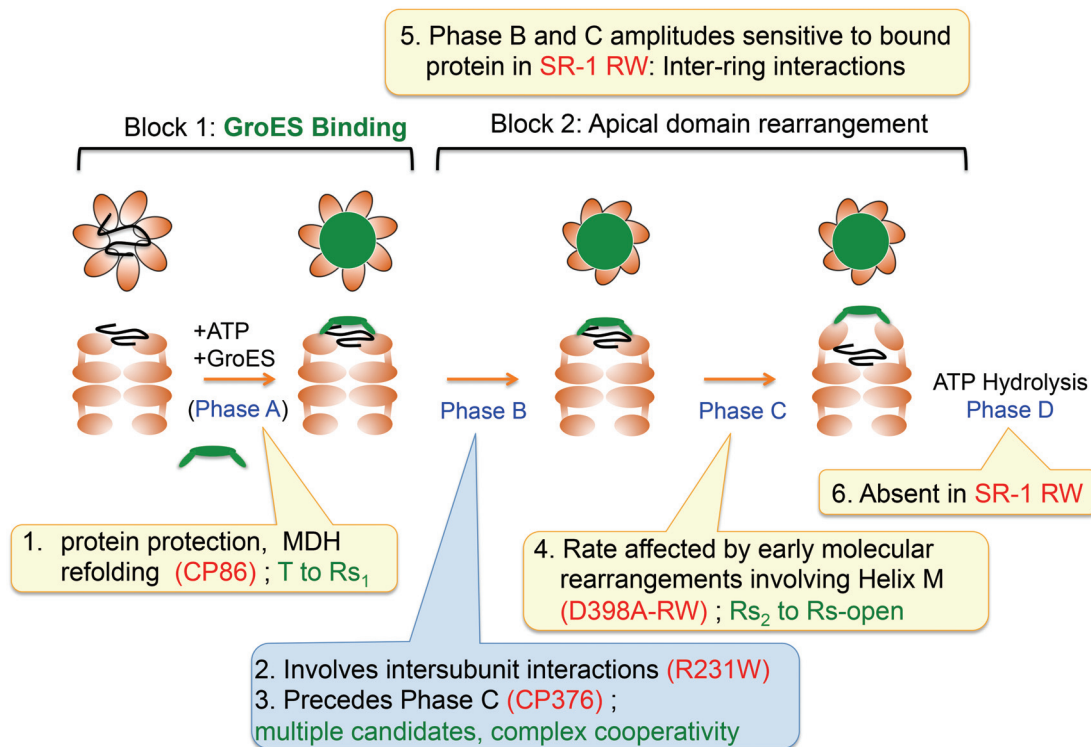


図 4-1. ストップ・フローによって観測される Phase と GroEL の構造遷移

以上のように、本研究では、3 種類の特徴的な変異体を用い、シャペロニン GroEL 構造変化に関連する新しい事実を明らかにし、シャペロニン GroEL の複雑な動的メカニズムについて新たな知見を得ることに成功した。細胞内にはシャペロニン依存的に折りたたみを行うタンパク質が数多く存在するため、シャペロニンの動的メカニズムの解明は、細胞内のイベントを捉える上で重要な内容であると考えられる。本研究では、基質タンパク質として MDH を用いたが、他の基質タンパク質を用いアピカルドメインの動的メカニズムを探ることにより、タンパク質のフォールディングに関する新たな知見が得られることが期待される。ストップ・フロー法により、シャペロニンに関するさらなる知見が得られることを期待したい。

謝辞

本研究を進めるにあたり，終始ご助言頂きました，河田康志教授，溝端知宏准教授，本郷邦広助教に心より感謝致します。

さらに実験中，論文執筆中に様々な面で御協力頂きました，蛋白質工学研究室の皆様
に重ねて御礼申し上げます。

引用文献

1. Anfinsen, C. B. (1973). Principles that govern the folding of protein chains. *Science*, 181(4096), 223-230.
2. Ellis, R. J. (2001). Macromolecular crowding: obvious but underappreciated. *Trends Biochem Sci*, 26(10), 597-604.
3. Ritossa, P. (1962). [Problems of prophylactic vaccinations of infants]. *Riv Ist Sieroter Ital*, 37, 79-108.
4. Ellis, J. (1987). Proteins as molecular chaperones. *Nature*, 328(6129), 378-379. doi: 10.1038/328378a0
5. Schlieker, C., Bukau, B., & Mogk, A. (2002). Prevention and reversion of protein aggregation by molecular chaperones in the E. coli cytosol: implications for their applicability in biotechnology. *J Biotechnol*, 96(1), 13-21.
6. Ranson, N. A., White, H. E., & Saibil, H. R. (1998). Chaperonins. *Biochem J*, 333 (Pt 2), 233-242.
7. Hendrick, J. P., & Hartl, F. U. (1993). Molecular chaperone functions of heat-shock proteins. *Annu Rev Biochem*, 62, 349-384. doi: 10.1146/annurev.bi.62.070193.002025
8. Kubota, H., Matsumoto, S., Yokota, S., Yanagi, H., & Yura, T. (1999). Transcriptional activation of mouse cytosolic chaperonin CCT subunit genes by heat shock factors HSF1 and HSF2. *FEBS Lett*, 461(1-2), 125-129.

9. 永田和宏, 森正敬, 吉田賢右 (2001) 「分子シャペロンによる細胞機能制御」
シュプリンガー・フェアラーク東京株式会社出版, 4-10
10. 遠藤斗志也, 森和俊, 田口英樹 (2007) 「タンパク質の一生集中マスター」
羊土社, 51
11. Hoffmann, A., Bukau, B., & Kramer, G. (2010). Structure and function of the molecular chaperone Trigger Factor. *Biochim Biophys Acta*, 1803(6), 650-661. doi: 10.1016/j.bbamcr.2010.01.017
12. Tokuriki, N., & Tawfik, D. S. (2009). Chaperonin overexpression promotes genetic variation and enzyme evolution. *Nature*, 459(7247), 668-673. doi: 10.1038/nature08009
13. Chen, G., Bradford, W. D., Seidel, C. W., & Li, R. (2012). Hsp90 stress potentiates rapid cellular adaptation through induction of aneuploidy. *Nature*, 482(7384), 246-250. doi: 10.1038/nature10795
14. Goloubinoff, P., Gatenby, A. A., & Lorimer, G. H. (1989). GroE heat-shock proteins promote assembly of foreign prokaryotic ribulose biphosphate carboxylase oligomers in *Escherichia coli*. *Nature*, 337(6202), 44-47. doi: 10.1038/337044a0
15. Goloubinoff, P., Christeller, J. T., Gatenby, A. A., & Lorimer, G. H. (1989). Reconstitution of active dimeric ribulose biphosphate carboxylase from an unfoiled state depends on two chaperonin proteins and Mg-ATP. *Nature*, 342(6252), 884-889. doi: 10.1038/342884a0
16. Xu, Z., Horwich, A. L., & Sigler, P. B. (1997). The crystal structure of the asymmetric GroEL-GroES-(ADP)₇ chaperonin complex. *Nature*, 388(6644), 741-750. doi: 10.1038/41944

17. Kerner, M. J., Naylor, D. J., Ishihama, Y., Maier, T., Chang, H. C., Stines, A. P., . . . Hartl, F. U. (2005). Proteome-wide analysis of chaperonin-dependent protein folding in *Escherichia coli*. *Cell*, 122(2), 209-220. doi: 10.1016/j.cell.2005.05.028
18. Brocchieri, L., & Karlin, S. (2000). Conservation among HSP60 sequences in relation to structure, function, and evolution. *Protein Sci*, 9(3), 476-486. doi: 10.1110/ps.9.3.476
19. Chaudhry, C., Horwich, A. L., Brunger, A. T., & Adams, P. D. (2004). Exploring the structural dynamics of the *E.coli* chaperonin GroEL using translation-libration-screw crystallographic refinement of intermediate states. *J Mol Biol*, 342(1), 229-245. doi: 10.1016/j.jmb.2004.07.015
20. Taniguchi, M., Yoshimi, T., Hongo, K., Mizobata, T., & Kawata, Y. (2004). Stopped-flow fluorescence analysis of the conformational changes in the GroEL apical domain: relationships between movements in the apical domain and the quaternary structure of GroEL. *J Biol Chem*, 279(16), 16368-16376. doi: 10.1074/jbc.M3118062002
21. Boisvert, D. C., Wang, J., Otwinowski, Z., Horwich, A. L., & Sigler, P. B. (1996). The 2.4 Å crystal structure of the bacterial chaperonin GroEL complexed with ATP gamma S. *Nat Struct Biol*, 3(2), 170-177.
22. Rye, H. S., Burston, S. G., Fenton, W. A., Beechem, J. M., Xu, Z., Sigler, P. B., & Horwich, A. L. (1997). Distinct actions of cis and trans ATP within the double ring of the chaperonin GroEL. *Nature*, 388(6644), 792-798. doi: 10.1038/42047

23. Ranson, N. A., Farr, G. W., Roseman, A. M., Gowen, B., Fenton, W. A., Horwich, A. L., & Saibil, H. R. (2001). ATP-bound states of GroEL captured by cryo-electron microscopy. *Cell*, 107(7), 869-879.
24. Shiseki, K., Murai, N., Motojima, F., Hisabori, T., Yoshida, M., & Taguchi, H. (2001). Synchronized domain-opening motion of GroEL is essential for communication between the two rings. *J Biol Chem*, 276(14), 11335-11338. doi: 10.1074/jbc.M010348200
25. Weissman, J. S., Hohl, C. M., Kovalenko, O., Kashi, Y., Chen, S., Braig, K., . . . Horwich, A. L. (1995). Mechanism of GroEL action: productive release of polypeptide from a sequestered position under GroES. *Cell*, 83(4), 577-587.
26. Horwich, A. L., Burston, S. G., Rye, H. S., Weissman, J. S., & Fenton, W. A. (1998). Construction of single-ring and two-ring hybrid versions of bacterial chaperonin GroEL. *Methods Enzymol*, 290, 141-146.
27. Rye, H. S., Roseman, A. M., Chen, S., Furtak, K., Fenton, W. A., Saibil, H. R., & Horwich, A. L. (1999). GroEL-GroES cycling: ATP and nonnative polypeptide direct alternation of folding-active rings. *Cell*, 97(3), 325-338.
28. Ueno, T., Taguchi, H., Tadakuma, H., Yoshida, M., & Funatsu, T. (2004). GroEL mediates protein folding with a two successive timer mechanism. *Mol Cell*, 14(4), 423-434.
29. Sameshima, T., Ueno, T., Iizuka, R., Ishii, N., Terada, N., Okabe, K., & Funatsu, T. (2008). Football- and bullet-shaped GroEL-GroES complexes coexist during the reaction cycle. *J Biol Chem*, 283(35), 23765-23773. doi: 10.1074/jbc.M802541200

30. Koike-Takeshita, A., Yoshida, M., & Taguchi, H. (2008). Revisiting the GroEL-GroES reaction cycle via the symmetric intermediate implied by novel aspects of the GroEL(D398A) mutant. *J Biol Chem*, 283(35), 23774-23781. doi: 10.1074/jbc.M802542200
31. Nojima, T., & Yoshida, M. (2009). Probing open conformation of GroEL rings by cross-linking reveals single and double open ring structures of GroEL in ADP and ATP. *J Biol Chem*, 284(34), 22834-22839. doi: 10.1074/jbc.M109.020057
32. Taguchi, H. (2005). Chaperonin GroEL meets the substrate protein as a "load" of the rings. *J Biochem*, 137(5), 543-549. doi: 10.1093/jb/mvi069
33. Yifrach, O., & Horovitz, A. (1994). Two lines of allosteric communication in the oligomeric chaperonin GroEL are revealed by the single mutation Arg196-->Ala. *J Mol Biol*, 243(3), 397-401. doi: 10.1006/jmbi.1994.1667
34. Clare, D. K., Vasishtan, D., Stagg, S., Quispe, J., Farr, G. W., Topf, M., . . . Saibil, H. R. (2012). ATP-triggered conformational changes delineate substrate-binding and -folding mechanics of the GroEL chaperonin. *Cell*, 149(1), 113-123. doi: 10.1016/j.cell.2012.02.047
35. Fei, X., Yang, D., LaRonde-LeBlanc, N., & Lorimer, G. H. (2013). Crystal structure of a GroEL-ADP complex in the relaxed allosteric state at 2.7 Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(32), E2958-2966. doi: 10.1073/pnas.1311996110
36. Chen, D. H., Madan, D., Weaver, J., Lin, Z., Schroder, G. F., Chiu, W., & Rye, H. S. (2013). Visualizing GroEL/ES in the act of encapsulating a folding protein. *Cell*, 153(6), 1354-1365. doi: 10.1016/j.cell.2013.04.052

37. Yoshimi, T., Hongo, K., Mizobata, T., & Kawata, Y. (2006). Multiple structural transitions of the GroEL subunit are sensitive to intermolecular interactions with cochaperonin and refolding polypeptide. *J Biochem*, 139(3), 407-419. doi: 10.1093/jb/mvj043
38. Nakamura, T., & Iwakura, M. (1999). Circular permutation analysis as a method for distinction of functional elements in the M20 loop of Escherichia coli dihydrofolate reductase. *J Biol Chem*, 274(27), 19041-19047.
39. Iwakura, M., Nakamura, T., Yamane, C., & Maki, K. (2000). Systematic circular permutation of an entire protein reveals essential folding elements. *Nat Struct Biol*, 7(7), 580-585. doi: 10.1038/76811
40. Graf, R., & Schachman, H. K. (1996). Random circular permutation of genes and expressed polypeptide chains: application of the method to the catalytic chains of aspartate transcarbamoylase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(21), 11591-11596.
41. Mizobata, T., Uemura, T., Isaji, K., Hirayama, T., Hongo, K., & Kawata, Y. (2011). Probing the functional mechanism of Escherichia coli GroEL using circular permutation. *PLoS One*, 6(10), e26462. doi: 10.1371/journal.pone.0026462
42. Studier, F. W. (2005). Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expr Purif*, 41(1), 207-234.
43. Kubo, T., Mizobata, T., & Kawata, Y. (1993). Refolding of yeast enolase in the presence of the chaperonin GroE. The nucleotide specificity of GroE and the role of GroES. *J Biol Chem*, 268(26), 19346-19351.

44. Hayer-Hartl, M. (2000). Assay of malate dehydrogenase. A substrate for the E. coli chaperonins GroEL and GroES. *Methods Mol Biol*, 140, 127-132. doi: 10.1385/1-59259-061-6:127
45. Martin, J., Langer, T., Boteva, R., Schramel, A., Horwich, A. L., & Hartl, F. U. (1991). Chaperonin-mediated protein folding at the surface of groEL through a 'molten globule'-like intermediate. *Nature*, 352(6330), 36-42. doi: 10.1038/352036a0
46. Taguchi, H., Tsukuda, K., Motojima, F., Koike-Takeshita, A., & Yoshida, M. (2004). BeF(x) stops the chaperonin cycle of GroEL-GroES and generates a complex with double folding chambers. *J Biol Chem*, 279(44), 45737-45743. doi: 10.1074/jbc.M406795200

Probing the Dynamic Process of Encapsulation in *Escherichia coli* GroEL

Toshifumi Mizuta¹, Kasumi Ando¹, Tatsuya Uemura^{2*}, Yasushi Kawata^{1,2}, Tomohiro Mizobata^{1,2*}

¹ Department of Biotechnology, Graduate School of Engineering, Tottori University, Tottori, Japan, ² Department of Biomedical Science, Graduate School of Medical Sciences, Tottori University, Tottori, Japan

Abstract

Kinetic analyses of GroE-assisted folding provide a dynamic sequence of molecular events that underlie chaperonin function. We used stopped-flow analysis of various fluorescent GroEL mutants to obtain details regarding the sequence of events that transpire immediately after ATP binding to GroEL and GroEL with prebound unfolded proteins. Characterization of GroEL CP86, a circularly permuted GroEL with the polypeptide ends relocated to the vicinity of the ATP binding site, showed that GroES binding and protection of unfolded protein from solution is achieved surprisingly early in the functional cycle, and in spite of greatly reduced apical domain movement. Analysis of fluorescent GroEL SR-1 and GroEL D398A variants suggested that among other factors, the presence of two GroEL rings and a specific conformational rearrangement of Helix M in GroEL contribute significantly to the rapid release of unfolded protein from the GroEL apical domain.

Citation: Mizuta T, Ando K, Uemura T, Kawata Y, Mizobata T (2013) Probing the Dynamic Process of Encapsulation in *Escherichia coli* GroEL. PLoS ONE 8(10): e78135. doi:10.1371/journal.pone.0078135

Editor: Salvatore V. Pizzo, Duke University Medical Center, United States of America

Received: July 8, 2013; **Accepted:** September 16, 2013; **Published:** October 30, 2013

Copyright: © 2013 Mizuta et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This study was partially supported by a Grant-in-Aid for Scientific Research (C) (No. 22570119 to TM) from the Japan Society for the Promotion of Science (JSPS) of Japan, a Grant-in-Aid for Scientific Research on Priority Areas (No. 22020025 to YK) from The Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology (MEXT) of Japan, and also by grants to TM from the Faculty of Engineering, Tottori University and the Venture Business Laboratory, Tottori University. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interest exist.

* E-mail: mizobata@bio.tottori-u.ac.jp

* Current address: Takara Shuzo Co. LTD., Kyoto, Japan

Introduction

Analyses of macromolecular complexes such as the *E. coli* chaperonin GroE involve a multitude of functionally relevant events, dynamic transitions of the molecular machinery, and various structural characteristics of the molecular architecture that must all be united coherently and consistently in order to understand the underlying molecular mechanism in detail. To date, many studies have succeeded in elucidating and correlating these varied details of the chaperonin to form a well defined overview of the molecular mechanism, and recent experiments are involved in forming increasingly detailed views of various segments of the mechanism [1–3]. One such segment involves the process by which GroEL transfers proteins into the protective central cavity formed by the unique double ringed quaternary structure of the 14 GroEL subunits [4–7]. This process is initiated by binding of ATP to GroEL and involves intermolecular interactions between the unfolded protein molecule and the co-chaperonin, GroES.

Various studies have indicated that the process of protein encapsulation initiated by ATP binding to GroEL is a multi-step transition, involving many experimentally distinguishable substates that must be formed to complete the final, sequestered state of the chaperonin complex [8–11]. Cryo-electron microscopy (cryo-EM) experiments have revealed a number of snapshots of individual conformations that GroE forms during this process [12,13]. In stopped-flow experiments, a number of groups including ours have shown that this process involves numerous distinct structural transitions with varying kinetic characteristics [14–21]. The challenge at present is to meld these structural snapshots (*e. g.*,

electron microscopy) and kinetic (*e. g.* stopped-flow) details of the chaperonin mechanism with functional aspects to form a unified mechanism of the overall process. Clare and coworkers have recently identified numerous substates of *E. coli* GroEL D398A that are formed immediately after ATP binding [13]. From a principle of minimum structural alterations between substates, they postulated a sequential mechanism that describes the initial molecular trajectory of GroE encapsulation that culminates in GroES binding and formation of the capsule.

The present study represents our attempts to find kinetic evidence that may add to our understanding of the chaperonin encapsulation mechanism, utilizing a mutation that introduces a unique tryptophan into the GroEL apical domain (GroEL R231W, Fig. 1, *top left*). Using the original GroEL R231W mutant, we have demonstrated that GroEL undergoes five kinetically distinguishable transitions (Phases A to D, Phase S) during the process of encapsulation (Fig. 1, *lower left*; [20]). Each of these kinetic transitions displays characteristics that are relevant to the chaperonin mechanism. For example, the apparent rate constant of one specific kinetic transition (Phase B, fluorescence decrease, $k_{\max} = 82 \text{ s}^{-1}$) displays complex cooperative behavior with regard to ATP concentration [21], and is postulated to represent intersubunit rearrangements. Also, another phase (Phase C, fluorescence increase, $k_{\max} = 2 \text{ s}^{-1}$) likely reflects a localized movement that involves displacement of the unfolded protein bound to the apical domain of the initial binary complex, because the rate of this specific phase is sensitive to bound substrate protein [20]. Phase D is also sensitive to the presence of bound unfolded

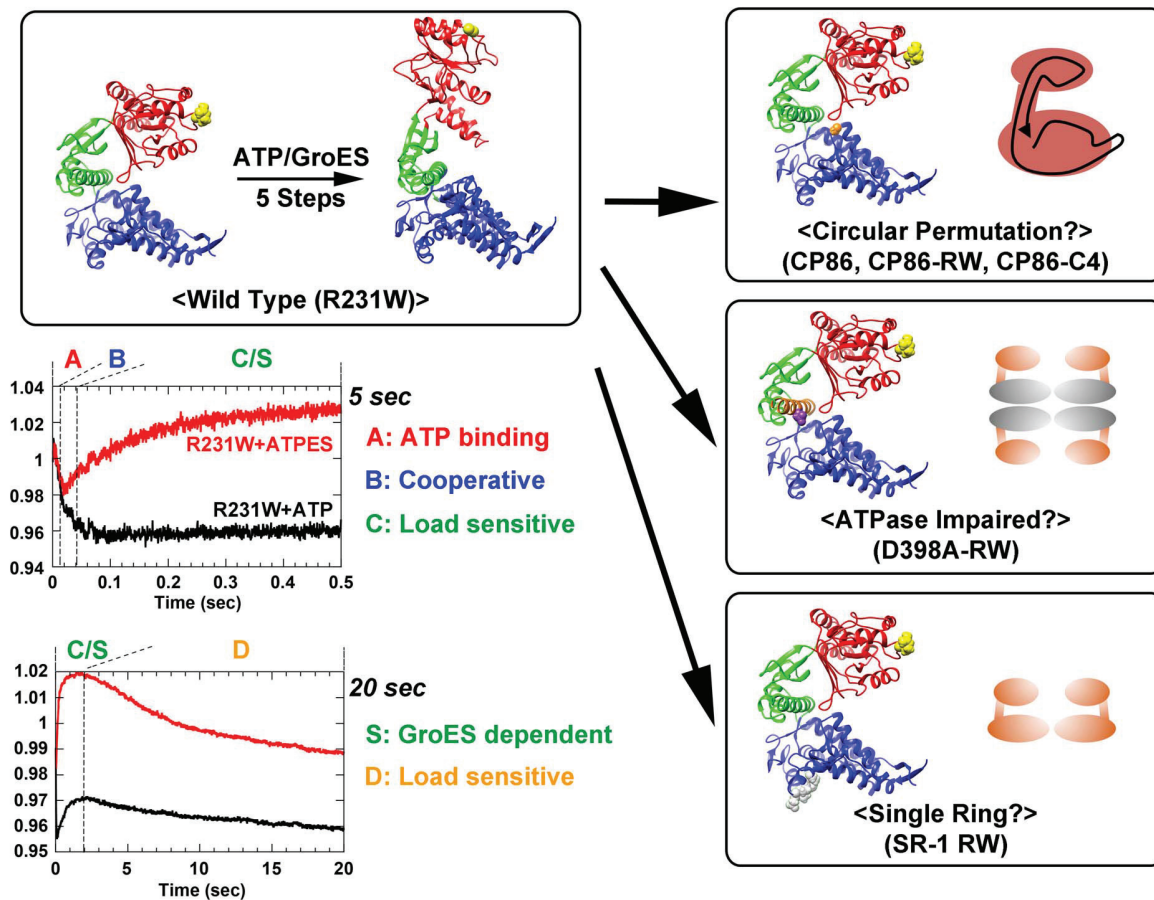


Figure 1. Conceptual diagram and subunit structures depicting the various mutations used in the present study. GroEL R231W is a fluorescent mutant of GroEL with wild-type like functional characteristics (upper left). Stopped-flow analysis using this mutant revealed a total of five distinct kinetic transitions that are triggered immediately after ATP binding (denoted Phases A–D and Phase S; lower left), and each phase displays characteristics relevant to the chaperonin mechanism (experimental traces are derived from previous experiments described in Yoshimi *et al* [20]). In the present study, this mutation was introduced to the corresponding sites of three separate mutants: CP86, a circularly permuted GroEL mutant (upper right; Gly86 is shown in orange space filled form), D398A, a mutant with greatly diminished ATPase activity (center right; Asp398 is shown in purple space filled form and Helix M is colored orange), and SR-1, a single ring GroEL variant (lower right; the four residues of the SR-1 mutation, Arg452, Glu461, Ser463, and Val464, are shown in gray space filled form). Stopped-flow analysis was performed to evaluate the effect of each mutation on the dynamics of GroEL reported by this tryptophan probe. In each of the representative subunit structures, Arg231 is shown in yellow space filled form, and the three domains of the GroEL subunit are colored as follows: apical; red, intermediate; green, equatorial; blue. Models were visualized in UCSF Chimera [41].

doi:10.1371/journal.pone.0078135.g001

protein (being suppressed upon binding of unfolded MDH to GroEL, [20]), and Phase S is observable only in the presence of the co-chaperonin GroES [20] (Fig. 1).

Building upon these prior findings, we describe here our efforts to elucidate the molecular characteristics of GroEL function using various fluorescent mutants tailored for stopped-flow analysis (Fig. 1). Notably, we include our findings using a newly characterized circular permutation GroEL mutant, CP86 (Fig. 1, top right). CP86 is a variant of the GroEL subunit where the polypeptide termini have been relocated to the immediate vicinity of the ATPase site. Experiments showed that this mutant displayed almost none of the kinetic transitions shown by the wild type chaperonin. Despite this radical alteration, we determined that this mutant was capable of binding GroES and protecting unfolded protein molecules from extraneous protease digestion, a characteristic previously attributed to the successful completion of protein encapsulation. Our results suggest that the encapsulation of unfolded protein molecules into the GroEL chamber may proceed

Table 1. N- and C-terminal sequences of circularly permuted GroEL mutants CP86, CP86-RW, and CP86-C4.

Mutant	C-terminal sequence	N-terminal sequence
CP86	<u>ANDAAGAN</u> ⁵⁵⁵	¹ MAAGDGTT
CP86-RW	<u>ANDAA</u> ⁵⁵⁰	¹ MGDGTT
CP86-C4	<u>ANDACCAN</u> ⁵⁵⁵	¹ MACCDGTT
Corresponding wild type sequence	⁸¹ <u>ANDAAGDGTT</u> ⁹⁰	

Underlines and wavy underlines denote the corresponding amino acid sequences in the original wild type sequence. In GroEL CP86-RW, an additional Arg to Trp mutation was introduced at position 149 in the mutant sequence. Amino acids in *italics* are residues that were introduced as a consequence of the circular permutation protocol, the four cysteine residues introduced to the CP86-C4 sequence are **bolded**.

doi:10.1371/journal.pone.0078135.t001

through two sequential processes, a preliminary process involving GroES binding that accords the unfolded protein a significant amount of protection from the environment, followed by a subsequent large scale rearrangement of the GroEL subunit and the apical domain. We also show results obtained from fluorescent variants of the ATPase-impaired mutant D398A (Fig. 1, *center right*) [10–12] and the single-ring GroEL mutant, SR-1 (Fig. 1, *bottom right*) [8,9] that suggest that encapsulation of unfolded proteins by GroE is essentially a multi-stage sequential process whose smooth execution is dependent on numerous structural factors of the GroEL architecture.

Materials and Methods

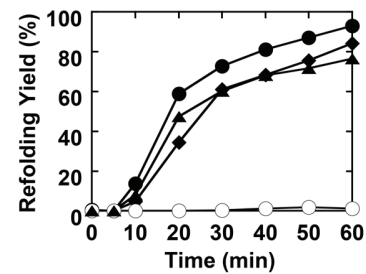
Proteins and Purification

GroEL CP86 was a circularly permuted mutant isolated from an initial screening of randomly permuted GroEL genes described in Mizobata *et al* [22]. The mutant was selected for its relatively stable expression in the supernatant fraction of *E. coli* cells. As described in Mizobata *et al.*, circularly permuted GroEL variants obtained *via* our protocol contain several extraneous amino acids that are not found in the original GroEL amino acid sequence.

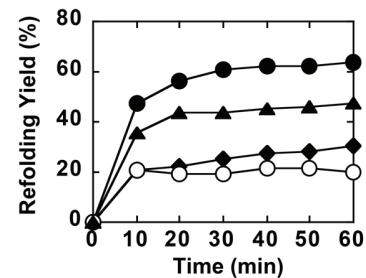
Two derivatives of the CP86 mutant were created in addition for use in further experiments. The CP86-C4 mutant was constructed in order to determine the specificity and reversibility of the circular permutation effect, and this mutant possesses four cysteine residues (Cys3, Cys4, Cys552, Cys553) dispersed at both ends of the polypeptide chain. The CP86-RW mutant is a derivative of CP86 with a tryptophan residue in the apical domain, in the position corresponding to Arg231 in the wild type sequence (position 149 in the actual mutant sequence), and this mutant was used in stopped-flow studies. Construction of the CP86-C4 and CP86-RW mutants were performed using the Quikchange site directed mutagenesis kit (Agilent Technologies) for point mutations. Additionally for CP86-RW, the terminal amino acid sequences were modified slightly in an attempt to improve expression. Details of the amino acid sequences are summarized in Table 1. The nucleotide sequences of the CP86, CP86-RW and CP86-C4 GroEL genes have been deposited in the GenBank database under GenBank Accession Number KC355805 (CP86), GenBank Accession Number KC415072 (CP86-RW), and GenBank Accession Number KC355806 (CP86-C4).

The construction and characterization of GroEL SR-1 RW has been previously published in Taniguchi *et al* [21]. GroEL D398A-RW was constructed using Quikchange site directed mutagenesis. Purification of GroEL SR-1 RW and D398A-RW were performed as described previously for GroEL SR-1 RW [21]. Both of these mutants were purified to sufficient purity for stopped-flow studies. Characterization of D398A-RW showed that, as in the original D398A mutant, the ATPase activity of this mutant was reduced

A. MDH Refolding



B. Rhodanese Refolding



C. ATPase

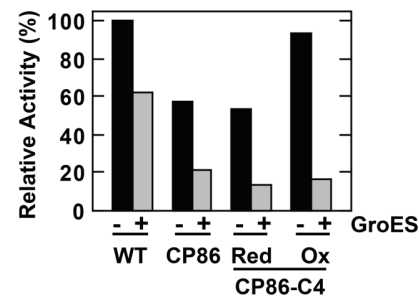


Figure 2. Functional assays of GroEL CP86 and oxidized glutathione-treated GroEL CP86-C4. A. Refolding assays of pig heart MDH. *Closed circles* denote refolding in the presence of wild type GroEL and GroES, *open circles* denote spontaneous refolding. *Closed diamonds* indicate refolding in the presence of CP86 and wild type GroES, and *closed triangles* indicate refolding in the presence of CP86-C4 pre-treated with oxidized glutathione in the presence of ATP. B. Refolding assays of bovine rhodanese. Legends are identical to panel A. C. ATPase activity of GroEL mutants. The concentration of inorganic phosphate released after 60 min is given as values relative to the basal ATPase activity seen for wild type GroEL in the absence of equimolar GroES (*leftmost solid bar*).

doi:10.1371/journal.pone.0078135.g002

greatly compared to the wild type. Purification of CP86 GroEL and derivatives was accomplished according to methods used to purify wild type GroEL [23]. However, after the final stage of the purification, an additional acetone precipitation step was added to enhance the purity of the samples. Ice-cold acetone was added to a final concentration of 40% v/v to GroEL samples (5 mg/ml) incubated on ice with mixing. After a 30 min incubation on ice, samples were centrifuged at 15,000×g for 30 min and the supernatant was recovered and dialyzed at 4°C against 50 mM Tris-HCl, pH 7.8 containing 2 mM EDTA overnight.

Preparation of Oxidized CP86-C4 Samples

Samples of GroEL CP86-C4 were mixed with 2 mM ATP in oxidizing buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.8, containing 10 mM magnesium acetate, 20 mM KCl, 1 mM EDTA, 5 mM oxidized

Table 2. Values of the kinetic constants derived from analyses of FRET traces shown in Fig. 8.

	Phase FRET		Phase FRET2	
	Amplitude	k (sec^{-1})	Amplitude	k (sec^{-1})
GroEL SR-1	0.0051±0.00021	4.1±0.29	0.0024±0.000067	0.21±0.012
GroEL D398A-RW	0.002±0.00024	1.8±0.46	0.0016±0.00015	0.18±0.034

doi:10.1371/journal.pone.0078135.t002

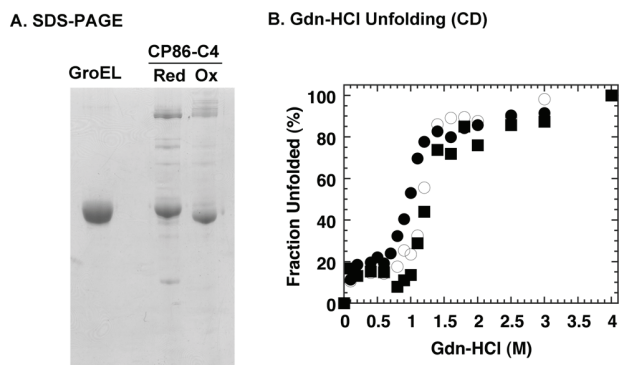


Figure 3. Characterization of CP86-C4 samples treated with oxidized glutathione. CP86-C4 was treated with oxidized glutathione as outlined in Materials and Methods. A. SDS-PAGE analysis of CP86-C4 samples in the absence of 2-mercaptoethanol, which shows a shift in gel position caused by formation of an intramolecular disulfide bond. B. Gdn-HCl unfolding profiles of wild type GroEL (open circles), GroEL CP86 (closed circles), and oxidized GroEL CP86-C4 (closed squares) monitored by the CD signal at 222 nm. GroEL was incubated in HEPES-KOH buffer, pH 7.8, containing 10 mM KCl, 5 mM magnesium acetate, and the indicated concentration of Gdn-HCl for 2 h at 25°C prior to measurement. A JASCO J-820 spectropolarimeter was used to measure the CD signal.

doi:10.1371/journal.pone.0078135.g003

glutathione, and 1 mM reduced glutathione) and then incubated at 37°C for 1 hr. After incubation, samples were dialyzed against dialysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.8 and 2 mM EDTA), quantitated, and used in various assays.

ATPase Assay

ATPase assays of GroEL CP86 and derivatives were performed colorimetrically as described in Kubo *et al* [24].

Refolding Assays

Refolding assays of bovine rhodanese and pig heart malate dehydrogenase (MDH) were performed according to previously published procedures [22,25]. Samples of MDH were obtained commercially from Roche Diagnostics; recombinant rhodanese expressed in *E. coli* was purified according to the purification protocol described in Miller *et al* [26]. The expression vector for rhodanese that we used contains an *E. coli* codon-optimized variant of the bovine rhodanese cDNA sequence, synthesized by Gene-Art (Germany).

Proteinase K Protection Assays of Unfolded Proteins Bound to Chaperonin

Proteinase K protection assays of beryllium fluoride (BeFx)-stabilized chaperonin:substrate complexes were performed as described in Mizobata *et al* [22].

Electron Microscopy

Electron microscopy of CP86 samples negatively-stained with uranyl acetate were performed essentially as described in Mizobata *et al*. [22], using a JEOL 1210 electron microscope at 80 kV.

Stopped-flow Fluorescence Analysis

Stopped-flow fluorescence analysis of GroEL mutants was performed as described in Mizobata *et al*. [22], using an upgraded Applied Photophysics SX17MV instrument at a photomultiplier

voltage of 400 V. The oligomer concentration of GroEL during measurement was set to 0.625 μ M for all experiments, and equimolar oligomeric concentrations of GroES were added to the nucleotide-containing reagents where indicated. The concentration of nucleotide added was set to 1 mM during measurement in the present study. In experiments that probed the effects of prebound MDH, we first denatured MDH samples (5 mg/ml) for 30 min at 37°C in 3 M guanidinium hydrochloride (Gdn-HCl) containing 6.25 mM dithiothreitol. This denatured MDH sample was then added to aliquots of GroEL (1 mg/ml) so that the ratio of MDH monomer to GroEL oligomer was 1:1 in SR-1 RW samples and 1:2 in GroEL R231W samples. The higher concentration of MDH concentration in the R231W samples was used in order to achieve binding of MDH to both rings of the chaperonin. These chaperonin-MDH samples were used after a 5 min pre-incubation at 25°C in stopped-flow experiments.

Experiments involving FRET between the tryptophan residue of GroEL mutants and chemically-labeled unfolded GroEL wild type (GroELwt) have been previously described in Yoshimi *et al* [20]. Briefly, 20 mg/ml GroELwt was incubated with 5 mM 5-(((2-Iodoacetyl)amino)ethyl)amino)naphthalene-1-sulfonic acid (IAEDANS) in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5, at 25°C for 30 min. After incubation, 10 mM 2-mercaptoethanol was added to stop the reaction and the sample was dialyzed overnight against 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5 containing 0.5 g/l acid-washed charcoal. The ratio of incorporated label to GroELwt subunit in samples obtained by this procedure was generally between 0.2 to 0.5 (quantitated using the molar extinction coefficient of 5,700 $\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ for AEDANS at 336 nm). AEDANS-GroELwt was denatured in 20 mM glycine-HCl buffer, pH 2.0, for 1h at 25°C and then mixed with an equimolar concentration of GroEL mutants. Data were first obtained using GroEL mutants with prebound AEDANS-GroELwt, and then data obtained in the absence of AEDANS-GroELwt was subtracted from this trace to obtain the FRET traces.

To facilitate comparison, raw fluorescence intensity traces in each figure have been shifted vertically so that the fluorescence value for each trace at the earliest data point equals 1. Fits to the raw data are displayed as white lines running through the trace in each panel; residuals are summarized in a sub panel below the main panel of each figure. Amplitudes and apparent rate constants derived from the fits are summarized in Table S1 (tryptophan fluorescence) and Table 2 (FRET).

Results

In the present study, we introduced the GroEL R231W mutation [21] into the corresponding site of three unrelated GroEL mutants (Fig. 1). The results obtained from each mutant addresses a specific section of the encapsulation mechanism that, when combined, provide details regarding the rapid events that follow immediately after ATP binding, culminating in the formation of an encapsulation complex containing GroEL, GroES, and unfolded protein. The stopped-flow fluorescence results are interpreted in the context of the results of GroEL R231W, which represents the kinetic behavior of wild type chaperonin.

GroEL CP86: Protein Sequestering and Subunit Dynamics

We have recently incorporated circular permutation in our research as a method to perturb the GroEL subunit and to induce changes in its function. Circular permutation involves modifying the amino acid sequence of the target protein so that N-terminal and C-terminal amino acids are shifted to a different portion of the

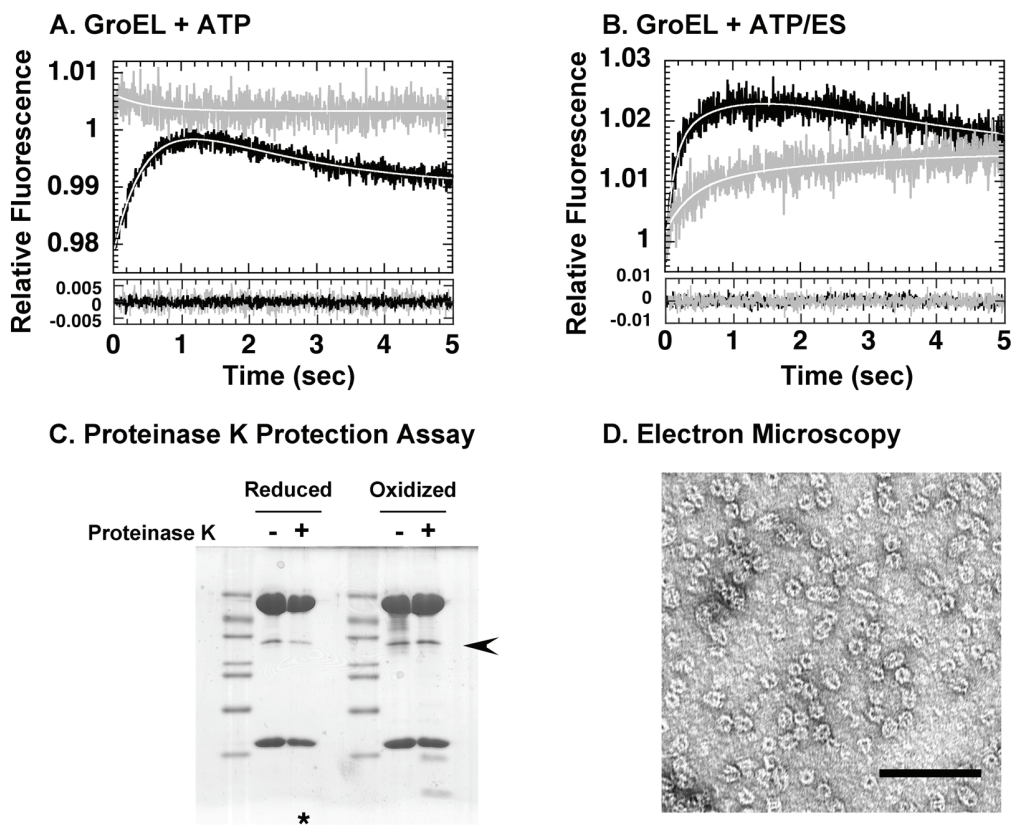


Figure 4. Analysis of the chaperonin cycle using CP86 variants. A. Stopped-flow analysis of GroEL CP86-RW upon addition of 1 mM ATP. *Black traces* correspond to GroEL R231W and denote wild-type like behavior. *Gray traces* correspond to GroEL CP86-RW. In this and all subsequent figures that involve fits of raw data to theoretical curves, the *lower panel* summarizes the residuals derived from each fit, with legends corresponding to the upper panel. B. Stopped-flow analysis of GroEL CP86-RW upon addition of ATP and equimolar GroES. Legends are as in A. C. Proteinase K protection assays of rhodanese molecule bound to oxidized and reduced GroEL CP86-C4. Samples shown are from solutions concentrated on an Amicon Ultra-0.5 100K centrifugal filter unit after a 30 min digestion with 1 μ g/ml Proteinase K at 25°C. The *arrowhead* denotes the position of rhodanese. The asterisk at the bottom of the gel indicates the sample that was subsequently used to prepare negatively stained samples analyzed in panel D. D. Electron micrographs of BeFx-stabilized, Proteinase K-treated samples of GroE-rhodanese ternary complexes prepared using reduced GroEL CP86-C4. Scale bar denotes 100 nm.
doi:10.1371/journal.pone.0078135.g004

protein molecule [27]. Application of random circular permutation to the *E. coli* GroEL subunit [22] produced a mutant (GroEL CP376) that was used in a previous study to demonstrate that Phase C exclusively reflects localized movements of the GroEL apical domain.

GroEL CP86 was a circularly permuted variant of GroEL that was also isolated in this initial effort, whose polypeptide ends were relocated to a position between residues 85 and 86, in the immediate vicinity of the ATP binding site in the equatorial domain (Fig. 1 and Table 1). Figs. 2A and B show refolding assays of MDH and rhodanese in the presence of GroEL CP86. The refolding assays showed that CP86 displayed differential effects toward the stringent refolding substrates rhodanese and MDH. The effects were very clear-cut; the ability to facilitate folding of MDH was completely retained in CP86 (Fig. 2A, *closed diamonds*) whereas the ability to assist rhodanese was decreased almost to insignificance (Fig. 2B, *closed diamonds*). In addition to this striking characteristic, the functional activity of CP86 was characterized by a decreased basal ATPase activity that remained sensitive to inhibition by GroES (Fig. 2C).

Our next step before proceeding further was to evaluate the specificity of the effects caused by the circular permutation. Since circular permutation in effect causes the disruption of the

polypeptide backbone, we reasoned that it might be possible to reverse these effects by inserting a disulfide bond to the mutation site. To this end we engineered another derivative of CP86 (CP86-C4), which contains tandem cysteine residues at both ends of the polypeptide chain (Table 1).

When we incubated CP86-C4 with oxidized glutathione in the presence of ATP, we induced functional and structural alterations to this mutant. Figs. 3A and B show experiments that demonstrate the effects of this treatment on the structural characteristics of CP86-C4, namely a shift in the gel mobility in non-reducing denaturing electrophoresis gels and an increased stability toward denaturation by Gdn-HCl. Both of these results support the formation of a disulfide bond between the polypeptide termini of CP86-C4 via the introduced cysteine residues.

Upon repeating the experiments performed on the original CP86 mutant, we now found that the oxidized CP86-C4 recovered its ability to assist the folding of rhodanese (Fig. 2B, *closed triangles*). Additionally, ATPase activity assays showed that the basal ATPase activity also increased to levels similar to the wild type chaperonin (Fig. 2C).

The refolding reactions of MDH and rhodanese most likely contained previously undetected differences that become apparent when folding in the presence of CP86. In order to probe this

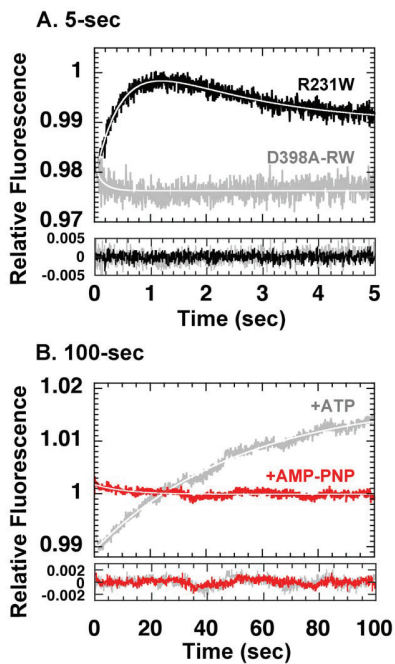


Figure 5. Stopped-flow analysis of GroEL D398A-RW. A. Analysis of fluorescence intensity changes upon addition of 1 mM ATP. The black trace indicates GroEL R231W, and the gray trace indicates D398A-RW. B. As in A, but with the duration of observation set to 100 sec. Gray trace indicates D398A-RW with ATP added (as in A), red trace indicates fluorescence changes upon addition of 1 mM AMP-PNP. doi:10.1371/journal.pone.0078135.g005

interesting finding in more detail, we next probed the dynamics of this mutant by stopped-flow analysis using a fluorescent analog of CP86, CP86-RW. Functional characteristics of the original CP86 mutant were retained in this new fluorescent variant. As shown in Fig. 4A, we found that in this mutant, ATP-triggered kinetic transitions involving the apical domain were greatly decreased, and consisted of an initial increase in fluorescence reminiscent of Phase A, followed by an extremely slow decrease in fluorescence, which might represent a greatly attenuated Phase B. Upon addition of GroES to the experiment (Fig. 4B), an increase in fluorescence was observed that could be fitted to a double exponential equation to yield two kinetic phases reminiscent of Phases C and S in GroEL R231W. The values of the rate constant and amplitude, when compared to the putatively corresponding phases in GroEL R231W, were both significantly attenuated, however (Table S1).

Next, we evaluated the ability of CP86 to encapsulate and protect unfolded rhodanese, by adding ATP, GroES, and BeFx to GroEL:rhodanese binary complexes and digesting the stabilized sample with Proteinase K. To our surprise, we found that GroEL CP86-C4 in its reduced state was capable of protecting unfolded rhodanese molecules even though it could not assist folding (Fig. 4C). Electron microscopy of these Proteinase K-treated chaperonin samples clearly showed CP86-C4 forming both typical bullet-like and football-like structures (Fig. 4D). Taken together with the stopped-flow results we conclude that CP86 is capable of protein encapsulation and protection in a manner similar to wild type GroEL, even when dynamic changes involving the apical domain are greatly restricted by mutation.

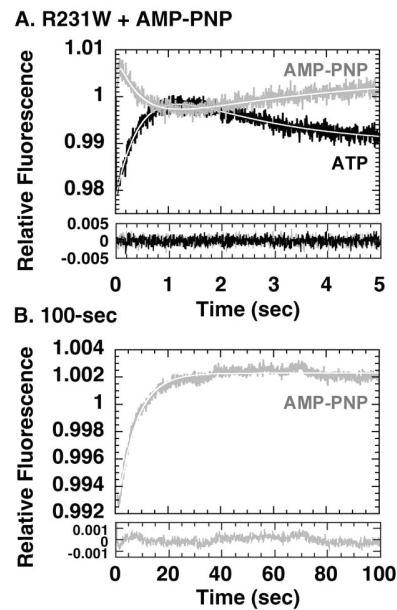


Figure 6. Stopped-flow analysis of GroEL R231W in the presence of AMP-PNP. A. 5-sec assay. The black trace represents fluorescence changes upon addition of ATP, the gray trace represents fluorescence changes upon addition of AMP-PNP. B. 100-sec assay. Legends are as in A. doi:10.1371/journal.pone.0078135.g006

GroEL D398A: Domain Movement and ATP Hydrolysis

To obtain hints regarding the relationship between the kinetic transitions detected by stopped-flow analysis and the ATPase activity of GroEL, we next utilized the unique characteristics of GroEL D398A, which displays an ATPase activity rate that is ~2% of wild-type [10,11].

As seen in Fig. 5A, we found that in GroEL D398A-RW, the kinetic profile observed upon ATP addition was altered, in a manner similar to that seen for CP376 characterized previously [22]. The effects of mutation were seen most strongly in Phase C, while other transitions such as Phase B were relatively untouched. When we extended our observations to ~100 sec after ATP addition however, we found that Phase C was not in fact suppressed in GroEL D398A-RW, but rather the rate was greatly decreased (Fig. 5B). Analysis of the apparent rate constant of this phase yielded a value that was decreased more than sixty-fold ($k = 0.019 \pm 0.00029 \text{ s}^{-1}$) compared to the wild-type analog ($k = 2.1 \pm 0.11 \text{ s}^{-1}$ for GroEL R231W; Fig. 4A, Table S1).

Since we found it revealing that such a drastic decrease in rate could be observed in the ATPase-limited D398A mutant, we probed further by performing similar stopped-flow experiments using non-hydrolyzable AMP-PNP. We found that in the presence of AMP-PNP, Phase C was now completely suppressed for the duration of the experiment (Fig. 5B). A very gradual and ill-defined fluorescence decrease was detected instead, after an initial small fluorescence increase. From Fig. 5B it seemed possible a dependency might exist between Phase C and scission of the β - γ phosphoanhydride bond of ATP *i. e.*, Phase C may be triggered only after bond scission. If this were true, however, this sequence of events should also apply to the wild type chaperonin. Therefore, to clarify this point we performed the same experiment as shown in Fig. 5B, but now using GroEL R231W, which displays wild-type behavior (Fig. 6). Interestingly, in the presence of AMP-PNP, Phase C could be clearly detected in GroEL R231W, although

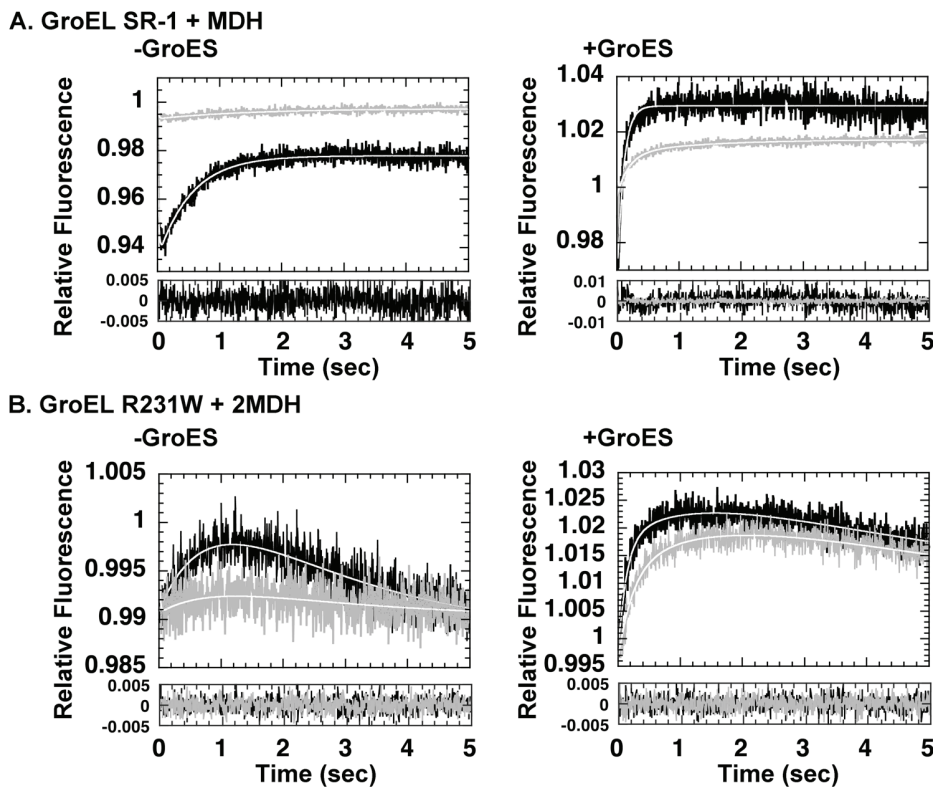


Figure 7. Stopped-flow analysis of SR-1 RW and GroEL R231W: dependence on prebound MDH and GroES. A. (upper panels) Analysis of SR-1-RW initiated by addition of ATP only (left, “-GroES”) or ATP and equimolar GroES (right, “+GroES”). Black traces indicate GroEL SR-1 RW only, gray traces indicate SR-1 RW with prebound MDH. B. (lower panels) As in A., but performed using GroEL R231W instead of SR-1 RW in each experiment. doi:10.1371/journal.pone.0078135.g007

with a greatly decreased rate (Fig. 6A and B). Binding of the non-hydrolysable analog seemed to result in a decreased rate of fluorescence change for all of the phases detected in the experiment ($k = 25 \pm 4.4 \text{ s}^{-1}$, $2.2 \pm 0.22 \text{ s}^{-1}$, $0.29 \pm 0.084 \text{ s}^{-1}$ for Phases A, B, and C, respectively, compare with corresponding values for k in [21], Fig. 6A and Table S1), and we could also detect a decrease in the amplitude for Phase B as well. The amplitude of Phase C, in contrast, seemed to be affected only minimally by the substitution of ATP by AMP-PNP. These results argued against a dependent relationship between ATP hydrolysis and the initiation of Phase C.

GroEL SR-1; Substrate Protein Detachment and GroEL Quaternary Structure

The third GroEL mutant that we chose for our experiments was the single ring mutant SR-1, frequently used in many studies to analyze the GroE mechanism. We have already characterized the fluorescent derivative of SR-1 (SR-1 RW) to a certain extent in Taniguchi *et al.* [21], and we confirmed that the basic kinetic characteristics of SR-1 RW were similar to that of the original R231W mutant, with the notable exception that in the absence of GroES, Phase D, the slow fluorescence decrease seen in the final segment of the kinetic trace, was missing in SR-1 RW (compare the black traces in the left-side panels of Fig. 7A and 7B). This last result was a new finding that suggested a dependence of this kinetic phase to the characteristic double ring structure of GroEL. Here we probed the effects of a prebound substrate protein, Gdn-HCl unfolded MDH, on the kinetic profile of SR-1 RW (Fig. 7A, gray traces). When we added ATP to a preformed binary complex of

GroEL SR-1 RW and MDH unfolded in Gdn-HCl, we found that the amplitude of each transition was greatly decreased compared to double ring GroEL R231W. The presence of MDH suppressed the amplitude of both Phase B and Phase C, with the amplitude of Phase C decreased to one fifth of that seen in the absence of bound substrate (Fig. 7A, “-GroES”, compare black and gray traces; also see Table S1 for values). In contrast, in the presence of unfolded MDH in amounts sufficient to bind both rings of the GroEL 14-mer, GroEL R231W displayed an analogous suppression in amplitude, but in the case of GroEL this effect was specific to Phases C and D, as noted previously [20]. Another difference between the single ring and double ring forms of GroEL was that this suppression of amplitude was also observed for Phase S, observed when GroES was added to the reaction (Fig. 7A, “+GroES”). Double-ring GroEL R231W did not display such amplitude suppression (Fig. 7B, “+GroES”).

Release of Unfolded Proteins from GroEL Mutants

Do the changes in kinetic profiles seen in the D398A-RW and SR-1 RW mutants translate to effects further downstream of the chaperonin mechanism? To address this we used intermolecular FRET to probe the rate at which unfolded protein molecules are detached from the GroEL apical domain of these mutants upon ATP and GroES addition. We used a protocol described in a previous study [20] where we used acid-unfolded wild type GroEL (GroELwt) labeled with IAEDANS as a model substrate protein with fluorescence acceptor, and the tryptophan introduced to the apical domain of each mutant as fluorescent donor (Fig. 8A, green trace). We found that the rate of unfolded release was in fact slowed

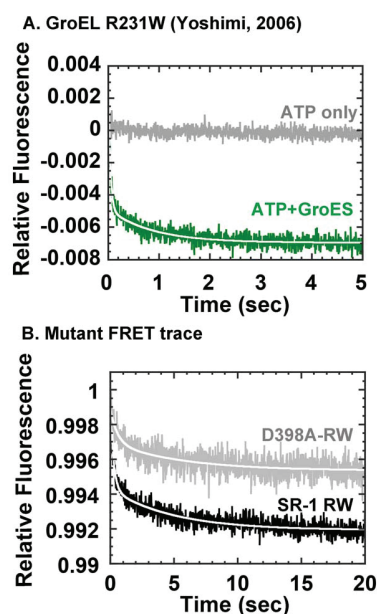


Figure 8. FRET analysis of subunit protein release triggered by ATP and GroES. Fluorescence intensities at wavelengths greater than 420 nm were monitored using a filter to obtain FRET signals excited at 295 nm. A. FRET traces for GroEL R231W, original data from Yoshimi *et al* [20]. *Gray trace* indicates changes in FRET fluorescence in the presence of ATP only (no GroES), *green trace* indicates FRET changes in the presence of ATP and equimolar GroES. B. FRET traces for mutants. *Black trace* indicates SR-1, and *Gray trace* indicates D398A-RW. Note the differences in time scale between panels A and B. doi:10.1371/journal.pone.0078135.g008

significantly in both D398A-RW (Fig. 8B, *gray traces*) and single-ring SR-1 RW (Fig. 8B, *black trace*), compared to the original double ring chaperonin (Fig. 8A). Compared to GroEL R231W (which displayed a biphasic decrease in FRET with rate constants of $k_1 = 27.0 \text{ s}^{-1}$ and $k_2 = 1.16 \text{ s}^{-1}$, respectively, Fig. 8A [20]), upon addition of ATP both D398A-RW and SR-1 RW showed fluorescence decreases that were 4- to 15- fold slower (SR-1 RW, $k_1 = 4.1 \pm 0.29 \text{ s}^{-1}$ and $k_2 = 0.21 \pm 0.012 \text{ s}^{-1}$; D398A-RW, $k_1 = 1.8 \pm 0.46 \text{ s}^{-1}$ and $k_2 = 0.18 \pm 0.034 \text{ s}^{-1}$, respectively, Table 2). The FRET analysis suggested that in both cases, mutation caused a deleterious effect on the smooth release of unfolded protein from the apical domain of the GroEL ring.

Discussion

In a recent study, Clare and coworkers used cryo-EM to identify numerous structural substates that were formed by GroEL D398A upon ATP binding [13]. Their results showed that after binding of ATP, GroEL forms a number of alternate conformations that involve rearrangements of the apical domain and the formation of alternate salt bridges that lead to the formation of the final open, GroES bound structure determined by X-ray crystallography. The four major asymmetrical configurations of GroEL, T, Rs₁, Rs₂, and R-open, represented a sequence of “click-stop” molecular events that lead to the formation of the final encapsulation complex.

In this study we were interested in constructing a kinetic view of the same process immediately after ATP binding to GroEL that would add upon the findings revealed in Clare *et al* [13]. Our chosen method was to probe the dynamic behavior of a series of mutants that have displayed interesting functional deviations from wild type GroEL and, by comparing the kinetic behavior of these mutants in stopped-flow studies, reconstruct a similar molecular

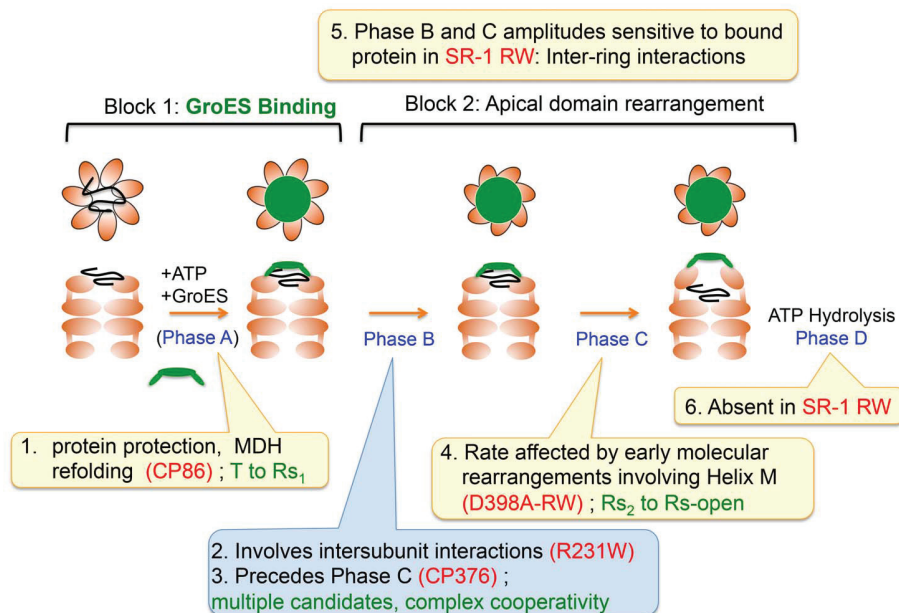


Figure 9. Proposed sequence of events for GroEL encapsulation, based upon results from the present study. In this figure, ideas derived from the present study are illustrated in *yellow text bubbles*, ideas based upon prior studies [20–22] are illustrated in the *blue text bubble*. The scheme is based on the characteristics displayed by numerous mutant forms of GroEL that highlight certain dependencies between individual molecular events. Kinetic phases detected in our stopped-flow experiments are indicated in *blue text*, names of individual mutants are denoted in *red text*, and *green text* indicates proposed correlations and conclusions derived from comparisons of our results with various previous studies. Details are given in the main text. doi:10.1371/journal.pone.0078135.g009

trajectory that describes the encapsulation process. Our results are in good agreement with the results of Clare *et al.* and support a sequential mechanism that leads up to the formation of an open GroEL conformation with bound GroES. We also found additional hints indicating that the process of substrate protein encapsulation involves interactions between multiple locations in the GroEL subunit that interlock smoothly to ensure proper function.

GroES Binding and Protection of Unfolded Substrate may Proceed without Large-scale GroEL Conformational Changes

Circular permutation has been used with great success to probe various structural elements that are essential for correct folding of protein targets [28,29], and has also proven to be an effective method to introduce novel and useful functional abilities in a number of proteins, a prominent example being the fluorescent GFP protein [30]. A recently isolated circular permutation mutant (CP86) of GroEL displayed curious characteristics that deviated significantly from the behavior of wild type GroEL, so we selected this mutant as our first candidate for analysis. The most interesting functional difference that CP86 displayed was an apparent change in specificity toward refolding proteins; GroEL CP86 could assist the refolding of the stringent substrate MDH to levels indistinguishable from wild type (Fig. 2A), and yet almost completely lost the ability to assist rhodanese refolding (Fig. 2B). This shift in substrate specificity was apparently caused by the disruption of the polypeptide backbone through permutation, as introduction of cysteines to the polypeptide ends and subsequent oxidizing treatment resulted in a recovery of the ability to assist rhodanese (Fig. 2B).

When we probed the molecular basis of this change in substrate specificity, we found that CP86 displayed a very restricted version of the kinetic transitions that were detectable by stopped-flow analysis in wild type (Figs. 4A, B), consisting of an initial rapid fluorescence increase (Phase A) followed by a very slow decrease (Phase B?). Nevertheless, CP86 was capable of binding GroES and sequestering unfolded rhodanese molecules from Proteinase K digestion (Figs. 4C and D). This result provided three additional hints to the molecular puzzle: first, CP86 was capable of binding and protecting rhodanese molecules from aggregation, but was unable to release them for productive refolding, most likely due to the inability to alter its structure for productive release. Second, CP86 was still capable of assisting the productive folding of another stringent protein, MDH, in spite of such restrictions in structural dynamics (Fig. 2A). This result reflects a previously undetected difference in the refolding mechanisms of two stringent refolding proteins, and hint that there may be multiple routes through the chaperonin mechanism that lead to productive folding. And finally, since CP86 was capable of binding GroES and sequestering unfolded rhodanese from Proteinase K in spite of the near complete lack of detectable conformational changes, there is a distinct possibility that GroES binding and subunit sequestration precedes dynamic rearrangements of the GroEL apical domain in the native chaperonin mechanism as well.

This last assertion must be qualified to avoid mistaken interpretations. A simple explanation of the results seen in Fig. 4 may be that as a result of circular permutation, the configuration of the apical domain ring may have changed relative to the original wild type configuration, and as a consequence, GroES binding may proceed without a specific conformational transition such as the R_{s1} to R_{s} -open conversion proposed by Clare *et al.* [13]. This possibility needs to be clarified by performing actual detailed structural studies on CP86, perhaps by using the cryo-EM

methods used by these authors. We note, however, that the original CP86 mutant displayed structural characteristics that were similar to wild type GroEL in many experiments that we performed, for example, denaturant stability (Fig. 3B), and resistance to Proteinase K digestion (Fig. 4C). GroEL CP86 is also largely unable to bind GroES in the absence of ATP (confirmed during purification), unlike other mutations that we have characterized such as GroEL G192W [31]. The fact that we could engineer a disulfide bond into CP86 so that it mimics the wild type chaperonin seems in itself evidence that steric perturbation caused by this mutation was kept to a minimum, and it is worthwhile to consider the possibility of an early-stage GroES binding event.

Another interesting, highly speculative possibility that we wish to put forth related to the above discussion is that the two events, GroES binding/protein sequestration and GroEL subunit rearrangement, are not arranged in a sequential manner in the mechanism but instead proceed *in parallel* and are initiated by a common trigger, the binding of ATP. In such a case, in CP86 the mutation may have caused the loss of only one of these parallel events while retaining the other. We see some evidence to support this idea from the behavior of the GroES-dependent Phase S throughout our experiments. As seen in Figs. 4B (for CP86) and 7A (for SR-1), as well as in experiments of a previous study using CP376 [22], the detection of Phase S is reproducible in a variety of mutants with altered structural characteristics, and this suggests that binding of GroES proceeds regardless of various limitations imposed on GroEL through mutation. This behavior is consistent with a co-chaperonin binding event that is largely independent of the kinetic transitions detected in the latter portion of our experiments. An interesting experiment would be to perform cryo-EM observations on GroEL in the presence of GroES, to see if multiple substates similar to those elucidated by Clare *et al.* may also be detected when GroES is bound to GroEL.

In wild type GroEL, Gly86 is located in the conserved phosphate-binding loop, which is an essential structural element in the ATP hydrolysis mechanism of GroEL. This region has been highlighted in a previous stopped-flow study performed by Kovács and coworkers on a single-ring variant of GroEL [32], and we observed a number of common characteristics between their results and ours which merit comparison. The SR-A92T mutant characterized by Kovács *et al.* displayed a greatly restricted kinetic profile compared to wild type when probed using a tryptophan residue situated in the base of the equatorial domain (at position 485). Their characterization of SR-A92T was very similar to our evaluation of the kinetic behavior of GroEL CP86; an initial very rapid transition at the upper boundaries of stopped-flow analysis was retained, and a single kinetic phase that was greatly attenuated relative to the wild type was observed, as was a loss of all subsequent phases. Although we should be careful of comparing experimental results of different mutants using fluorescent probes located at different positions of GroEL, we believe that the similarities in kinetic characteristics between GroEL SR-A92T and the circular permutant CP86 are not a coincidence. Perhaps the phosphate loop and adjacent regions represent a point where signals of ATP binding and hydrolysis propagate outward toward the intermediate and apical domains to initiate domain rearrangements. Disruption of this region, either through point mutations or circular permutation, would result in altering a significant portion of this intra-subunit communication network, with consequences to the overall dynamics and functional characteristics of GroEL. We observe with interest that, apart from the details seen in stopped-flow studies, many of the functional aspects of GroEL differ between GroEL SR-A92T

and CP86 (for example, binding of GroES stimulates the ATPase activity of GroEL SR-A92T; the same event suppresses the ATPase of CP86, Fig. 2C), hinting at the potential complexity of the overall mechanism. Nevertheless, the relationship between the GroEL phosphate loop region and the dynamic behavior of the GroEL subunit is an interesting subject for further experiments.

Apical Domain Tilting and Orientation of Helix M in GroEL

GroEL D398A has been used extensively in experiments to probe GroE function, owing to the fact that the rate of ATPase activity in this mutant is greatly reduced compared to wild type [10,11]. This allows researchers to isolate and characterize GroEL molecules in various intermediate states of the mechanism. In an attempt to utilize these characteristics in stopped-flow studies, we next turned to the characterization and analysis of GroEL D398A-RW.

Our experiments showed that the effects of the D398A mutation were reflected particularly strongly in a specific kinetic transition of the apical domain, Phase C (Fig. 5A). This phase has been shown in various previous experiments to display numerous unique characteristics. For example, in Yoshimi *et al.* we found that the rate of Phase C decreases in the presence of prebound unfolded MDH molecules, which indicated that this phase is sensitive to the steric load of proteins bound to the apical site ([20], see also Fig. 7B, “-GroES”). Also, in GroEL CP376, we found that shifting the polypeptide ends of GroEL to the hinge that connects the apical and intermediate domains resulted in a complete and highly specific elimination of this phase from the kinetic profile [22]. These results are all consistent with the idea that Phase C represents a large tilting movement centered in the apical domain that presumably leads to the open configuration characterized in the X-ray crystal structure of the GroEL-GroES-ADP₇ complex [5].

Using GroEL D398A-RW, we now show that this transition may be closely correlated with the rearrangement of Helix M in the intermediate domain (colored in orange in the subunit model shown in Fig. 1, center right). As shown in Fig. 5B, we found that in GroEL D398A-RW, the rate of Phase C was decreased more than one-hundredfold, to $k = 0.019 \pm 0.00029 \text{ s}^{-1}$, compared to $k = 2.1 \pm 0.11 \text{ s}^{-1}$ for GroEL R231W. This drastic decrease in apparent rate immediately suggested to us a possible correlation with the strong decrease in steady-state ATP hydrolysis displayed by this mutant. However, the rate of this phase was about tenfold higher than the most conservative estimates of the steady-state ATPase rate of GroEL D398A (based on an apparent rate of $k = 0.12 \text{ s}^{-1}$ [33], a 50-fold decrease in ATPase rate would correspond to an apparent steady state ATPase rate of $k = 0.0024 \text{ s}^{-1}$), which would argue against the notion that Phase C represented the rate-limiting step of ATP hydrolysis. To clarify this point, we performed stopped-flow experiments by substituting AMP-PNP for ATP, and found that Phase C became undetectable in the presence of this analog (Fig. 5B).

At first glance, this result seemed to support a mechanistic dependence on the part of Phase C toward ATP hydrolysis. However, since such a dependence should also apply to the wild type chaperonin, we tried to confirm this relationship using GroEL R231W and found that, although AMP-PNP caused a general reduction in the apparent rate constants of all of the observable phases (Fig. 6A and B), none of the phases were selectively affected as seen for Phase C in GroEL D398A-RW. The substitution of AMP-PNP for ATP seems to cause a general decrease in apparent rates throughout the mechanism, which might be explained for

example by an incomplete binding of this analog to the GroEL ATP binding site.

In their characterization of the numerous substates formed after ATP binding to GroEL, Clare *et al.* noted that a significant molecular event in the T to R_{S1} transition was the reorientation of Helix M, containing Asp398 within its structure, to a position close to the ATP binding site. The side chain of Asp398 would interact with the gamma phosphate group of ATP, and this interaction would act to stabilize the orientation of Helix M in the latter configuration. If we postulate that this reorientation of Helix M acts as a “speed boost” mechanism for Phase C, it would nicely explain the selective retardation of this phase shown in Fig. 5. This mechanism is not strictly necessary for completion of the chaperonin mechanism, since D398A is able to complete all of the apparent molecular steps leading to encapsulation, albeit very slowly. Probable additional factors that would propel the chaperonin cycle along this trajectory would be multiple binding events between the GroEL apical domains and GroES, and the rearrangement of various intersubunit salt bridges. The orientation of Helix M to the GroEL ATP binding site seems to be important specifically for the rapid rearrangement of the GroEL apical domain represented by Phase C, which in turn is implicated via previous experiments to be involved in the formation of the final encapsulating form (R-ES in Clare *et al.* [13]).

This relationship between Phase C and Asp398 may act as an important control mechanism that ensures efficient folding assistance. Previous studies have indicated that under normal conditions in the cell, ATP would be likely to bind to GroEL first, rather than unfolded polypeptide [34]. A multi-stage mechanism that links apical domain movement with molecular rearrangements that follow ATP binding, instead of a simple mechanism that triggers immediately upon ATP binding, would serve to increase the time that ATP-bound forms of GroEL could acquire unfolded protein in a productive state. The “speed boost” idea is also consistent with the idea that the conformational substates detected in GroEL D398A using cryo-EM precede the “power stroke” transition that lifts the apical domain into the open conformation [13].

The rearrangement of Helix M that is facilitated by Asp 398 may be important to an additional facet of the GroEL machinery that has been highlighted in two very recent studies of GroEL. Fei and coworkers have shown that a mutant GroEL (GroEL^{D83A/R197A}) that lacks the ability to form a specific inter-subunit salt bridge (R197-E386) displays a markedly asymmetric distribution of apical domain configurations about the GroEL ring when ADP is bound [35]. The functional implications of such asymmetry was highlighted in experiments performed by Chen *et al.*, who showed in cryo-EM experiments that individual apical domains of a GroEL ring may perform different functions such as GroES binding and unfolded protein recognition, thereby breaking the seven-fold symmetry implied in the basal GroEL structure [36]. These two studies point toward the interesting notion that the arrangement of apical domains about the GroEL heptameric ring may be intrinsically asymmetric in nature. The R197-E386 salt bridge is disrupted by rearrangement of Helix M during the T to R_{S1} transition, and so the results of Fei *et al.* suggest that this transition might be conducive to a more dynamic, asymmetric arrangement of apical domains about the heptameric ring, which would facilitate the functional heterogeneity of apical domains observed by Chen and coworkers. Phase C, in this context, may be reflective of the relative ease by which such asymmetry is achieved after ATP binding.

The Double-ring Structure of GroEL Aids Efficient Protein Release from the Apical Domain

The third mutant used in this study (GroEL SR-1 RW) was initially characterized along with GroEL R231W in Taniguchi *et al.* [21]. Our new experiments indicated that in SR-1, the presence of bound protein profoundly affected the dynamic behavior of the apical domain. This effect of bound protein is seen in R231W as well, but only for Phase C. In the case of SR-1, both Phases B and C were affected, and the changes could be characterized as large decreases in amplitude, rather than rate. Also, in the case of GroEL R231W, GroES binding could offset the decrease in rate of Phase C brought about by unfolded peptide binding. However, in SR-1 RW a ~50% decrease in amplitude was detected for the GroES-dependent Phase S as well (Fig. 7A, *right*), indicating that GroES binding was also affected by the absence of the second chaperonin ring in this mutant. We conclude from this that the integrity of apical domain movement in GroEL relies significantly on the presence of both rings of the GroEL oligomer. A very naïve mechanistic interpretation of this result would be that the rings of GroEL interact with each other to form a “base” by which GroEL can exert force on the unfolded protein via apical domain movements. In SR-1, this base is absent, and the consequence of this would be an inability to exert sufficient force and complete the transition smoothly. Although naïve, this explanation fits nicely with an important functional hypothesis of the chaperonin molecular mechanism, that of forced unfolding of bound substrate proteins by apical domain rearrangement [37,38]. Application of mechanical force to molecules may well require the presence of a stable “base” to allow transfer of force to proteins that result in a net unfolding effect. We note with interest that Clare *et al.* viewed an expansion and rotation of the GroEL heptameric ring in the structural transitions of GroEL D398A triggered by ATP binding, that are centered around the equatorial domain interface [13] which would of course be missing in SR-1.

In light of our results regarding the effects of unfolded protein on the apical domain movements of SR-1, we note with great interest that active variants of single ring GroEL have been derived through additional mutations to SR-1 that decrease the affinity of GroES toward GroEL [32,39,40]. This indicates that the arrest of the chaperonin cycle observed in SR-1 might be attributable to a GroEL-GroES interaction that is too strong to be overcome by the single ring form. This would agree very well with our present idea that single ring forms of GroEL are inherently sensitive to protein loads and are very slow to, and in some cases incapable of, dislodging bound molecules (such as unfolded polypeptide or GroES) from the apical domain.

Impaired Subunit Dynamics Affect Substrate Protein Release from the Apical Domain

Using FRET between bound substrate protein and the apical domain tryptophan, we found that in D398A and SR-1, the release of bound proteins from the initial binding site were hampered as a consequence of mutation. In each case the effects brought about were similar; detachment of proteins from the apical domain were slowed by a factor of 7 to 15 compared to R231W. In the present experiments, we chose acid-denatured wild-type GroEL as an unfolded protein substrate, and the relatively large size of the substrate in this case allowed the detection of a clear FRET signal. At the same time, this large size likely precludes encapsulation of substrate protein after release, so our present results should be interpreted to reflect early release

events that take place as a consequence of GroEL domain conformational change.

It was interesting that decreased ATPase activity (D398A) and single-ring conversion (SR-1) both resulted in a decrease in the rate of protein release from the GroEL apical domain ring. For D398A, it is likely that the greatly decreased rate of Phase C is contributing to a decrease in the rate of protein release, a downstream event whose completion is likely required for the formation of the open encapsulation complex. In the case of SR-1, the increased sensitivity of GroEL domain movement toward bound protein is likely restricting the completion of this same complex, resulting in a similar decrease in release rate. These two disparate factors, one structural, one functional, act on the mechanism to ensure the rapid and smooth release of polypeptides from the apical domain ring that is so crucial to the successful completion of the chaperonin mechanism.

Conclusions

Summarizing our results, we propose a plausible sequence of events that follow ATP binding to GroEL in Fig. 9. The basis for our proposed sequence lies in our characterization of a series of GroEL mutants that have lost specific portions of this sequence while retaining others, which highlighted dependencies among molecular events. Our results from the circularly permuted mutant CP86 suggested that the GroEL mechanism may be separated into two event blocks, with GroES binding and protection of the unfolded protein occurring first, followed by large scale rearrangement of the GroEL apical domain and subunit orientation. Regarding this second block, we have shown in a previous study using GroEL CP376 that Phase B most likely precedes Phase C in the mechanism [22]. The cooperative nature of this phase suggests that it involves intersubunit interactions such as the rearrangement of salt bridges seen by cryo-EM. With regard to Phase C, our results from D398A-RW in the present study suggest that the rate of this phase may be strongly dependent on the orientation of Helix M to the ATP binding site. Clare and coworkers propose that this rearrangement occurs very early in the chaperonin cycle. Phase D, the slowest kinetic transition that was detected in our experimental system, most likely follows after this second event block is completed, along with the hydrolysis of ATP. In our most recent experiments we have seen that Phase D is observed only in double ringed forms of GroEL (Fig. 7A and B, compare the *black traces* in the *left panels*), and so it may be that this phase is involved in inter-ring communication, possibly leading to a second cycle on the opposite ring of GroEL.

It is difficult to correlate the results of our experiments completely with the detailed structural aspects of the GroEL substates elucidated by Clare and coworkers [13]; nevertheless we believe that some inferences may be made (Fig. 9, highlighted in *green text*). Our results from CP86 indicate that GroES binding to GroEL may be possible at a very early stage of the cycle. The initial T to Rs₁ transition seen by Clare *et al.* is the earliest structural event of the cycle detected in cryo-EM experiments, and from this we believe that this transition may represent the conformational switch that allows GroES binding. In this case, from stopped-flow experiments on CP86 in Fig. 4A, we see that only Phase A, the initial rapid fluorescence increase that occurs in the dead zone of our 5-sec assay, remains the single kinetic transition that is detectable in this mutant, and so this phase might represent the T to Rs₁ transition. Correlating Phase B with a specific structural transition proves to be more difficult, since Clare and coworkers have documented multiple structural transitions that involve the rearrangement of salt bridges between adjacent

subunits (the T to Rs_1 transition and the Rs_2 to Rs -open transition) as well as a complex rearrangement of salt bridges between the two GroEL rings [13]. Any of these rearrangements may conceivably correspond to Phase B, and at present we lack the necessary details to attribute this kinetic phase to a specific structural event. The characteristics of Phase C suggest that this kinetic transition involves a very large rearrangement of the apical domain that would be conceptually sensitive to the presence of bound unfolded protein, and this characteristic, compounded with the rate of this phase compared to the other detected kinetic transitions, would seem to suggest a relationship between Phase C and the Rs_2 to Rs -open transition. Our results from the D398A-RW mutant suggest that the rate of this transition differs depending on the stability or the specific orientation of Helix M in the intermediate domain.

Our proposed mechanism does not have a clear-cut correlation with the structural data that has been reported to date; specific aspects of the mechanism remain mismatched or missing. Also, our proposal disagrees with the mechanism proposed by Clare *et al.* in one important aspect, the specific instance that GroES binds to the GroEL ring. We believe that our data indicates that GroES binding and subsequent protection of the unfolded protein

may be accomplished surprisingly early in the mechanism. Such a mechanism would provide advantages to the refolding protein molecule, for example, improved chances of being successfully incorporated into the chaperonin cavity, and the beneficial effects of increased interactions between substrate and chaperonin that may affect the refolding trajectory of the bound protein. The merits of both of these concepts have been discussed in various previous studies, and hopefully our result will aid in clarifying their significance in the overall mechanism.

Supporting Information

Table S1.
(XLSX)

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: T.Mizobata. Performed the experiments: T.Mizobata TU AK T.Mizobata. Analyzed the data: YK T.Mizobata. Contributed reagents/materials/analysis tools: YK T.Mizobata. Wrote the paper: T.Mizobata.

References

- Thirumalai D, Lorimer GH (2001) Chaperonin-mediated protein folding. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 30: 245–269.
- Hartl FU, Hayer-Hartl M (2002) Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* 295: 1852–1858.
- Horwich AL, Fenton WA (2009) Chaperonin-mediated protein folding: using a central cavity to kinetically assist polypeptide chain folding. *Quarterly Reviews of Biophysics* 42: 83–116.
- Braig K, Otwinowski Z, Hegde R, Boisvert DC, Joachimiak A, et al. (1994) The crystal structure of the bacterial chaperonin GroEL at 2.8 Å. *Nature* 371: 578–586.
- Xu Z, Horwich AL, Sigler PB (1997) The crystal structure of the asymmetric GroEL-GroES-(ADP)₇ chaperonin complex. *Nature* 388: 741–750.
- Chaudhry C, Horwich AL, Brunger AT, Adams PD (2004) Exploring the structural dynamics of the E.coli chaperonin GroEL using translation-liberation-screw crystallographic refinement of intermediate states. *J Mol Biol* 342: 229–245.
- Wang J, Boisvert DC (2003) Structural basis for GroEL-assisted protein folding from the crystal structure of (GroEL-KMgATP)₁₄ at 2.0 Å resolution. *J Mol Biol* 327: 843–855.
- Weissman JS, Hohl CM, Kovalenko O, Kashi Y, Chen S, et al. (1995) Mechanism of GroEL action: productive release of polypeptide from a sequestered position under GroES. *Cell* 83: 577–587.
- Weissman JS, Rye HS, Fenton WA, Beechem JM, Horwich AL (1996) Characterization of the active intermediate of a GroEL-GroES-mediated protein folding reaction. *Cell* 84: 481–490.
- Rye HS, Roseman AM, Chen S, Furtak K, Fenton WA, et al. (1999) GroEL-GroES cycling: ATP and nonnative polypeptide direct alternation of folding-active rings. *Cell* 97: 325–338.
- Rye HS, Burston SG, Fenton WA, Beechem JM, Xu Z, et al. (1997) Distinct actions of cis and trans ATP within the double ring of the chaperonin GroEL. *Nature* 388: 792–798.
- Ranson NA, Farr GW, Roseman AM, Gowen B, Fenton WA, et al. (2001) ATP-bound states of GroEL captured by cryo-electron microscopy. *Cell* 107: 869–879.
- Clare DK, Vasishtan D, Stagg S, Quispe J, Farr GW, et al. (2012) ATP-triggered conformational changes delineate substrate-binding and -folding mechanics of the GroEL chaperonin. *Cell* 149: 113–123.
- Yifrach O, Horovitz A (2000) Coupling between protein folding and allostery in the GroE chaperonin system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 1521–1524.
- Yifrach O, Horovitz A (1998) Transient kinetic analysis of adenosine 5'-triphosphate binding-induced conformational changes in the allosteric chaperonin GroEL. *Biochemistry* 37: 7083–7088.
- Yifrach O, Horovitz A (1995) Nested cooperativity in the ATPase activity of the oligomeric chaperonin GroEL. *Biochemistry* 34: 5303–5308.
- Poso D, Clarke AR, Burston SG (2004) A kinetic analysis of the nucleotide-induced allosteric transitions in a single-ring mutant of GroEL. *J Mol Biol* 338: 969–977.
- Cliff MJ, Kad NM, Hay N, Lund PA, Webb MR, et al. (1999) A kinetic analysis of the nucleotide-induced allosteric transitions of GroEL. *J Mol Biol* 293: 667–684.
- Cliff MJ, Limpkin C, Cameron A, Burston SG, Clarke AR (2006) Elucidation of steps in the capture of a protein substrate for efficient encapsulation by GroE. *J Biol Chem* 281: 21266–21275.
- Yoshimi T, Hongo K, Mizobata T, Kawata Y (2006) Multiple structural transitions of the GroEL subunit are sensitive to intermolecular interactions with cochaperonin and refolding polypeptide. *J Biochem* 139: 407–419.
- Taniguchi M, Yoshimi T, Hongo K, Mizobata T, Kawata Y (2004) Stopped-flow fluorescence analysis of the conformational changes in the GroEL apical domain: relationships between movements in the apical domain and the quaternary structure of GroEL. *J Biol Chem* 279: 16368–16376.
- Mizobata T, Uemura T, Isaji K, Hirayama T, Hongo K, et al. (2011) Probing the functional mechanism of Escherichia coli GroEL using circular permutation. *PLoS One* 6: e26462.
- Mizobata T, Kawata Y (1994) The guanidine-induced conformational changes of the chaperonin GroEL from Escherichia coli. Evidence for the existence of an unfolding intermediate state. *Biochim Biophys Acta* 1209: 83–88.
- Kubo T, Mizobata T, Kawata Y (1993) Refolding of yeast enolase in the presence of the chaperonin GroE. The nucleotide specificity of GroE and the role of GroES. *J Biol Chem* 268: 19346–19351.
- Hayer-Hartl M (2000) Assay of malate dehydrogenase. A substrate for the E. coli chaperonins GroEL and GroES. *Methods Mol Biol* 140: 127–132.
- Miller DM, Kurzban GP, Mendoza JA, Chirgwin JM, Hardies SC, et al. (1992) Recombinant bovine rhodanese: purification and comparison with bovine liver rhodanese. *Biochim Biophys Acta* 1121: 286–292.
- Heinemann U, Hahn M (1995) Circular permutation of polypeptide chains: implications for protein folding and stability. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 64: 121–143.
- Hennecke J, Sebbel P, Glockshuber R (1999) Random circular permutation of DsbA reveals segments that are essential for protein folding and stability. *J Mol Biol* 286: 1197–1215.
- Iwakura M, Nakamura T, Yamane C, Maki K (2000) Systematic circular permutation of an entire protein reveals essential folding elements. *Nature Structural Biology* 7: 580–585.
- Baird GS, Zacharias DA, Tsien RY (1999) Circular permutation and receptor insertion within green fluorescent proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 11241–11246.
- Machida K, Fujiwara R, Tanaka T, Sakane I, Hongo K, et al. (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.
- Kovacs E, Sun Z, Liu H, Scott DJ, Karsisiotis AI, et al. (2010) Characterisation of a GroEL single-ring mutant that supports growth of Escherichia coli and has GroES-dependent ATPase activity. *J Mol Biol* 396: 1271–1283.
- Burston SG, Ranson NA, Clarke AR (1995) The origins and consequences of asymmetry in the chaperonin reaction cycle. *J Mol Biol* 249: 138–152.
- Tyagi NK, Fenton WA, Horwich AL (2009) GroEL/GroES cycling: ATP binds to an open ring before substrate protein favoring protein binding and production of the native state. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 20264–20269.
- Fei X, Yang D, Laronde-Leblanc N, Lorimer GH (2013) Crystal structure of a GroEL-ADP complex in the relaxed allosteric state at 2.7 Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: E2958–2966.
- Chen DH, Madan D, Weaver J, Lin Z, Schroder GF, et al. (2013) Visualizing GroEL/ES in the act of encapsulating a folding protein. *Cell* 153: 1354–1365.
- Shitlerman M, Lorimer GH, Englander SW (1999) Chaperonin function: folding by forced unfolding. *Science* 284: 822–825.

38. Lin Z, Rye HS (2004) Expansion and compression of a protein folding intermediate by GroEL. *Mol Cell* 16: 23–34.
39. Chatellier J, Hill F, Foster NW, Goloubinoff P, Fersht AR (2000) From minichaperone to GroEL 3: properties of an active single-ring mutant of GroEL. *J Mol Biol* 304: 897–910.
40. Liu H, Kovacs E, Lund PA (2009) Characterisation of mutations in GroES that allow GroEL to function as a single ring. *FEBS Lett* 583: 2365–2371.
41. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, et al. (2004) UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* 25: 1605–1612.