

蛋白質工学的手法を駆使したシャペロニン GroEL の
アミロイド線維凝集抑制機能開発に関する研究

2017 年 1 月

福井 直也

略号

A β 42 : Amyloid β peptide

AD : GroEL apical domain

ADP : adenosine diphosphate

ATP : Adenosine triphosphate

AFM : Atomic force microscope

Amp : ampicillin

ANS : 1-anilinonaphtalene-8-sulfonate

BSA : bovine serum albmin

CD : circular dichroism

DNA : deoxyribonucleic acid

DTT : dithiothreitol

EDTA : ethylenediaminetetraacetic acid

ESC7 : concatenated form of GroES where individual subunits were linked by a tri-glycine linker

G192X : Gly192 to X substitution GroEL mutants

Gdn·HCl : guanidine hydrochloride

HSP : heat shockprotein

MDH : malate dehydrogenase

PD : parkinson's disease

QCM : Quartz Crystal Microbalance assay

Rho : Rhodanese

SDS-PAGE : sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

SEC : Size exclusion chromatography

TEM : transmission electron microscopy

ThioT : Thioflavin T

目次

第 1 章 序論.....	1
1-1. はじめに.....	1
1-2. シャペロニン GroEL の構造と機能.....	2
1-3. タンパク質の構造異常により生じるアミロイド線維凝集.....	11
1-4. パーキンソン病発症の原因タンパク質 α -Synuclein	15
1-5. 天然変性蛋白質に対するシャペロニンの働き.....	20
1-6. 本研究の目的.....	24
 第 2 章 GroEL Gly192 変異体を用いたシャペロニンの機能解析.....	25
2-1. 緒言.....	25
2-2. 材料と方法.....	26
2-2-1. プラスミド単離.....	26
2-2-2. アガロースゲル電気泳動.....	26
2-2-3. 形質転換.....	27
2-2-4. DNA Sequence.....	27
2-2-5. GroEL G192X の作製.....	28
2-2-6. タンパク質量.....	28
2-2-7. 大量培養.....	28
2-2-8. GroEL(野生型, 各種変異体)の精製.....	29
2-2-9. CD 測定.....	33
2-2-10. ANS 蛍光測定.....	33
2-2-11. ゲルろ過クロマトグラフィーによる分離分析.....	34
2-2-12. ATPase 活性測定.....	35
2-2-13. MDH リフォールディング活性測定.....	36
2-2-14. Rhodanese refolding assay.....	37

2-2-15. 分子間相互作用定量(QCM).....	39
2-2-16. QCM によるカイネティックパラメーター算出.....	40
2-3. 結果.....	43
2-3-1. 野生型 GroEL と各種 G192X 変異体の構造に関する解析.....	43
2-3-2. ATPase 活性測定.....	49
2-3-3. MDH, Rhodanese リフォールディング活性測定.....	50
2-3-4. GroEL G192X 変異体と GroES の相互作用解析.....	52
2-4. 考察.....	60
第 3 章 GroEL Gly192 変異体によるアミロイド線維凝集の抑制効果.....	64
3-1. 緒言.....	64
3-2. 材料と方法.....	65
3-2-1. α -Synuclein の培養.....	65
3-2-2. α -Synuclein の精製.....	66
3-2-3. GroES の培養と精製.....	69
3-2-4. 測定に用いたサンプルの調整.....	73
3-2-5. QCM による天然変性蛋白質(α -Syn, A β)と GroEL の相互作用解析.....	73
3-2-6. QCM によるカイネティックパラメーター算出.....	74
3-2-7. アミロイド線維形成.....	75
3-2-8. GroEL 存在下における α -Syn の線維形成.....	76
3-2-9. 異なる時間において GroEL を添加した α -Syn の線維形成.....	76
3-2-10. 原子間力顕微鏡(AFM)測定.....	76
3-2-11. 透過型電子顕微鏡(TEM)測定.....	77
3-3. 結果.....	78
3-3-1. GroEL と天然変性タンパク質の相互作用解析.....	78
3-3-2. GroEL 存在下における α -Syn のアミロイド線維形成.....	81
3-3-3. 異なる時間における GroEL を伴った α -Syn の線維形成.....	88

3-4. 考察.....	94
第4章 ミニシャペロン「GroEL-AD」を用いたアミロイド線維形成抑制効果.....	97
4-1. 緒言.....	97
4-2. 材料と方法.....	99
4-2-1. GroEL-AD の作製.....	99
4-2-2. GroEL-AD の培養と精製.....	99
4-2-3. 測定に用いたサンプルの調整.....	102
4-2-4. GroEL-AD を伴った変性タンパク質の線維形成実験.....	102
4-2-5. アミロイド線維の観察.....	103
4-2-6. GroEL-AD と変性タンパク質の相互作用解析.....	103
4-3. 結果.....	105
4-3-1. GroEL-AD による様々なタンパク質への相互作用と線維化抑制.....	105
4-3-2. GroEL-AD の存在下において形成されたアミロイド線維の形態観察.....	107
4-3-3. 異なる時間における GroEL-AD を伴ったアミロイド線維形成への影響.....	111
4-3-4. GroEL-AD と標的タンパク質との相互作用解析.....	113
4-4. 考察.....	119
第5章 総合考察.....	122
5-1. GroEL の機能における Hinge2 部位の Gly192 残基の役割.....	122
5-2. α -Syn のアミロイド線維形成に対する Apical domain の役割.....	127
5-3. タンパク質凝集に対する Apical domain の役割.....	130
第6章 結語.....	133
引用文献.....	135
謝辞.....	147

第 1 章 序論

1-1. はじめに

タンパク質は、20 種類からなるアミノ酸残基が枝分かれすることなく一列につながって出来ている。全てのタンパク質は、DNA の持つ遺伝情報をもとに作られており、遺伝暗号が指定するのは、アミノ酸配列の情報だけである。生物を形作っている 20 種類のアミノ酸残基をどれだけ、そしてどのような順序で並べれば、一個のタンパク質として機能を果たすものができるかを、情報として保存しているのが DNA である。つまり、ヒトゲノムの全塩基配列が明らかになった今日、タンパク質を理解することの重要性はこれまでになく高まっている。遺伝情報は、DNA→RNA→タンパク質というセントラルドグマを経てタンパク質を生産するが、リボソームで合成された新生ポリペプチドは単にアミノ酸が一列に並べられた紐状であり、そのままでは機能を持たない。タンパク質は固有の立体構造に折りたたみ(フォールディング)が行われることで始めて機能を持つタンパク質となる。タンパク質はフォールディングすることで独自の立体構造を形成し、酵素反応、免疫反応、エネルギー変換、物質輸送、細胞運動など多彩な生命機構を担う。

しかしながら、タンパク質は常に生命に有利に作用しているわけではない。タンパク質の異常構造やアミロイドとよばれる異常な沈着がアルツハイマー病をはじめとする神経変性疾患の原因の一つとなることが近年明らかになってきている。1957 年に Anfinsen らは、RNaseA 酵素に尿素を添加しすることでその立体構造を完全に壊した後、透析して尿素を除去すると、自発的な巻き戻しが起こることにより活性が回復することを示した。これにより、タンパク質の立体構造はアミノ酸配列さえ決まれば決定する。つまり、タンパク質のフォールディングは他からのエネルギーを必要としない自発的なプロセスであるという「Anfinsen」のドグマを提唱した(1)。しかし、ここで一つ見落とされていたことは、フォールディングが行われる環境の問題であった。

試験管の中で比較的タンパク質濃度の低い状態で実験を行ったときには、Anfinsen のドグマが成立するが、細胞内部のようにタンパク質濃度が非常に高い環境において、それは必ずしも成立しないことが近年明らかとなってきた。そこで登場するのが分子シャペロンと呼ばれる一群のタンパク質集団である。

1・2. シャペロニン GroEL の構造と機能

1970 年代に熱ショックを与えるとその生産量が増えるタンパク質が数種類確認された。これらのタンパク質は熱ショックタンパク質(Heat Shock Protein: HSP)と命名された(2)。この HSP は大腸菌から人間まですべての生物が持っていることが分かっている。HSP のアミノ配列を比較してみると、大腸菌とヒトでその相同性は 40 % 程度であり、ヒトの HSP と大腸菌の HSP はよく類似している。ストレスに対して細胞や個体を守る HSP は生物にとって根本的、かつ必要不可欠な働きをしており、その進化の過程でよく保存されてきたことが推測される。長い紐状のポリペプチドで合成されたタンパク質は、自分自身の力だけではきちんと折りたたまれて正しい立体構造を形成することができない。さらにタンパク質は、それが働く場所(ミトコンドリアや葉緑体などの細胞内小器官)に移動しない限り、きちんと働くことができない。この移動もタンパク質単独ではできない。そこで、HSP はタンパク質をきちんとフォールディングして正しい立体構造にしたり、移動を手伝ったり、変性したタンパク質をもとの正しい立体構造に戻す役割をしている。このように、あたかもタンパク質のシャペロンであるかのように機能していることが分かってきた HSP という分子は、「分子シャペロン」とよばれるようになった(3)。

分子シャペロンは、HSP やオリゴマータンパク質の集合に関与する因子として発見され、その役割の解明とともに分子シャペロンの概念が確立した。分子シャペロンの当初の定義は、タンパク質のフォールディングを助ける一群のタンパク質である。しかし、現在ではフォールディングにとどまらず、さまざまな細胞機能の制御に分子シャペロンが関与していることがわかってきており、分子シャペロンの概念は拡張している。

原核生物と真核生物の間で進化的によく保存されている分子シャペロンには、HSP60 (シャペロニン GroEL), HSP70 (DnaK), HSP90 (HtpG), small HSP (IbpA/B) などの一群がある。*E. coli* の場合、リボソーム上で伸長しつつあるポリペプチドの多くは、トリガー因子 (trigger factor:TF)と結合し、合成が完了するとリボソームから離れていく。その後は、さらに別の分子シャペロンに受け渡される場合と、分子シャペロンの援助なしで自発的にフォールディングするものに分かれる。膜タンパク質を除く約 2500 種の可溶性タンパク質の約 10 %は シャペロニン(GroEL/GroES)システムに、5~18 %は HSP70 (DnaK/DnaJ/GrpE)システムに助けられてフォールディングするといわれており、残りの 70 %くらいのポリペプチドは、シャペロンの助けを必要としないで自発的にフォールディングすると考えられている(4)。シャペロニンは、ほぼすべての細胞で生存するために必須である。シャペロニンは一次配列の相同性は比較的低いが、立体構造的によく似た 2 つのグループに分類されており、グループ I 型シャペロンとして *E. coli* などの真正細菌やミトコンドリア、葉緑体などに存在する HSP60 (GroEL)(5)、グループ II 型シャペロニンとして古細菌や真核細胞のサイトゾルに存在する CCT などが知られている。グループ I 型シャペロニンは通常コファクターとして HSP10 (GroES) を必要とするが、グループ II 型シャペロニンは HSP10 に相当する部分を自分自身のサブユニットに内蔵した構造を形成している(6)。

GroE のフォールディングのメカニズムは、シャペロンのオリゴマー構造と親密に関連している。GroEL は 57 kDa のサブユニット 7 つからなるリングが背中合わせに 2 つ重なった 14 量体構造(総分子量~800 kDa)を形成している(7)。GroEL は直径 137 Å, 高さ 146 Å の大きさの円筒状である。GroEL で囲まれたリング内部にはそれぞれ直径約 45 Å の空洞があり、2 つの空洞はつながっていない。GroEL のそれぞれのサブユニットは 3 つのドメインからなっている(図 1-1)(8)。

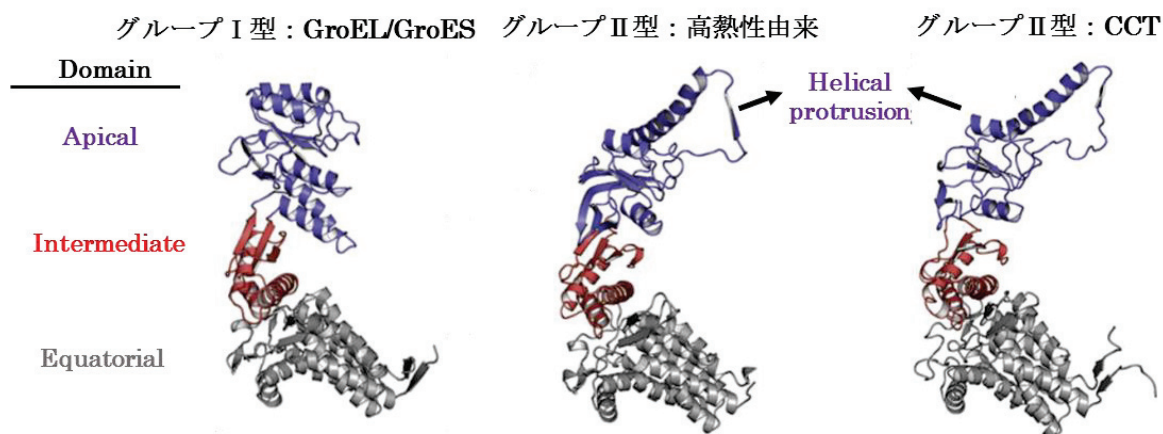


図 1-1. シャペロニンのサブユニットにおける各ドメイン(8)

グループ II 型シャペロニンにはアピカルドメインの先端にグループ I 型には存在しないコシャペロニンの役割を果たす Helical protrusion が存在している。

エクアトリアルドメインはセントラルキャビティの内側に向かって直面している ATP 加水分解の触媒部位を含み, GroEL の土台である。内側のリングの接触と外側のリングの接触の大部分はエクアトリアルドメインが仲介しているためにエクアトリアルドメインは GroEL オリゴマーの重要な機能を果たす(9)。アピカルドメインは空洞の入口に位置し, 多くの疎水性アミノ酸残基で構成される基質ポリペプチドとの結合部位を含んでいる(同時に GroES の結合領域も含む)(10)。インターメディアートドメインは 2 つの Hinge 部位によってエクアトリアルドメインとアピカルドメインを連結している。従って, その主要な機能は両方の領域の間のアロステリック信号の伝達である(11)。

コシャペロンである GroES は直径 75 Å, 高さ 30 Å のドーム状構造をした 7 量体である(12)。GroES は 10kDa のサブユニット 7 つからなる帽子のような構造を形成している。それはほとんどが β シートで構成されている。GroES の 16-33 番目のアミノ酸残基はクラゲの触手のような形をとり, GroEL と相互作用するモバイルループと呼ばれる部位に相当する。GroES は GroEL のアピカルドメインに結合し, この結合には, それぞれの GroEL リングに存在するヌクレオチド結合部位に ATP か ADP が結合していることが必要である(13)。結合の際,

GroES のモバイルループは, GroEL の疎水性ペプチドと結合することで固定化される。このようにして, ヌクレオチド結合と GroES/ポリペプチド結合間で強い結合を確立する。アピカルドメインは $\sim 90^\circ$ まで外に向かって回転する。疎水性接合部位はサブユニット接合部分に埋められ, 空洞の内面を親水性にして, 結合したポリペプチドの放出を引き起こす。これに伴い, キャビティの直径は $45\sim 80\text{ \AA}$ まで増加する。

ADP 存在下で形成した GroEL-GroES 複合体の立体構造が発表されてからシャペロン研究は一気に進展した(14)。その構造は, GroEL の片方のリングに GroES が蓋のように結合し, 同じ側の 7 つの GroEL サブユニットに 1 つずつ ADP が結合していた(図 1-2)。

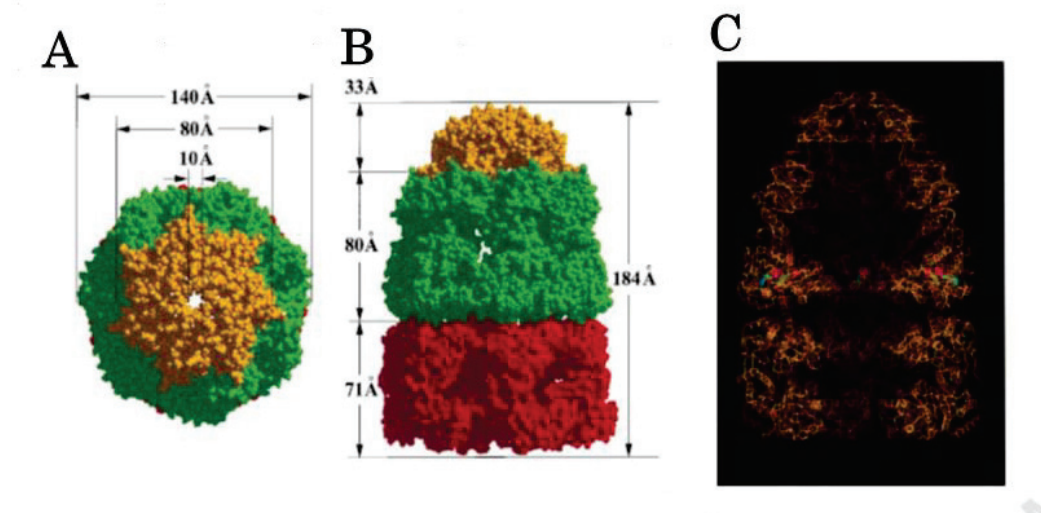


図 1-2. GroEL-GroES-(ADP)₇ の X 線結晶構造(14)

- A. GroEL-GroES 複合体の上面図
- B. GroEL-GroES 複合体の側面図
- C. GroEL-GroES 複合体の電子密度図

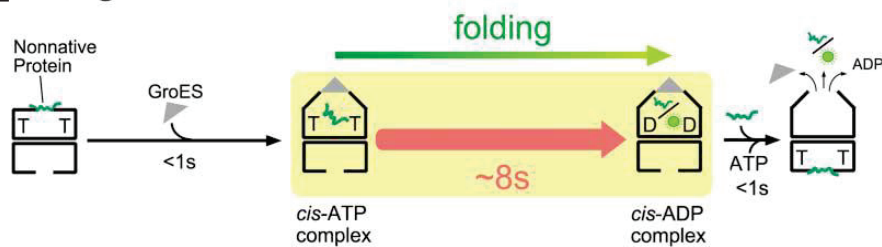
これにより上下のリングは非対象になる(GroES, ADP の結合したリングを *cis-ring*, 反対側のリングを *trans-ring* とよぶ)。さらに, *cis-ring* の GroEL サブユニットがダイナミックで, そしてシャペロンの機能を考えれば理にかなった構造変化をしていた。インターメディアイトドメインの

両端に存在する 2 つの Hinge 部位を中心にアピカルドメインは右に 90° ひねりながら上方に 60° 立ち上がる(Open 型)。それはちょうど、お辞儀をしている人が横を向きながら起き上がるような感じである。この構造変化の結果、*cis*-ring 内の空洞の体積が約 2 倍に広がり、GroES の蓋によって大きな閉鎖空間が生まれる。さらに、GroEL のポリペプチド結合部位のほとんどが GroES との結合に用いられる。そのため、GroES の結合によってポリペプチドは GroEL から引きはがされて、拡大した空洞に放出されることになる。ポリペプチドはこの空洞に入り込むことで、凝集の危険から逃れて正常なフォールディングできる(空洞には約 57kDa までのポリペプチドが入り込める)(15)。GroEL がダイナミックな構造変化を引き起こすことにより、*cis*-ring の空洞内部はポリペプチドがフォールディングするのに都合のよい環境に変化する。GroES が結合していないときに空洞内部に露出していた疎水性アミノ酸残基は、GroES の結合によって新たに形成される GroEL サブユニット間の接触界面で作用する。結果として空洞内部は親水的な残基が主になる。疎水性アミノ酸残基が表面に曝された新生又は変性ポリペプチドが安心して入ることができる空間をつくる(16)。

シャペロニンの反応サイクルは、空の GroEL に変性状態の基質ポリペプチドが結合することから始まる(図 1-3A)。続いて、7 つの ATP が結合し、GroEL が Open 型に構造変化する。これに GroES が結合することで、ポリペプチドは *cis*-ring の空洞内に落とし込まれ、隔離した空間の中でフォールディングが開始する(*cis*-ATP 複合体)。この *cis*-ATP 複合体は ATP が加水分解した ADP(*cis*-ADP 複合体)になるまで安定となり、ポリペプチドにとってはシャペロニンの安全な空洞内における一定のフォールディング時間が保証されることになる。*cis*-ring 内の ATP が加水分解する時間(約 8 秒)がシャペロニンの反応サイクルのタイマーとして働くのである。しかし、この 8 秒のタイマーはさらに 3 秒と 5 秒の 2 段階に分けられることがわかった(図 1-3B)(17)。GroES が結合してからポリペプチドが空洞内に落とし込まれるまでに最初の 3 秒を要し、あとの 5 秒でフォールディングが進行する。GroES の GroEL-ATP-基質タンパク質複合体への結合は基質タンパク質がキャビティ内に完全に落とし込まれていない *cis*-

ATP^{*}複合体を生み出す。ATP が ADP に加水分解され, *cis*-ADP 複合体になると, *trans*-ring 側に ATP が結合する。この ATP 結合が引き金となって, *cis*-ring 側の GroES が解離し, それと同時に *cis*-ring 側の ADP と中に閉じ込められていたポリペプチドも一緒に解離する。変性ポリペプチドは, フォールディングが終了しているかどうかに関わらず一定時間で放出されるが, フォールディング途中のものは再度シャペロニンに捕獲され, 複数回のサイクルを経た後にフォールディングが完了する。今, *trans*-ring 側には ATP とポリペプチドが結合しており, 今度はこちらが *cis*-ring 側となって働くことになる。こうしてサイクルは一巡する(18)。

A single timer model



B two timer model

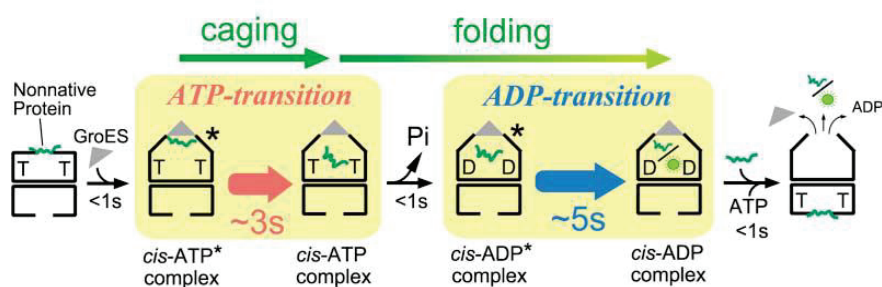


図 1-3. GroEL のシャペロニンサイクルモデル(17)

A. 従来のシャペロニン反応サイクル

B. 2 段階のシャペロニン反応サイクル

シャペロニン GroEL はポリペプチドを内部に取り込むために大幅な構造変化を引き起こし、セントラルキャビティと呼ばれる空洞を造り出す。この際支点となるのが各ドメイン間に存在する Hinge と呼ばれる部位である。アピカルドメインとインターメディアイトドメインの間に存在する Hinge II 部位に 192 番目の Gly 残基(Gly192)がある。以前に本研究室では、Gly192 残基を Trp に置換した G192W 変異体を作製し、そのシャペロニン機能の解析を行った(19)。その結果、GroEL G192W 変異体は GroEL WT と比較して変性条件下の Rhodanese や MDH 等の基質タンパク質に対するリフォールディング活性が著しく低下している結果が得られている。GroEL G192W 変異体の機能解析の結果より、Gly 残基を最も大きいアミノ酸残基である Trp に置換したことで片方の *cis*-ring が予め Open 状態になり、ATP の非存在下においても GroES を結合することができることが明らかとなった。さらに、このとき、反対側の *trans*-ring リングには基質が結合する。その後、ATP と過剰量の GroES を添加すると基質が外れ、代わりに GroES が結合する。両方のリングに GroES が結合したフットボール型複合体となることで、その後シャペロニンサイクルが停止した「Dead-End」な状態となる(図 1-4)。これより、GroEL G192W 変異体は両方のリングで同時に GroES を結合することが可能となったが、基質をセントラルキャビティ内に落とし込むことが出来ず、リフォールディングの介助を行わないことが明らかとなった。

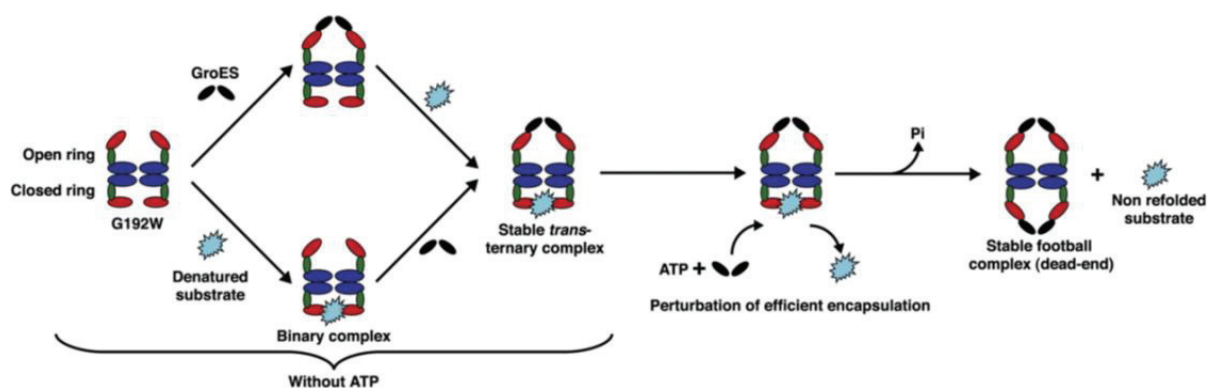


図 1-4. GroEL G192W 変異体のシャペロニンサイクルの概略図(19)

GroEL における 2 つのリングに対して同時に GroES が結合したフットボール型複合体は、非生理的な条件下でのみ生じると考えられてきた。しかし、近年になりこの複合体に対する研究は増加してきている(図 1-5)。野生型 GroEL の生理条件下において、フットボール型複合体が実際に形成されているかは不明な点が多かったが、生理的な条件下において蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)法などを用いることでフットボール型と弾丸型が同程度存在しており、ADP/ATP 比が高いとフットボール型の形成が阻害されることも見出されている(20)。さらに、398 番目の Asp を Ala に置換した変異体である GroEL D398A 変異体(21)を用いた研究においても、GroEL の両方のリングに GroES が結合したフットボール型複合体が形成されるモデルも考案されている(22)。この GroEL D398A 変異体に対し 52 番目の Asp を Ala に置換したことで、大幅に ATP の加水分解が抑制された GroEL D398A/D52A 変異体は両方のリングに GroES が結合しているフットボール型複合体の X 線結晶構造が解明されている(23)。シャペロニンサイクルにおけるフットボール型複合体の存在が確実なものとなっている。

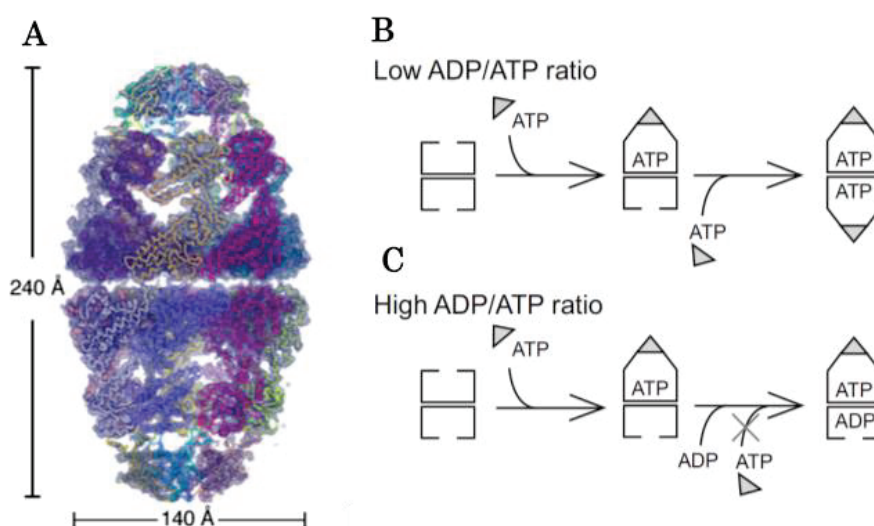


図 1-5. GroEL フットボール複合体の構造と反応サイクル

A. GroEL D398A/D52A:GroES₂ 複合体の電子密度図(23)

B, C. ATP/ADP 比率の違いにおける GroEL のシャペロニンサイクル(20)

B. 低比率の ATP/ADP におけるシャペロニンサイクル

C. 高比率の ATP/ADP におけるシャペロニンサイクル

GroEL のアピカルドメインに結合している基質は, GroES が蓋をすることでセントラルキャビティ内部に落とし込まれてリフォールディングが介助される。その後, ATP が加水分解されて ADP となることで GroES が外れ基質の放出が生じる。この現在考えられている一連のシャペロニンサイクルとは異なり, GroES が蓋をした状態でもキャビティ内部の基質が外に放出し, その後基質自体が自発的にリフォールディングする「テザリング状態」という動作が生じることも近年になり判明している(24,25)(図 1-6)。

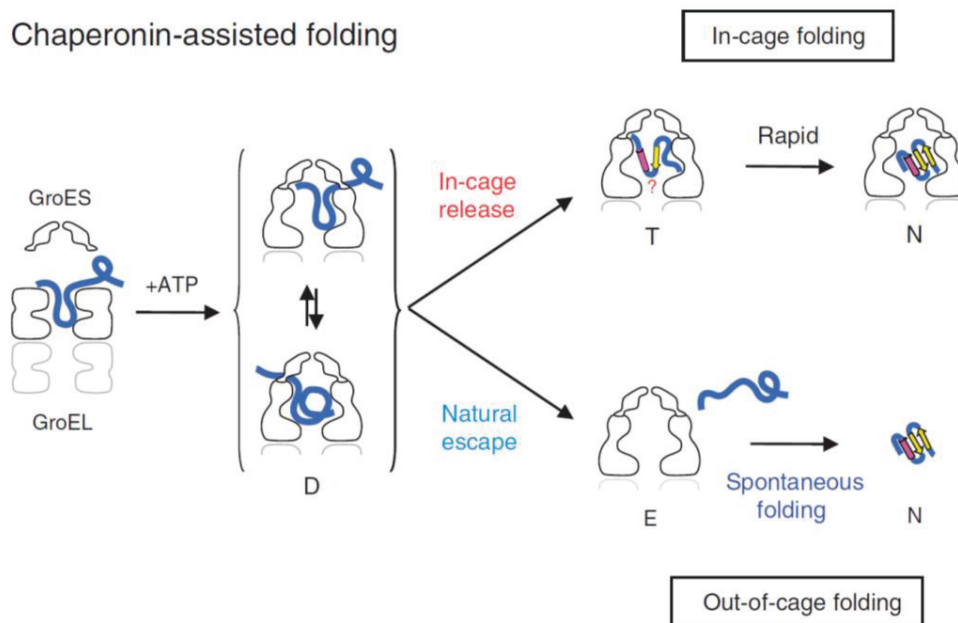


図 1-6. GroEL のテザリング反応モデル(24)

以上より, GroEL の機能と構造において詳細に解析されていない変性タンパク質に対する重要な機構は未だ多く残っている。

1-3. タンパク質の構造異常により生じるアミロイド線維凝集

1980 年に Glenner は、アミロイドーシスとアミロイド線維の関係性について示している(26)。アミロイドーシスとは、本来、生理的機能をもつタンパク質の立体構造に変換が起こり、微細な線維に重合して沈着する病態の総称である。このような特徴から、アミロイドーシスはフォールディング病ともよばれている(27)。よく知られているアミロイドーシスとして、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、プリオン病、筋萎縮性側索硬化症(ALS)等が存在する。しかし、その一方で、病気と関連していないタンパク質のアミロイド線維化も報告されている(28)。

アミロイド線維の形成は、律速段階となる核を形成するラグタイム、形成された核にモノマーが次々と結合することで線維が伸長していき、その後定常状態となる 3 つの段階を経た反応により生じるとされている(図 1-7)。しかし、予め線維の断片や凝集活性を示す「Seed」分子が存在することにより、ラグタイムを経ず線維伸長反応が生じるとされている(29)。

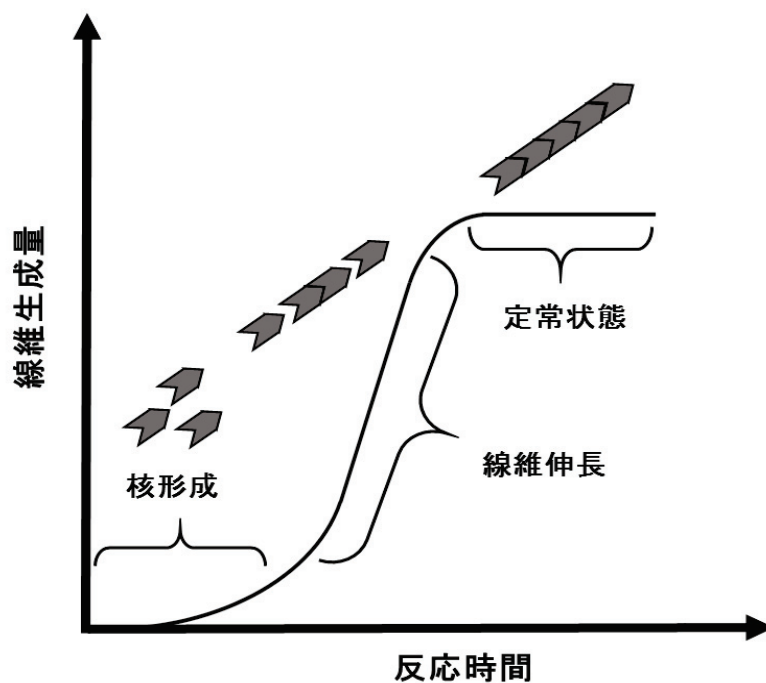


図 1-7. アミロイド線維形成モデル

現在のアミロイド線維の定義として、コンゴレッド色素(30), Thioflavin-T(31)等で染色され、電子顕微鏡で観察すると幅約 7~12 nm の枝分かれのない線維構造を示す(32)。これに加え、X 線回折、円偏光二色性解析等で β シートを呈する等が挙げられる(図 1-8)(33,34)。

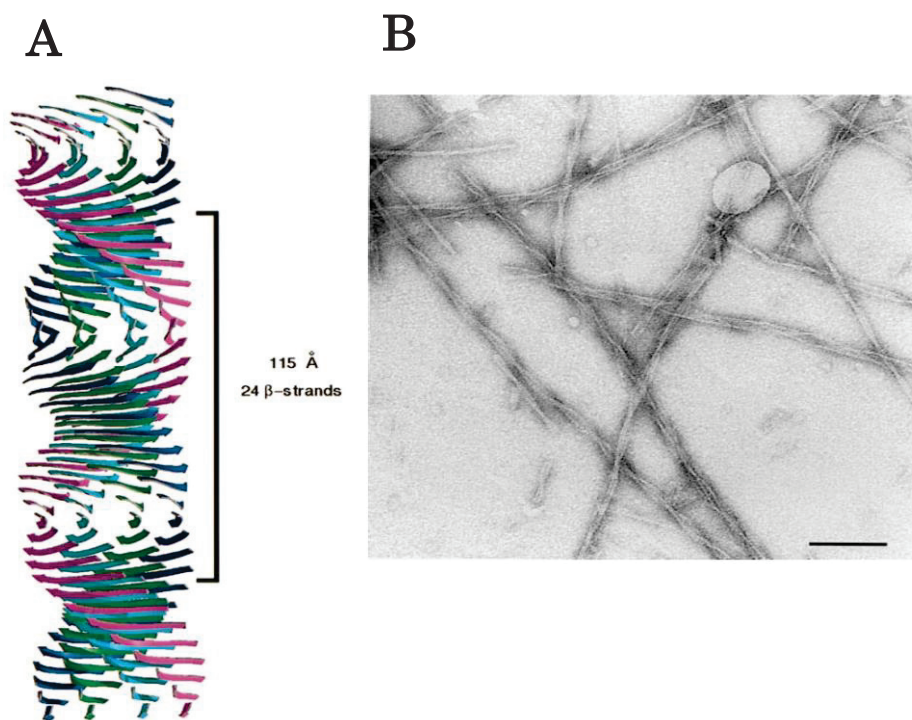


図 1-8. アミロイド線維のクロス β 構造の模式図と電子顕微鏡画像

A. アミロイド線維の分子モデル図

B. アミロイド線維の電子顕微鏡画像

インスリンにおいて形成されるアミロイド線維は電子顕微鏡観察等において、その形状は針状のものが多くみられるが、還元剤である TCEP 存在下において酸性・高温条件下で恒温静置するとヌードル状のアミロイド線維を形成する(図 1-9)。さらに、このヌードル状のものは、針状のものとは比べてほとんど細胞毒性がないことが示されている(35)。

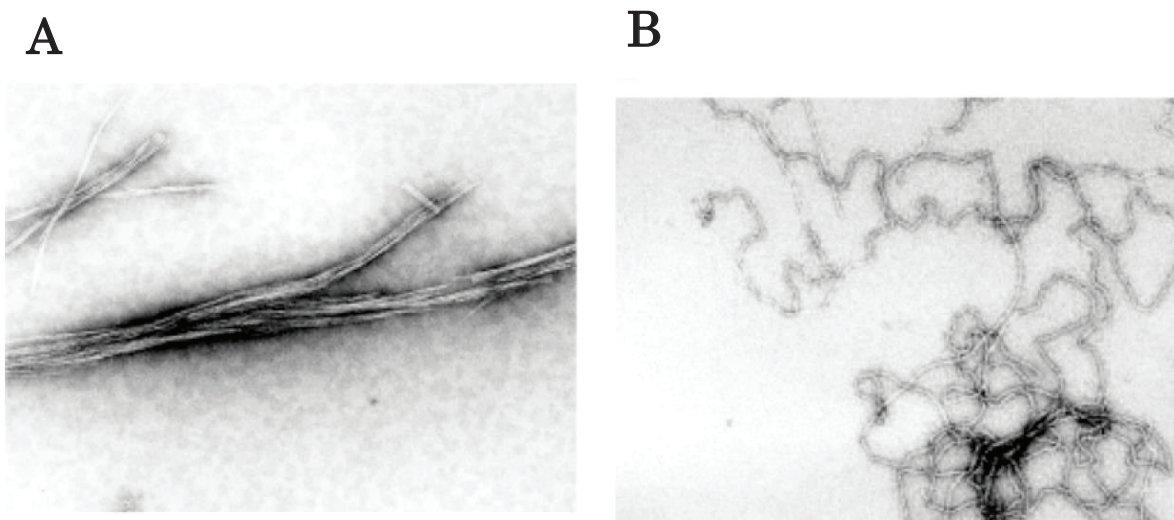


図 1-9. インシュリンより形成されたアミロイド線維(35)

A. TCEP 非存在下において形成したアミロイド線維

B. TCEP 存在下において形成したアミロイド線維

このように、形成されるアミロイド線維の形態によっても細胞毒性に違いがみられる。アミロイド線維を形成するタンパク質の多くが神経変性疾患において関与しているとされているが、アミロイド線維自体に毒性があるのか、線維形成過程における凝集中間体に毒性があるのかは未だ明確に判明していない。そのため、アミロイド線維に至るまでの凝集経路とその過程で形成される凝集形態の解析は、今後のアミロイド研究において重要な要因となることが考えられる。アミロイド線維の形成における様々な方法による凝集抑制効果が報告されてきている。アミロイド線維を形成するモデルタンパク質の一つに GroES がある。これまで、本研究室ではポリフェノール的一种であるアントシアニンを主成分とするビルベリーエキス(VMA)を化学シャペロンとして用いた GroES の凝集抑制効果について報告している(図 1-10)(36)。

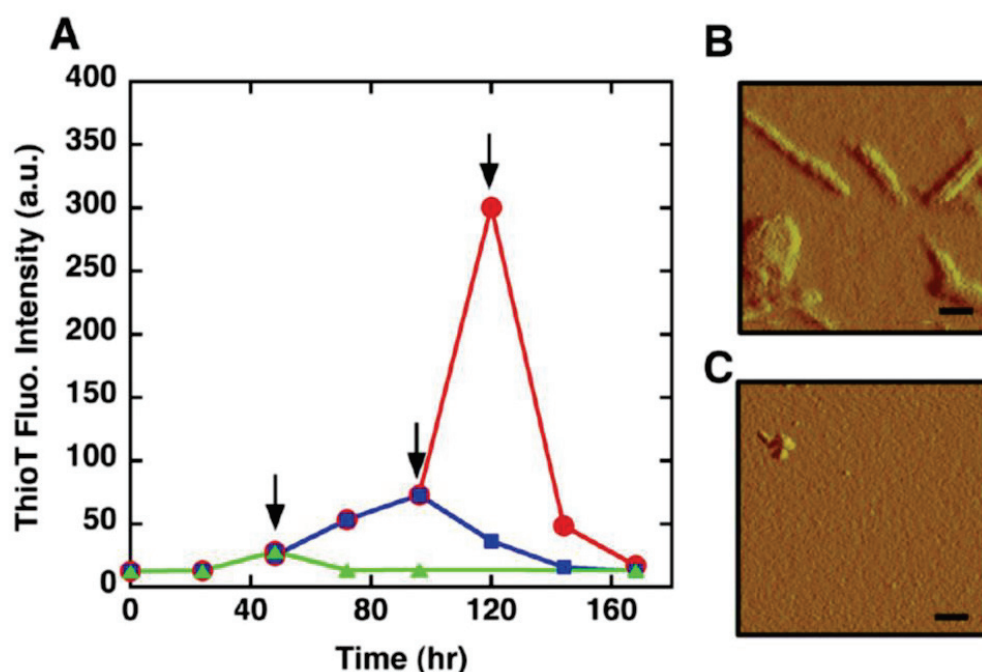


図 1-10. VMA による GroES のアミロイド線維形成抑制(36)

- A. 異なる時間の VMA 添加による GroES の凝集過程における蛍光変化
 48 時間(●), 96 時間(●), 120 時間(●)における VMA 添加(添加は矢印で表示)
- B. 120 時間での AFM による GroES のアミロイド線維観測(赤線における矢印の点)
- C. VMA 添加後の AFM 観測(赤線矢印で VMA を添加して 48 時間振盪後)

ポリフェノールとはベンゼン環, ナフタレン環等の芳香族に結合したヒドロキシ基を持つ化合物の総称で, カテキン, クルクミン, バイカレン等が挙げられる。カテキンの一種である没食子酸エピガロカテキンはプリオン PrP^{sc} の線維形成を阻害し(37), クルクミンはアミロイド β ($\text{A}\beta$) のオリゴマーと線維形成を抑制し(38), バイカレンは α -Synuclein の線維伸長に対して抑制効果がある(39)とそれぞれ示されている。

さらに, ALS の原因タンパク質であるスーパーオキシドジスムターゼ(SOD1)はその活性部位に Cu と Zn が活性中心に配位することで, 活性酸素を分解する働きを示すが, Cu の結合によりその凝集も抑制されるのが示されている(40)。さらに, アルツハイマー病の原因タンパク質である $\text{A}\beta$ (41), プリオン病の原因タンパク質 PrP^{C} (42)においても金属イオンが関与し

ていると報告されている。プリオンタンパク質が関与している疾患としてヒトにおけるクロイツフェルト-ヤコブ病(CJD)があり、ウシではウシ海綿状脳症(BSE)があるが、このプリオンタンパク質が $A\beta$ オリゴマーの病原作用に関与していることが近年示されている(43)。正常なマウスの海馬切片において、 $A\beta$ オリゴマーは、LTP(長期増強:ニューロン間のシナプス結合を増強する現象)が阻害されているのが示されているが、PrP^c(細胞型プリオン)を保持していないマウスの海馬切片では阻害されていなかった。これと同様に、正常マウスの海馬切片で $A\beta$ と PrP^c の相互作用を遮断すると、LTP は $A\beta$ オリゴマーによる影響を受けなかったことも示唆された。これより、プリオンは、細胞内での $A\beta$ のフォールディング状態を変動させる「病原性シャペロン」としての機能をもっている可能性も考慮されている。神経変性疾患においては、未だに確立した治療法は存在していないが、様々な抑制因子との関連は今後の治療法開発に有効な知見を与えることが期待されている。

1-4. パーキンソン病発症の原因タンパク質 α -Synuclein

1817 年に Parkinson により発見されたパーキンソン病は当初振戦麻痺として報告され、その後 1888 年に Charcot がより詳細な症例を提示し、パーキンソン病として紹介された(44)。パーキンソン病(PD)は、異常タンパク質の蓄積が原因で生じる神経変性疾患の 1 つとして、現在アルツハイマー病に次いで頻繁に起こる疾患であるとされている。パーキンソン病において、中脳黒質のドーパミン神経が変性脱落したところにレビー小体(LB)とよばれる封入体が形成される(図 1-11)。

1997 年に Spillantini らは、孤発性パーキンソン病における LB の線維状主要構成成分が α -Synuclein であることを明らかにした(45)。 α -Synuclein 以外の LB の構成成分として、分子シャペロンである α B-クリスタリン、HSP70、HSP27 等他の様々なタンパク質も挙げられる(46,47)。

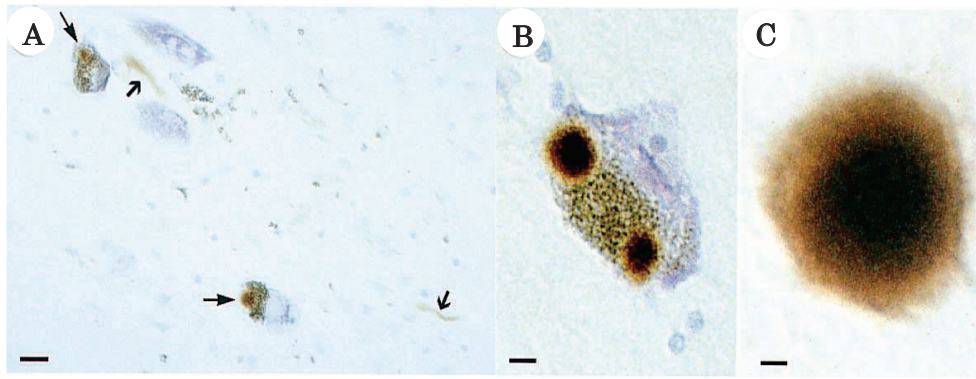


図 1-11. 免疫染色されたパーキンソン病発症患者の黒質切片(45)

- A. α -Synuclein が形成レビー小体を含む 2 つの神経突起 (矢印により表記)
- B. 2 つの α -Synuclein が形成したレビー小体含有神経細胞
- C. 細胞外における α -Synuclein が形成したレビー小体

神経変性疾患における α -Synuclein の関与は、当初アルツハイマー病(AD)におけるアミロイド班由来の α -Synuclein 断片(NAC)が大きく関与していると考えられていた(48)。 α -Synuclein の構造は、SNCA 遺伝子によりエンコードされるアミノ酸 140 残基からなるタンパク質で、両親媒性の N 末端、特定の配列を持たない親水性の C 末端、その間には疎水性領域で、非アミロイド成分を含む凝集に関する 61-95 の 35 アミノ酸残基から成る NAC 領域と呼ばれる配列から構成されている。また、N 末端側には KTKEGV 領域からなる繰り返し配列を多く含んでいる特徴を持っている(図 1-12)(49)。

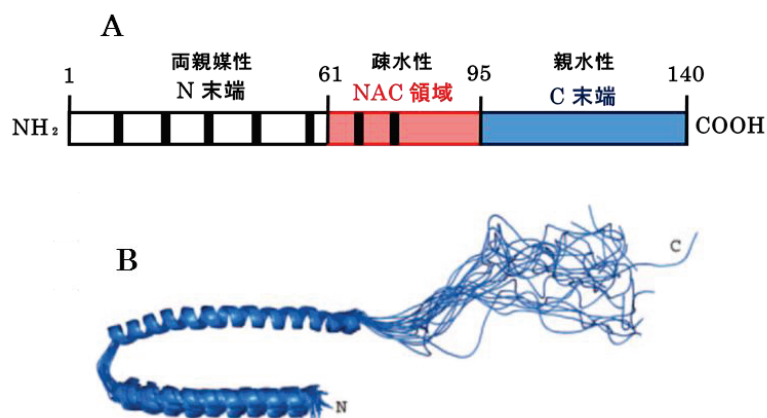


図 1-12. α -Synuclein の構造

- A. α -Synuclein のアミノ酸配列の模式図 ■:KTKEGV の繰り返し配列を示す。
- B. ミセル結合 α -Synuclein 構造(50)

NAC 領域に存在する疎水性残基を含んだ領域の置換やいくつかを欠損させることで、アミロイド線維の形成において変化が生じることが示されている(51,52)。さらに、NAC 領域(1-35) 単独のペプチドが形成した凝集は、Thioflavin-S に陽性であることからクロス β シート構造を形成しており、TEM の解析結果からアミロイド線維を形成していることも示されている(53)。また、NACcore(68-78 アミノ酸残基)ナノ結晶の構造は、これまで小さ過ぎて光学顕微鏡では観察することが出来ないとされてきたが、近年マイクロ電子回折法 (MicroED) という手法を利用し、構造が決定されている。この結果では、NACcore の構造は、 α -Synuclein 全長が形成する原線維と類似した構造であるのが示されている(54)。アミロイド線維の形成において、NAC 領域における疎水性残基は重要な役割を果たしていると考えられる。 α -Synuclein の負に帯電している C 末端領域を欠損させることでアミロイド線維がより早く形成することが示されている。この結果より、C 末端領域は、重合を阻害する効果が考えられる(55)。しかし、C 末端領域に存在している 129 番目の Ser 残基(S129)は、カゼインキナーゼ I 又は II によりリン酸化することでアミロイド線維を形成する傾向が増加するという結果もある。LB を構成している α -Synuclein における S129 残基は、90% がリン酸化していることから、パーキンソン病における α -Synuclein の LB の形成に関与していることが考えられている(56)。

2 つの α -Synuclein 遺伝子変異体 A53T, A30P は早期発症型の家族性 PD の形成につながることを示された(57)。*in vitro* において α -Synuclein A53T と A30P はオリゴマー、凝集中間体、線維を同程度形成する。 α -Synuclein の線維形成過程において、A53T 変異体の存在下では加速される一方で、A30P 変異体存在下では線維形成に影響を及ぼさないとされている。しかし、A30P 変異体は溶液中で非線維型オリゴマーの形成と非沈殿タンパク質の消滅を加速する(58)。また、A30P 変異体は野生型とその線維の構造に違いがあるのが明らかとなっている(図 1-13)(59)。E46K 変異体も、家族性パーキンソン病に関係する変異型 α -Synuclein とされている(60)。E46K 変異体は、負電荷に帯電したリポソームへ野生型の α -Synuclein よりも結合し、さらにこれは他の 2 つの変異体とは異なっていることも示され

ている。アミロイドの線維形成において、E46K 変異体は野生型 α -Synuclein (WT) と比較しより早く線維を形成するが、A53Tと同程度である(61)。これら3つの家族性変異体に加え、近年50番目のHisをGln残基に置換したH50Q変異体も家族性変異体として発見された(62)。この変異体は、著しく凝集を加速し、 α -Synuclein のアミロイド線維を形成する。さらに、2次元核磁気共鳴(NMR)と円偏光二色性(CD)スペクトルによる構造解析において全体的な2次構造が改変しないのが示されている。またこの変異体は *in vitro* において金属と相互作用し、リン酸化する能力もないことが示される。その細胞毒性効果は WT と比較し、細胞外で顕著に毒性がでてるようにみられた(62)。

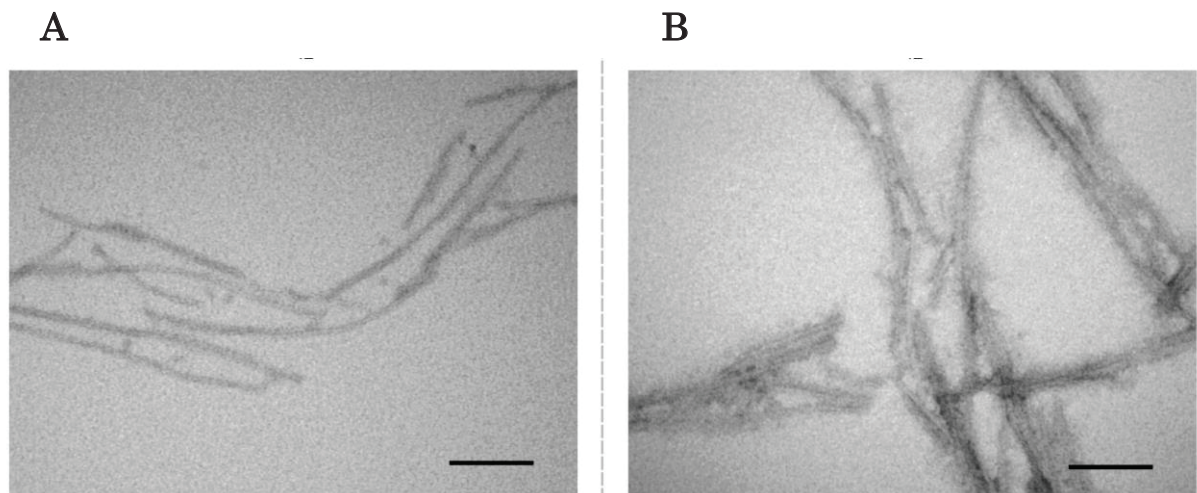


図 1-13. α -Synuclein WT と A30P 由来のアミロイド線維構造の違い(59)

- A. α -Synuclein WT が形成したアミロイド線維
- B. α -Synuclein A30P が形成したアミロイド線維

酸化によるストレスは、パーキンソン病発症の原因になると考えられている(63)。アミノ酸側鎖において、Met は最も酸化が生じやすい。酸化した Met は、アミロイド線維形成を抑制する。金属イオンはこの抑制効果に対し、線維化を引き起こす(64)。 α -Synuclein の凝集においても、SOD1 や A β , PrP^{sc} のように金属がその線維化に関与していることが示されている。透過型電子顕微鏡(TEM)による解析において、Cu(II)は、WT では細長いネットワークのような線維が形成されるのに対し、家族性変異体(A30P, E46K, A53T)では線維ではないアモ

ルファスな凝集を形成していた。それに対し、Fe(III)存在下では、WT, 各変異体共に金属イオン非存在下で形成されるような短く太い線維が形成された(図 1-14)(65)。

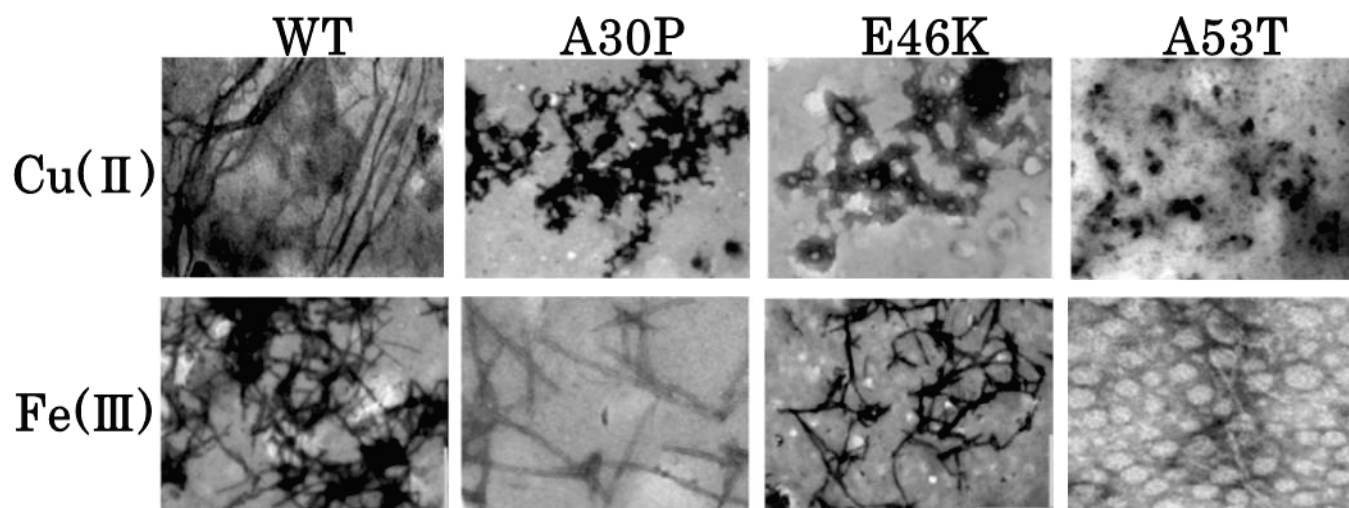


図 1-14. Cu(II)又は Fe(III)存在下において形成する α -Synuclein 線維形態の違い(65)

in vitro において, Trp と Cys 残基が欠損している α -Synuclein を H_2O_2 で穏やかに酸化した α -Synuclein は, アミノ酸配列中に存在している 4 つ全ての Met 残基を選択的にスルホキシド化する。Met 酸化による α -Synuclein 線維形成の抑制は, その線維形成した Met の数に相当する(66)。先端だけを切りとった α -Synuclein ペプチド 1-15 は膜を模倣した環境において, N アセチル化, 遊離アミン型の両方で, Cu I は 2 つのヘリカルペプチド鎖 Met1 と Met5 残基に結合することにより錯体形成が生じるのが発見された(67)。この構造において, 酸化還元が安定で, 酸化は起こらず, 酸素存在下のドーパミンにおいても非活性であるのが示された。これより, 細胞質の Cu I α -Synuclein とは異なり, 活性酸素容量を失わず, 酸化反応を促進することで膜結合 Cu I α -Synuclein は, 非活性銅を減少させる機能があるのが示されている。金属, 酸化ストレスそれぞれが α -Synuclein 凝集の因子になりうるが, 生体内において, 特に脳内には α -Synuclein, 金属, 酸素いずれも存在しているので, 金属と酸化ストレスが共役することで α -Synuclein の凝集が生じることも考えられる。

α -Synuclein の詳細な機能は未だ不明な点が多い。 α -Synuclein は、アルコールデヒドロゲナーゼ (ADH) の凝集において HSP27 と同様の抑制効果を示したことから、他のタンパク質の凝集を抑制するシャペロン活性を保持していることも報告されている(58)。神経伝達物質の放出において、シナプス小胞と細胞膜の融合に関わる物質である SNARE タンパク質の複合体形成に際して働く分子シャペロンとして DnaJ ファミリーに属している CSP α が存在する(68)。マウスにおいて致死に至る CSP α のノックアウトは、 α -Synuclein を発現させることによりその致死を回避できるという報告から、末梢神経の損傷を保護するという機能を持っていることも示される(69)。また、 α -Synuclein は膜に結合することにより線維形成が加速される(70)、その後 α -Synuclein の凝集は膜の表面で生じることから、膜は優先的に α -Synuclein のオリゴマー化を誘導することが報告されている(71)。これに対し、中性と無極性条件の膜に強く結合すると線維形成が阻害されることが報告されている(72)。さらに、酸化したリン脂質は、脂質濃度の違いで α -Synuclein が形成する形態が異なるのを示している。低濃度条件下において、リン脂質小胞に結合すると部分的にフォールドして線維構造を形成するが、より高濃度条件では α ヘリックス構造をとることで線維形成が阻害される(73)。このように、多くのタンパク質とリン脂質膜と相互作用することから α -Synuclein は、多数のシグナル経路に関与していることが考えられる。つまり、細胞分化、シナプス可塑性、細胞生存、ドーパミン神経伝達の規制における役割を担っているかもしれないことから、これら通常の機能を崩壊させることが病的な機構に関与するようになるのかもしれない。

1-5. 天然変性タンパク質に対する分子シャペロンの働き

変性したタンパク質のフォールディングを調整する機能を持つ分子シャペロンは、細胞死に至る重篤な疾患の原因となるタンパク質の凝集を抑制する作用を示すことも報告されている。眼のレンズにおいて、多量に存在しているクリスタリンと呼ばれるタンパク質は、凝集の原因や機構はまだ詳細に解明されていないが、白内障への多大な関与が考慮されている。 α クリスタ

リンは部分的に変性した β -, γ -クリスタリンに対し、シャペロン機能を持つことが知られている(74)。また、 α B クリスタリンは細胞内においてアルツハイマー病(75)やクロイツフェルト-ヤコブ病(76)などミスフォールディング病に関与している他のタンパク質の凝集を阻害していることも報告されている。HSP70/HSP40 と HSP104 は協同して変性しているタンパク質を可溶化させるシャペロン効果を示す(77)。HSP104 は、酵母プリオンタンパク質 Sup35 の凝集の形成において関与しており、HSP104 の発現量が通常の場合は凝集体形成を促進するが、過剰量もしくは発現抑制時には抑制の方向に働くことが示されている(78)。HSP70 と HSP90 は A β 1-40 のアミロイド線維形成を抑制することが示されている(79)。HSP90 は、 α -Synuclein のアミロイド線維化に対し、ATP 非存在下では、オリゴマーが蓄積するが、ATP 存在下でアミロイド線維が形成するとされている(80)。さらに、 α -Synuclein A53T 変異体を用いた実験において、HSP90 は α -Synuclein の毒性を示すようになるオリゴマーと強固な複合体を形成することで毒性を解消することが示されている(図 1-15)(81)。

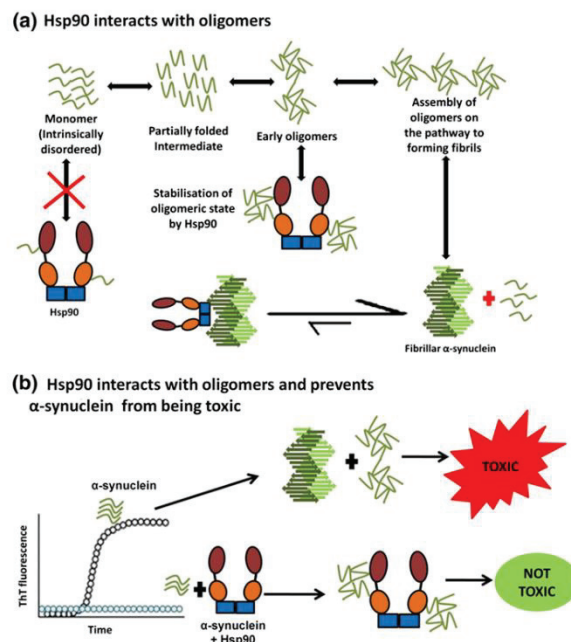


図 1-15. HSP90 による α -Synuclein オリゴマーの無毒化の機構(81)

(a) HSP90 とオリゴマーの相互作用機構

(b)HSP90 と α -Synuclein の相互作用によるオリゴマー毒性の解消機構

HSP70 は、神経細胞において強制発現させると A β ペプチドによる神経毒性を軽減することが示されている(82)。HSP70 においても、 α -Synuclein の凝集抑制に働くことが確認されており(83)、さらに、その相互作用には N 末端に存在する ATP 加水分解ドメインは必要ではなく、むしろ基質結合ドメインだけでも相互作用し、凝集の抑制に働くと考えられている(図 1-16)(84)。このことから、タンパク質の凝集抑制効果において、分子シャペロンは全長として働くのではなく、むしろ特定の部位が重要となることが考えられる。

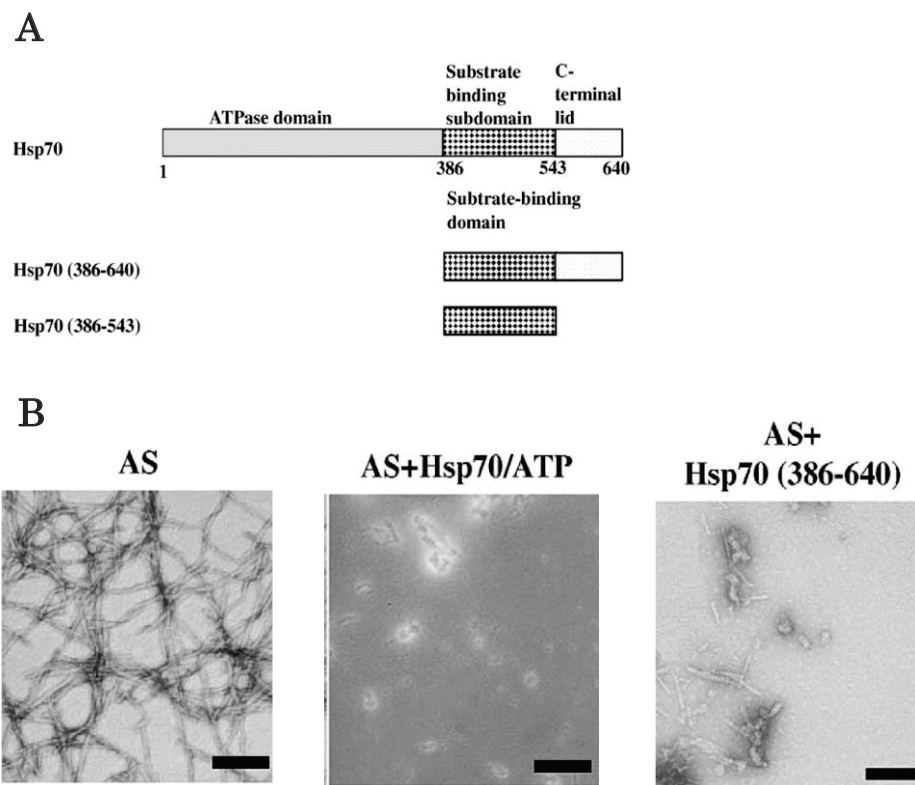


図 1-16. HSP70 の基質結合ドメインによる α -Synuclein のアミロイド線維形成抑制効果(84)

A. HSP70 のアミノ酸配列の模式図

B. HSP70 存在下における α -Synuclein が形成したアミロイド線維の TEM 画像

左: α -Synuclein が形成したアミロイド線維

中央: HSP70/ATP 存在下における α -Synuclein が形成したアミロイド線維

右: ATP 加水分解領域非存在下の HSP70 を伴った α -Synuclein 形成アミロイド線維

一方, *in vitro* において, GroEL のアピカルドメイン単独でも Rhodanese, cyclophilin A のリフォールディング活性が示されている(85)。さらに, グループ II 型シャペロニン, アピカルドメインの先端に存在している Helical protrusion により酵母 Sup35NM へ結合し, その凝集を抑制していることが示されている(86)。同様にグループ I 型シャペロニン GroEL において, 単離したアピカルドメインは透析アミロイドーシスの原因とされている β_2 -ミクログロブリンの凝集を著しく抑制する効果を持つミニシャペロンであることが示唆されている(図 1-17)(87)。アピカルドメインは基質タンパク質の認識と結合を行い, その後コシャペロンと協同することでフォールディングの調整を行っているが, これは, すでに知られている基質タンパク質だけではなく, 天然変性タンパク質も結合することができ, その凝集さえ抑制している可能性も考えられる。

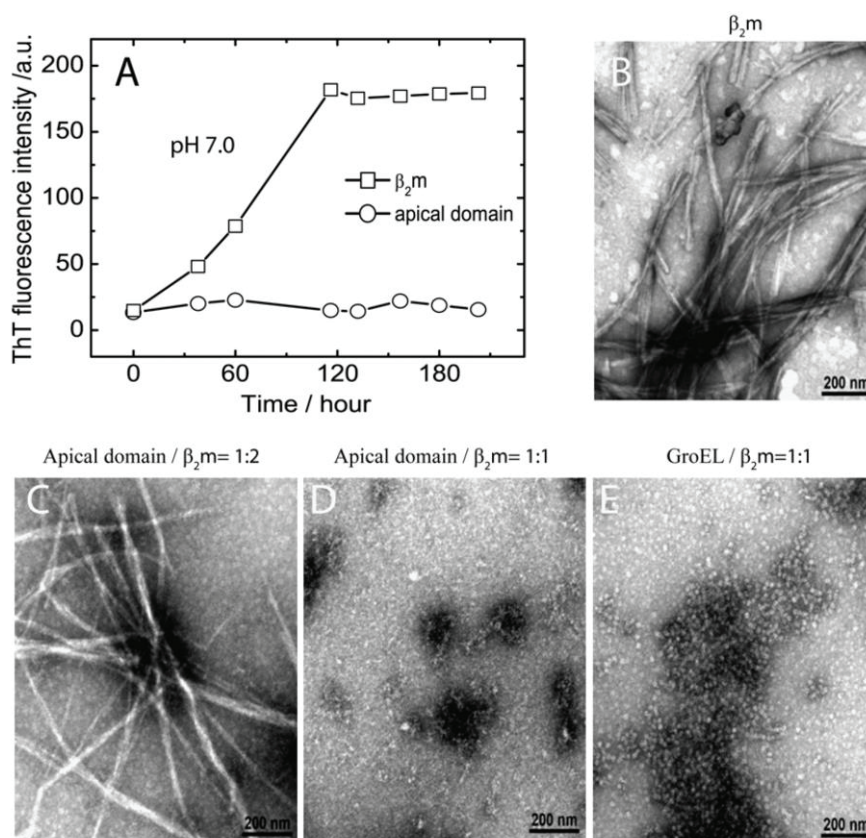


図 1-17. GroEL のアピカルドメインによる β_2 -ミクログロブリンの線維形成抑制(87)

- A. アピカルドメイン存在下(○)又は非存在下(□)における β_2 -ミクログロブリン線維形成
- B-D. β_2 -ミクログロブリン:アピカルドメイン=1:0, 1:2, 1:1 の線維形成反応の TEM 画像
- E. β_2 -ミクログロブリン:GroEL=1:1 における線維形成反応の TEM 画像

1-6. 本研究の目的

本研究ではシャペロニン GroEL によるアミロイド線維形成が生じる変性タンパク質の抑制機構を工学的手法により解明することを目的とした。本学位論文は、6 章で構成される。

第 1 章【序論】では、本研究の背景として神経変性疾患の発症原因となる天然変性タンパク質を抑制する広義の分子シャペロン、また本論文の目的および構成について述べた。

第 2 章【GroEL Gly192 変異体を用いたシャペロニンの機能解析】では、GroEL G192X 変異体を用いた構造安定性、シャペロニン機能の解析、GroES との相互作用について評価することで、Gly192 残基の置換により GroEL の機能にどのような影響を与えるのかを調べた。

第 3 章【GroEL Gly192 変異体によるアミロイド線維凝集の抑制効果】では、野生型 GroEL 及び G192N, I, W 変異体を用いて A β ペプチドと α -Synuclein への相互作用、 α -Synuclein の線維化における影響について評価することで、Gly192 残基の置換によるアミロイド線維を形成するタンパク質への効果について調べた。

第 4 章【ミニシャペロン「GroEL-AD」を用いたアミロイド線維形成抑制効果】では、GroEL におけるアピカルドメインがアミロイド線維を形成するタンパク質に影響していることが示唆されたので、アピカルドメイン単独によるアミロイド線維を形成するタンパク質への効果を調べた。

第 5 章【総合考察】では、GroEL G192X 変異体と GroEL のアピカルドメインがアミロイド線維を形成するタンパク質に対する影響の結果を総合考察した。

第 6 章【結語】では、本研究のまとめを述べた。

第 2 章 GroEL Gly192 変異体を用いたシャペロニン機能の解析

2-1. 緒言

タンパク質は固有の立体構造にフォールディングされることにより本来の機能を発揮する。しかし、様々な要因により安定な構造ではないタンパク質も生体内に多数存在する。これらのタンパク質を本来の構造に正しくリフォールディングする機能をシャペロニン GroEL は保持している。GroEL の構造と機能には密接な関係が見られる。GroEL に存在するアミノ酸残基を変化させることで本来の機能を大きく改変することが知られている。GroEL サブユニットにおけるエクアトリアルドメインは、ヌクレオチドの結合及び加水分解の機能を有している(9)。このドメインに存在する 398 番目の Asp 残基を Ala に置換した D398A 変異体は、GroEL が本来保持している ATP の加水分解能力が大幅に減少することが知られている(21)。本研究室においてもエクアトリアルドメインに存在する 138 番目の Cys 残基を Trp に置換した C138W 変異体は、25℃と 37℃の異なる温度でシャペロニンサイクルが変化しているのを報告した(11)。GroEL が本来保持している機能のより詳細な解析を行うにあたり、特定の部位におけるアミノ酸残基を置換することは重要な手法となりうる。第 1 章で述べたように、Hinge II 部位に存在する Gly192 を Trp に置換した GroEL G192W 変異体のシャペロニンとしての機能を解析したところ GroEL WT と比較し、大きく活性が低下していた。そこで、本章では、アミノ酸残基の大きさを表す指標であるファンデルワールス体積に注目し、Gly192 を様々な大きさのアミノ酸残基に置換した GroEL G192X 変異体を作製して更に詳細な機能解析を行った。GroEL G192X 変異体を用いて構造学的な違い、シャペロニン機能への影響、ATP 非存在下における GroES との相互作用を調べ、Gly192 残基の変化に伴う構造・機能について評価した。そこで、Gly192 残基の GroEL におけるシャペロニン機能への関与を議論する。

2-2. 材料と方法

2-2-1. プラスミド単離

目的のプラスミドを保持している大腸菌のグリセロールストックを LB 培地 (Ampicillin 50 $\mu\text{g/ml}$) に植菌し, 37°C で静置培養した。次に, この培養液 3 ml を集菌し, illustra™ plasmid Prep mini spin kit を用いてプラスミドを単離した。Milli-Q により溶出した後, Nano Vue (GE Healthcare) を使用し, 260 nm の吸光度を測定してプラスミド濃度を求めた。DNA の濃度計算は光路長 10 mm, 吸光度 1 のとき, 50 $\mu\text{g/ml}$ となることを利用した。

[LB 培地組成]

1.0 %(w/v)Bacto Tryptone

0.5 %(w/v)Bacto Yeast Extract

1.0 %(w/v)NaCl

2-2-2. アガロース電気泳動

アガロース S を 1.0 % (w/v) 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 $\mu\text{g/ml}$ になるように加え, ゲル作製台に注ぎコームをさして室温で固化した。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, サンプルをゲル上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 程度まで流れた時点で泳動をやめ, trans イルミネーター (FAS-II, TOYOBO)によりバンドを確認した。

[TAE Buffer]

40 mM Tris-HCl(pH8.0 at 25°C)

40 mM CH₃COOH

1.0 mM EDTA

2-2-3. 形質転換

プラスミド DNA (100-200 ng) をコンピテントセル(JM109(DE3)株 100 μ l 又は BLR (DE3)株 200 μ l)に加え、氷中で 30 分インキュベートした。次に 42°Cで 45 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て 2 分間静置し、予め 42°Cに温めておいた SOC
培地を全量が 1 ml になるように加え、37 °Cで 1-2 時間振盪した。培養溶液を LB 寒天培地
(Ampicillin 50 μ g/ml)に塗布し、37 °Cで一晩静置培養した。

[SOC 培地(pH7.0)]

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

2-2-4. DNA Sequence

目的遺伝子の増幅は、BigDye®Terminator ver 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)を用い、PCR により目的配列の増幅を行った。PCR 後、125 mM EDTA 5 μ l, Milli-Q 水 10 μ l, さらに 99.5 % エタノール 60 μ l を加え、室温で 15 分間静置した。4°C, 15,000 rpm, 30 分間遠心して洗浄した。遠心終了後に上清を除去し、70 % エタノール 60 μ l を加え、4°C, 15,000 rpm, 30 分間遠心して洗浄した。遠心終了後に上清を除去し、Milli-Q 水 25 μ l を加えてボルテックスした。遮光した状態で冷蔵保存し、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。

2-2-5. GroEL G192X の作製

シャペロニン GroEL(DR-1, SR-1) G192X 各変異体は, GroEL(DR-1)発現プラスミド pETEL 又は SR-1 発現プラスミド pEL SR-1 を鋳型とし, PCR を用いた点変異導入により作製した。各変異体のプラスミド pETEL G192X 又は pEL SR-1 G192X を用いて大腸菌 JM109 を形質転換し, その後 DNA Sequence により変異導入を確認した。

2-2-6. タンパク質定量

5 倍希釈した Bio-Rad 社製 Protein assay kit を検量線作製用試験管 6 本とサンプル測定用の試験管に各 2ml ずつ分注した。検量線用試験管に目的の濃度となるように BSA(0.5 mg/ml)と Milli-Q 水を下記のように加え, 検量線の作製を行った。

濃度 (mg/ml)	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
BSA (μl)	0.0	8.0	16	24	32	40
Milli-Q	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サンプル測定用の試験管に加え, サンプル全量が 40 μl 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。

2-2-7. 大量培養

LB 培地を用い, 大量培養を行った。全ての培養は 37℃で行った。培地組成並びに手順を以下に示した。

[LB 液体培地 (pH7.4)]	[LB 寒天培地 (pH7.4)]
Polypepton 1.0%	Polypepton 1.0%
Yeast Extract 0.5%	Yeast Extract 0.5%
NaCl 1.0%	NaCl 1.0%
	Agar Powder 1.5 %

菌体は形質転換後, LB/Amp 寒天培地で Over night 静置培養した。シングルコロニーを単離し, 5 ml の LB/Amp 液体培地 (試験管) に植菌し, $OD_{600} \approx 0.6$ になるまで振盪培養した。次に 1 L のバッフル付き三角フラスコに添加した 300 ml の LB/Amp 液体培地に試験管で培養を行った培養溶液 300 μ l を植菌し, 37°C, 120 rpm で振盪培養した。 $OD_{600} \approx 0.4-0.6$ において終濃度 1 mM となるように IPTG を添加し, 再び 5 時間振盪培養した。培養終了後, 8000 rpm, 20 分, 4 °C で遠心分離により集菌した。

2-2-8. GroEL(野生型, 各種変異体)の精製

GroEL 野生型又は各種変異体の精製は, 室温にて AKTA-FPLC system(GE Healthcare)を用いた Superdex 200 Increase 10/300 GL(GE Healthcare)によるゲルろ過クロマトグラフィー, 続いて Resource-Q (GE Healthcare) による陰イオン交換クロマトグラフィーを行った。精製に用いた Buffer と手順を以下に示した。

—使用 Buffer—

[Lysis Buffer]	[ゲルろ過クロマトグラフィー用 Buffer]
50 mM Tris-HCl (pH7.8 at 25 °C)	50 mM Tris-HCl (pH7.8 at 25 °C)
2 mM EDTA	2 mM EDTA
2 mM DTT	2 mM DTT

[陰イオン交換クロマトグラフィー用 Buffer]

50 mM Tris-HCl (pH7.8 at 25 °C)

2 mM EDTA

2 mM DTT

1 M NaCl

[透析用 Buffer]

50 mM Tris-HCl (pH7.8 at 25 °C)

2 mM EDTA

2 mM DTT

1. 菌体破碎

集菌した菌体を 10 倍量(w/v)の Lysis Buffer に懸濁し, 1/100 重量のリゾチームも加え室温で 1 時間攪拌した。次に氷中において超音波破碎機で菌体破碎を行った。遠心分離 (14,500 rpm, 30 分, 4 °C) により沈殿物を除去し, 上清画分を回収した。

2. 除核酸処理

菌体破碎後の上清画分に室温で同体積の 5 % ストレプトマイシン溶液をゆっくりと滴下し, 滴下後室温で 1 時間攪拌して除核酸を行った。攪拌後, 遠心分離(14,500 rpm, 30 分, 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. 硫酸アンモニウム分画

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 %飽和となるまでゆっくりと添加し, 添加後さらに 1 時間攪拌した。攪拌後, 遠心分離 (14,500 rpm, 30 分, 4 °C) により沈殿画分を回収した。

4. ゲルろ過クロマトグラフィー

この沈殿画分を適当量のゲルろ過 Buffer に溶解し, 遠心分離(14,500 rpm, 10 分, 4 °C) により沈殿した変性タンパク質を除去し, 上清画分を回収した。そのサンプルをフィ

ルター濾過した後，AKTA-FPLC system に設置したゲルろ過クロマトグラフィー (superdex 200 Increase (volume 25 mL)) 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. 陰イオン交換クロマトグラフィー

回収した各画分を AKTA-FPLC system に設置した陰イオン交換クロマトグラフィー (Resource-Q (volume 6 mL)) にアプライした。0.1-1 M NaCl 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，精製確認

透析用 Buffer で一晚透析を行い，透析後蛋白定量を行った。その後，SDS-PAGE により精製標品の確認を行った。

精製における詳細な手順は図 2-1 に記した。

精製の流れ (GroEL)

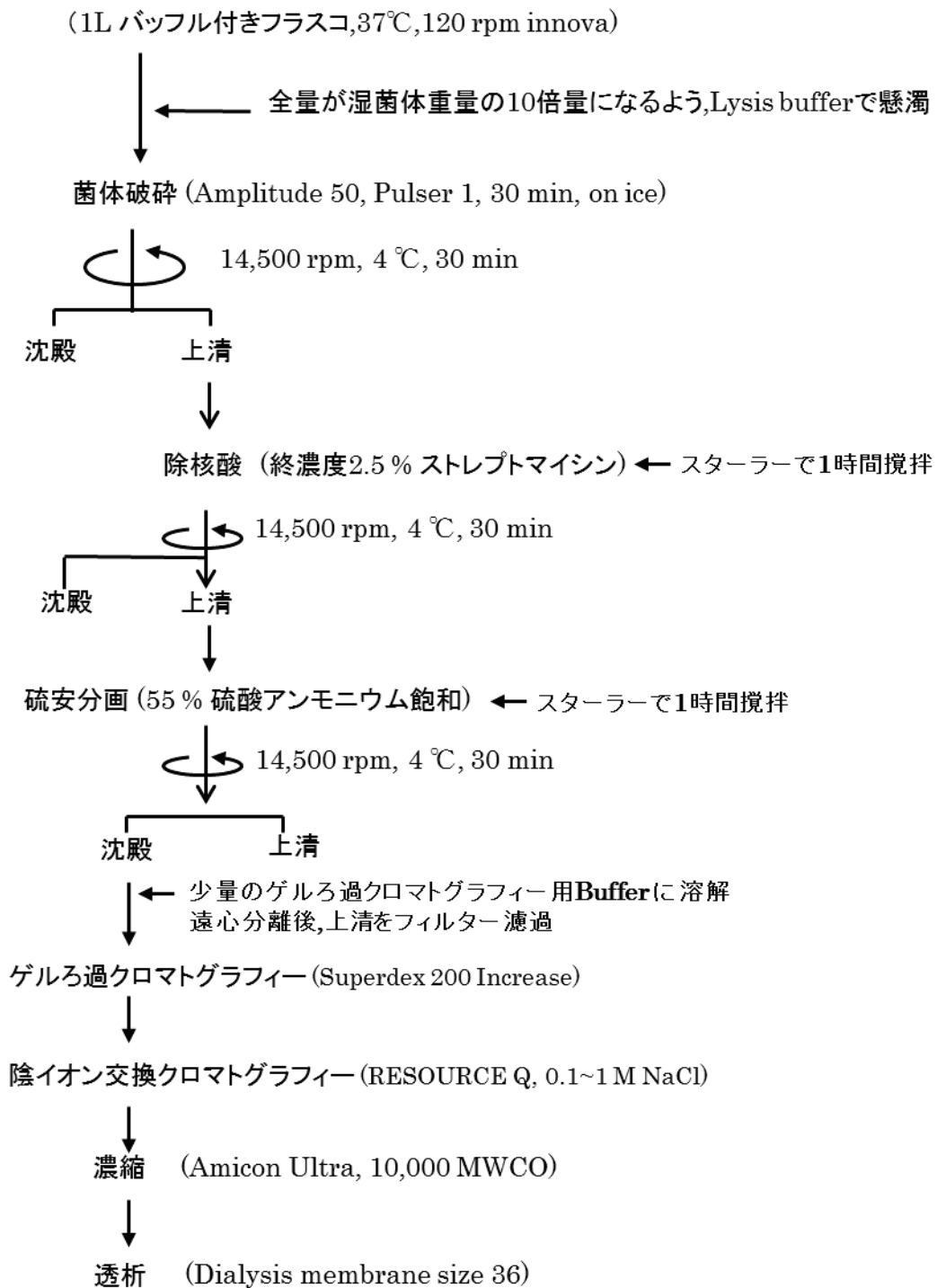


図 2-1. GroEL の精製過程

2-2-9. CD 測定

GroEL WT 及び GroEL G192X 変異体の 2 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 (pH7.8 at 37 °C)

10 mM Mg(CH₃COO)₂

20 mM KCl

2 mM DTT

200 µg/ml GroEL

JASCO J-820 Spectrophotometer 使用して、円偏光二色性 (CD) スペクトルを測定した。調製したサンプルは、光路長 1 mm の石英セルを用い、窒素ガス流速 2 L/分、25°C で以下に示す測定条件で測定した。

(測定条件) 感度: Low (1000 mdeg), 開始波長: 250 nm, 終了波長: 200 nm, データ取込間隔: 0.1 nm, 走査モード: continuous, 走査速度: 50 nm/分, レスポンス: 0.25 sec, バンド幅: 1.0 nm, 積算回数: 10 回

2-2-10. ANS 蛍光測定

アニリノナフタレンスルホン酸 (ANS) は電荷移動型蛍光色素の 1 つで、純水中に比べ疎水環境下に置かれるとその蛍光強度が著しく増大するため、疎水性プローブとして広く利用されてきた。この性質を利用し、野生型 GroEL と G192X 変異体の疎水性環境の違いを調べた。

[測定溶液組成]

50 mM Tris-HCl (pH7.8 at 37 °C)

10 mM Mg(CH₃COO)₂

20 mM KCl

2 mM DTT

200 µg/ml GroEL

ANS 蛍光スペクトル測定は, JASCO FP-6300 Fluorescence Spectrophotometer, 光路長 1 cm の石英セルを用いて, 以下の測定条件で行った。

(測定条件)測定モード:Emission, 励起バンド幅:5 nm, 蛍光バンド幅:5 nm, レスポンス:Medium, 感度:Medium, 励起波長:371 nm, 開始波長:400 nm, 終了波長:600 nm, 取込間隔:0.5 nm, 速さ:100 nm/分, 積算:5 回

2-2-11. ゲル濾過クロマトグラフィーによる分離分析

GroEL G192X 各変異体の四次構造の変化を分析するために, ゲル濾過クロマトグラフィーによる分析を行った。ゲル濾過分析に用いるカラムは, タンパク質分子の大きさごとで溶出される速度が異なる。そのため, 溶出したタンパク質分子のおおよその分子量を計測することが可能である。精製した GroEL G192X 各サンプルに終濃度が 40 % (v/v)となるようにアセトンを氷中においてゆっくりと滴下した。その後, 氷中で 10 分間攪拌した。攪拌後, 14,500 rpm, 4°C, 30 分間遠心分離し, 上清を回収した。回収した上清をゲルろ過クロマトグラフィー分析用 Buffer で一晩透析した後, Buffer を交換し, さらに 2 時間透析を行った。透析後, Vivaspin 500 (MWCO 10,000(GE Healthcare))により濃縮を行った。その後 5 µM となるように 0.5 ml で調整したサンプルを予めゲル濾過クロマトグラフィー分析用 Buffer で平衡化を行っていた AKTA-FPLC system に設置したゲルろ過クロマトグラフィー (superdex 200 Increase (volume 25 mL)) にアプライした。溶出条件は, 流速 0.75 ml/min, 0.5 ml=1 Fraction で行い, UV280nm の紫外光により溶出サンプルを計測した。GroEL のピークがみら

れた画分は protein assay Kit 200 μ l に対して 4 μ l 添加し, Infinite 200(TECAN)

により 595 nm の可視光で計測した。その後 SDS-PAGE による分析を行った。

測定 Buffer の組成は下記に記す。

[ゲルろ過クロマトグラフィー分析用 Buffer]

50 mM Tris-HCl (pH7.8 at 25 °C)

2 mM EDTA

2 mM DTT

100 mM NaCl

2-2-12. ATPase 活性測定

ATPase 活性は, 37 °C において, GroEL が ATP を加水分解することによって生じる遊離リン酸を比色定量することにより測定した。Buffer 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 Oxalate

B 溶液 Hexaammonium Heptamolybdate
Tetrahydrate in 4N HCl

C 溶液 Triton x-100

D 溶液 34 % Sodium Citrate Dihydrate

[ATPase 用 Buffer]

50 mM Tris-HCl (pH7.8 at 37 °C)

10 mM Mg(CH₃COO)₂

20 mM KCl

2 mM DTT

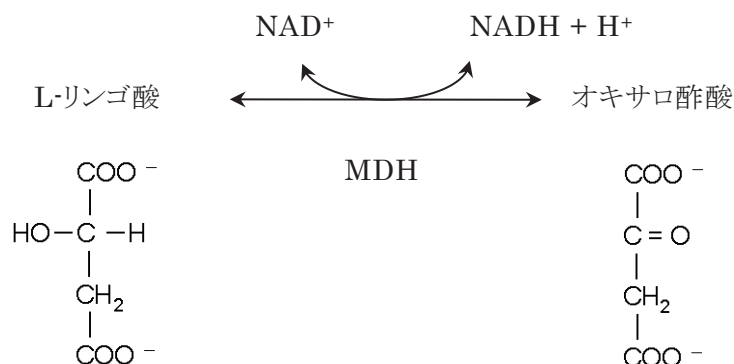
発色溶液は A 溶液と B 溶液を 3:1 の割合で混合し, 遮光して 20 分以上攪拌した後, 混合溶液の 1/1000 量の C 溶液を添加し 10 分以上攪拌後遮光しながら whatman ろ紙 No. 5 でろ過した。0.1 μ M に調製した GroEL₁₄, GroEL₇又は GroEL₁₄/GroES₇, GroEL₇

/GroES_i を含む反応溶液を 10 分間、37℃でインキュベートした。次に ATP(2.0 mM)を添加し、反応を開始した。反応開始から 10 分ごとに反応溶液から 50 μ l とり、7% 過塩素酸溶液 550 μ l と混合し反応を停止させ、水中にて保存した。これを 60 分間行った後、30 分間水中でインキュベートし、これを遠心 (15,000 rpm, 4 $^{\circ}$ C, 10 分間) して反応溶液中のタンパク質を沈降させ、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 分後に D 溶液 100 μ l を加えて攪拌した後に遮光して 30 分間放置した。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。結果は GroEL が関与していない、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表記した。

2-2-13. MDH リフォールディング活性測定

MDH (Malate dehydrogenase:リンゴ酸デヒドロゲナーゼ (二量体:70 kDa)) は L-リンゴ酸を NAD⁺ により可逆的に脱水素してオキサロ酢酸と NADH を生成する反応を触媒する酵素である。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 の酵素活性を定量できる。

MDH は以下の反応を触媒する。



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]	[Assay Buffer 組成]
30 mM MOPS-KOH (pH7.4 at 25 °C)	100 mM Tris-HCl (pH7.8 at 25°C)
10 mM Mg(CH ₃ COO) ₂	1.67 mM オキサロ酢酸
10 mM KCl	0.254 mM β-NADH

25 μM MDH を 6.25 mM DTT 存在下で 3 M Gdn-HCl を添加し、37℃で 30 分変性させた。予め 0.5 μM に調製しておいた GroEL₁₄, GroEL₇ 又は GroEL₁₄/GroES₇, GroEL₇/GroES₇ を含む Refolding Buffer に、終濃度が 0.5 μM 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 μl 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 分間継続して測定した。これを 0 分とし、5 分後に ATP (2.0 mM)を添加し、それ以降は、10 分毎にサンプリングを行った。結果は未変性 MDH の比活性を 100%として活性回復率を百分率で表記した。

2-2-14. Rhodanese refolding assay

Rhodanese(チオ硫酸シアニドトランススルフェラーゼ(単量体:33kDa)はチオ硫酸の硫黄をシアン化物(求核受容体)に転移することでシアン化物を無毒化する反応を触媒する酵素である。Rhodanese は以下の反応を触媒する。



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できる。

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 Rhodanese の活性回復率の指標とした。Rhodanese はウシ肝臓由来のものを使用し, GroES, ATP なしでは再生の起こらない Non-Permissive 条件下で測定した。以下に発色溶液, 活性溶液, Refolding Buffer の組成を示す。

		[リフォールディング Buffer 組成]
[発色溶液組成]	[活性溶液組成]	Non-permissive Buffer
HCHO 1.61 %	9.8 mg/ml KCN	30 mM Tris-HCl (pH7.2 at 25°C)
Fe(NO ₃) ₃ 0.87 %	50 mM Na ₂ S ₂ O ₃	50 mM KCl
HNO ₃ 1.13 %	40 mM KH ₂ PO ₄	10 mM Mg(CH ₃ COO) ₂

Rhodanese を終濃度 6 M Gdn-HCl で 25°C, 1 時間変性させた。予め 0.69 μ M に調製しておいた GroEL₁₄, GroEL₇ 又は GroEL₁₄/GroES₇, GroEL₇/GroES₇ を含む Refolding Buffer に, 終濃度が 0.46 μ M となるように変性 Rhodanese を添加し, 25°C で反応を開始した。5 分後に ATP を終濃度 2 mM となるように添加した。反応開始から 10 分おきに, 反応溶液から 200 μ l 採取し, 活性溶液 1 ml と混合して 25°C, 10 分間インキュベートした。次にこの溶液 200 μ l と発色溶液 2 ml を混合して 25°C で 10 分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 溶液を用いて作成した検量線から濃度を算出した。結果で示すデータは, 未変性 Rhodanese の比活性を 100 % として活性回復率を百分率で表記した。

2-2-15. 分子間相互作用定量(QCM)

分子間相互作用定量装置 AffinixQNP(Initium)を用いて GroES をセンサーに固定化し、そこに GroEL を添加することで、GroEL-GroES の相互作用を定量的に解析した。QCM センサー上への GroES を固定するために、AFFINIX 専用固定化キット(Initium)を用いて、基板上に固定化したカルボン酸とタンパク質のアミノ基を共有結合させることで分子の構造を保持したまま安定に固定化した。センサー上に固定化した GroES は、7 つのサブユニットがリンカーで繋がってコンカテマーを形成している ESC7(88)を使用し、添加するタンパク質を GroEL として解析を行った。

<キット内容>

COOH-SAM reagent plus

EDC

NHS

Ethanolamine-solution

Buffer A (200 mM citrate-buffer pH4.0)

Buffer B (200 mM citrate-buffer pH5.0)

<センサーの洗浄>

1. 1% SDS 溶液に浸した綿棒で電極を擦る。
2. MQ 洗浄後、ピランハ溶液(硫酸 3:1 過酸化水素水)2 µl 添加し、室温で 5 分静置。

※ピランハ溶液は使用直前に作製した。

3. MQ で洗浄後、再びピランハ溶液を 2 µl 添加し、室温で 5 分静置。
4. MQ で洗浄後、余分な水分を取り除く。

<固定化>

1. 50 μ l の SAM 溶液をセンサー電極部分にマウントし, 室温で 1 時間静置。
2. MQ で洗浄後, 水分を除去。
3. NHS 溶液 50 μ l と EDC 溶液 50 μ l を混合。
4. NHS/EDC 混合溶液をセンサー電極部分に 50 μ l 添加し, 室温で 15 分静置。
5. MQ で洗浄後, 10-100 μ g/ml のサンプル(ESC7)を Buffer A で 50 μ l に調製したものを添加し, 室温で 1 時間静置。

※固定化するタンパク質の pI より 1 程度低い Buffer (Buffer A or B)を選択。

6. MQ で洗浄後, Ethanolamine-solution を 100 μ l 添加し, 室温で 30 分以上静置。
7. 実験で使用する Buffer (今回の実験では ATPase Buffer を使用)へ交換。

<測定>

1. ATPase Buffer で 20-30 分間周波数を安定化させる。
2. 安定後, 調製したサンプル(GroEL₁₄, ATP)を添加した。
3. 再度測定する場合は, セルの溶液を除去し, 2 M Gdn-HCl を 10 μ l 添加し, 室温で 5 分静置し, MQ で洗浄後, 再び ATPase Buffer で周波数を安定化し, 測定した。

2-2-16. QCM によるカイネティックパラメーター算出

複数の濃度における測定値をもとに, 解離定数 K_d , 結合定数 K_a , 解離速度 k_{off} , 結合速度 k_{on} を算出することができる。センサーセルに固定化した ESC7 に対し, ATP 存在下又は非存在下において SR-1 G192I をそれぞれ 5 nM, 10 nM, 15 nM, 20 nM, 25 nM 添加し, 測定した振動数よりカイネティックパラメーターの算出を行った。図 2-2 に ATP 存在下における GroEL WT の各濃度における GroES との相互作用解析の結果を示す。

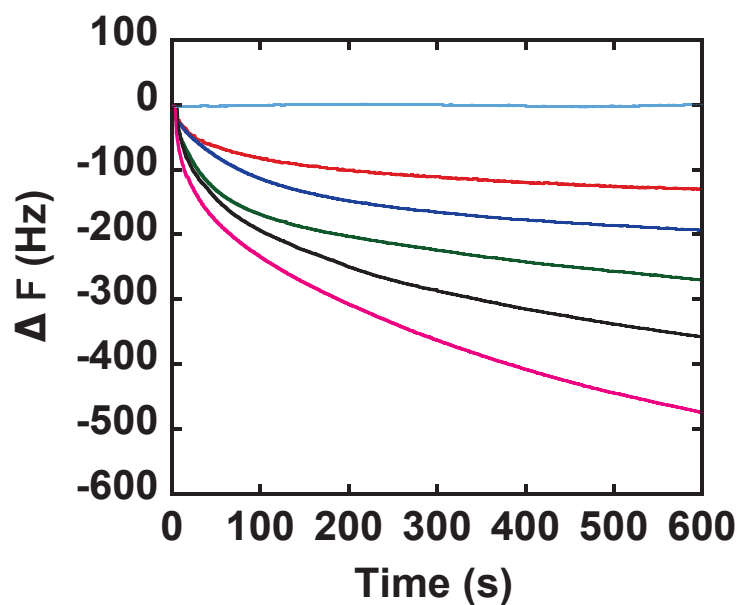


図 2-2. 異なる濃度における GroEL WT と GroES の相互作用

ESC7 を $50 \mu\text{M}$ センサー上に固定化して,
 0 nM(●), 5 nM(●), 10 nM(●), 15 nM(●), 20 nM(●), 25 nM(●)
 における GroEL 各濃度での相互作用を示す。

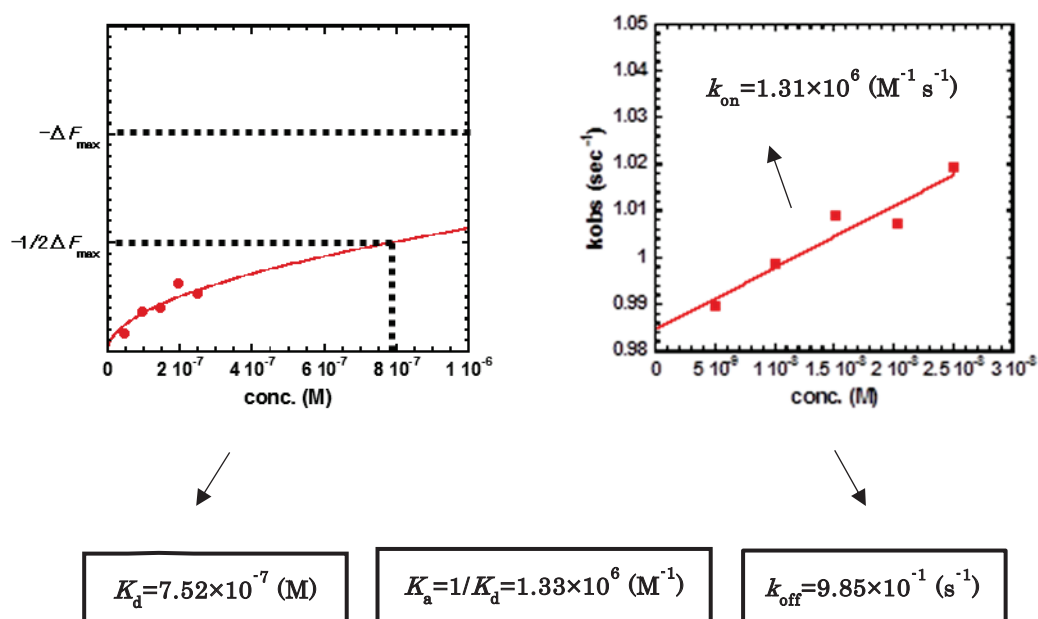


図 2-3. QCM における平衡解析・速度解析

左: K_d の算出プロット, 右: k_{on} , k_{off} の算出プロット

GroELの吸着量は濃度依存的に起こり、この時の各濃度の平衡値を解析することでタンパク質間の結合強度を表す K_d の値を算出することが可能となる。解離定数は結合定数 K_a の逆数でその値が小さいほど GroEL と GroES の相互作用が強いとされている。しかし、同じ解離定数の値における相互作用でも、結合速度が速く解離速度が遅い反応と結合速度が速く解離速度も速い反応が存在している。そのため、分子間の相互作用を詳細に解析する場合は、結合速度 (k_{on}) と解離速度 (k_{off}) の算出を行う。解離定数(結合定数)を算出する実験は、異なる濃度の添加サンプルにおける独立の測定を繰り返す。このとき得られたプロットを非線形回帰計算により曲線フィッティングを行うことで、最適な K_d と ΔF_{max} の組み合わせを導き出すことができる。図 2-3 の左の図に示した解離定数 (または結合定数) を算出するには、図 2-2 のように測定した各濃度時の飽和吸着量 ΔF を算出し、横軸を GroEL 濃度、縦軸を飽和吸着量としてプロットすることによって算出した。また、図 2-3 の右の図に示したように、異なるゲスト分子濃度の吸着カーブをフィッティングすることで、横軸を GroEL 濃度、縦軸を k_{obs} としてプロットし、解離速度 k_{off} 、結合速度 k_{on} を算出した。本実験におけるセンサーグラムのフィッティングと平衡定数の算出には、AQUA(Affinix Q User Analysis:Initium)を用いた。

2-3. 結果

2-3-1. 野生型 GroEL と各種 G192X 変異体の構造に関する解析

GroEL G192X 変異体は野生型 GroEL(GroEL WT)における 192 番目の Gly 残基 (Gly192)をファンデルワールス体積に注目して様々なアミノ酸に置換した変異体である。Gly192 は図 2-4 に示したように GroEL の構造変化の支点となる Hinge II 部位に存在する。

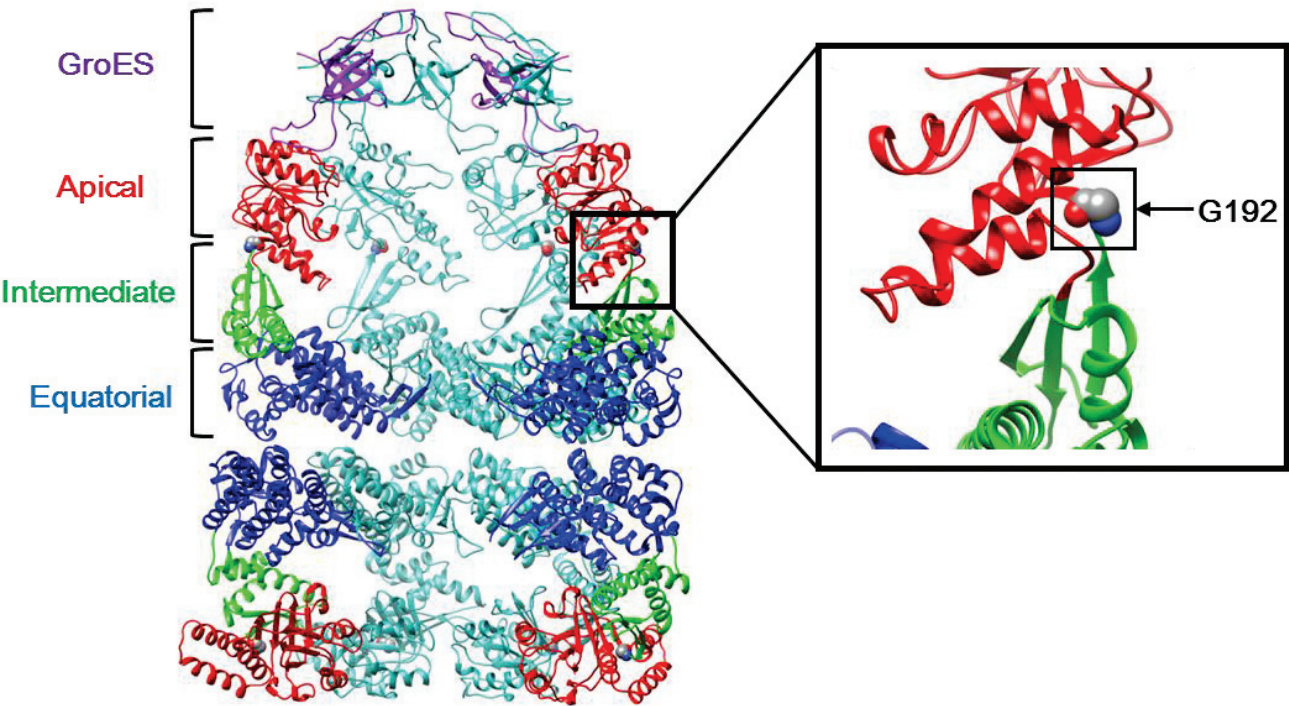


図 2-4. GroEL の Hinge II 部位における Gly192 の位置

	G192	G192A	G192N	G192V	G192I	G192F	G192Y	G192W
Van der Waals Volume (\AA^3)	60.1	88.6	114.1	140.0	166.7	189.9	193.6	227.8

表 2-1. GroEL における Gly 残基を様々なアミノ酸残基に置換した変異体の
ファンデルワールス体積

GroEL における Gly192 のアミノ酸残基を置換したことによる二次構造への影響を CD スペクトルにより調べた。図 2-5 に GroEL WT 及び GroEL G192X 各変異体の二次構造を解析した結果を示した。GroEL WT 及び GroEL G192X 変異体は全ての変異体に共通して 208 nm 付近と 222 nm 付近に負の極大が観測された。このシグナルは α ヘリックス構造に特異的にみられるもので、正常な立体構造を保っている GroEL は α ヘリックス構造を多く含んでいる。この結果で示したように、GroEL WT における Gly192 を大きさや性質の異なる様々なアミノ酸残基へ置換することによる GroEL の二次構造へ影響することはないと示された。また、GroEL WT 及び GroEL G192X 各変異体の ANS 蛍光スペクトルを測定した(図 2-6)。ANS の蛍光は GroEL WT から順に Gly を置換したアミノ酸残基が大きくなるにつれて 478 nm 付近にみられる蛍光極大がより増加しているのが観測された。異なるサンプル間で測定した ANS 蛍光の 478 nm 付近における蛍光が増大しているということは溶液中で疎水性領域が増加しているとされている。図 2-5 における図の内部に示したファンデルワールス体積と蛍光強度の極大がみられた 478 nm の値の関係においてもファンデルワールス体積が大きくなるにつれて 478 nm の蛍光値が増加しているのが見てとれる。CD と ANS の結果より、GroEL G192X 変異体は GroEL WT から全体的な構造は変化していないが、ある特定の構造が変化することで GroEL での疎水性が変化していることが考えられた。

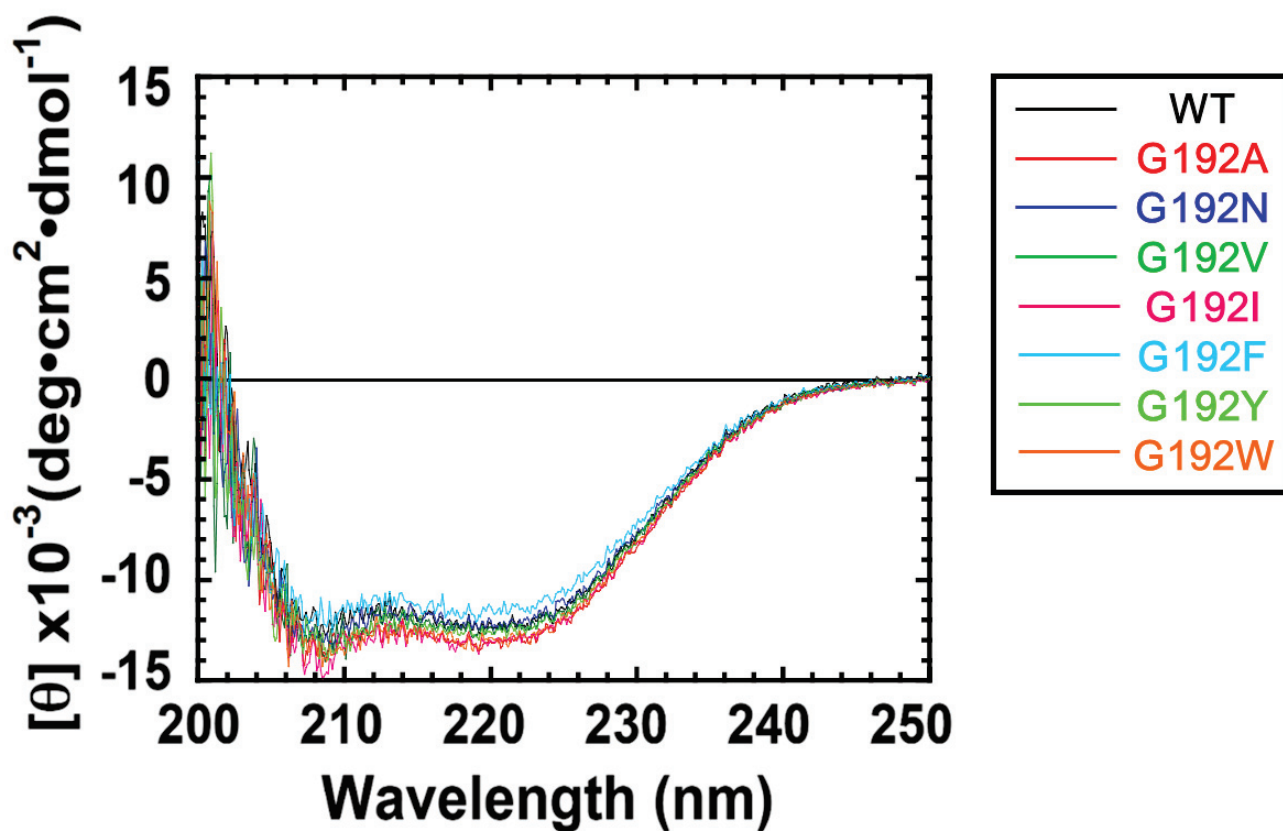


図 2-5. GroEL WT 及び各種 G192X 変異体の CD スペクトル測定

GroEL WT(—), GroEL G192A(—), GroEL G192N(—), GroEL G192V(—), GroEL G192I(—), GroEL G192F(—), GroEL G192Y(—), GroEL G192W(—)の結果をそれぞれ示している。

各変異体において、208 nm と 222 nm に負の極大がみられる。これは、 α ヘリックス構造の典型的なグラフを示す。GroEL WT 及び各 GroEL G192X 変異体のトレースは一致していたことから、二次構造は変化していないことが確認された。

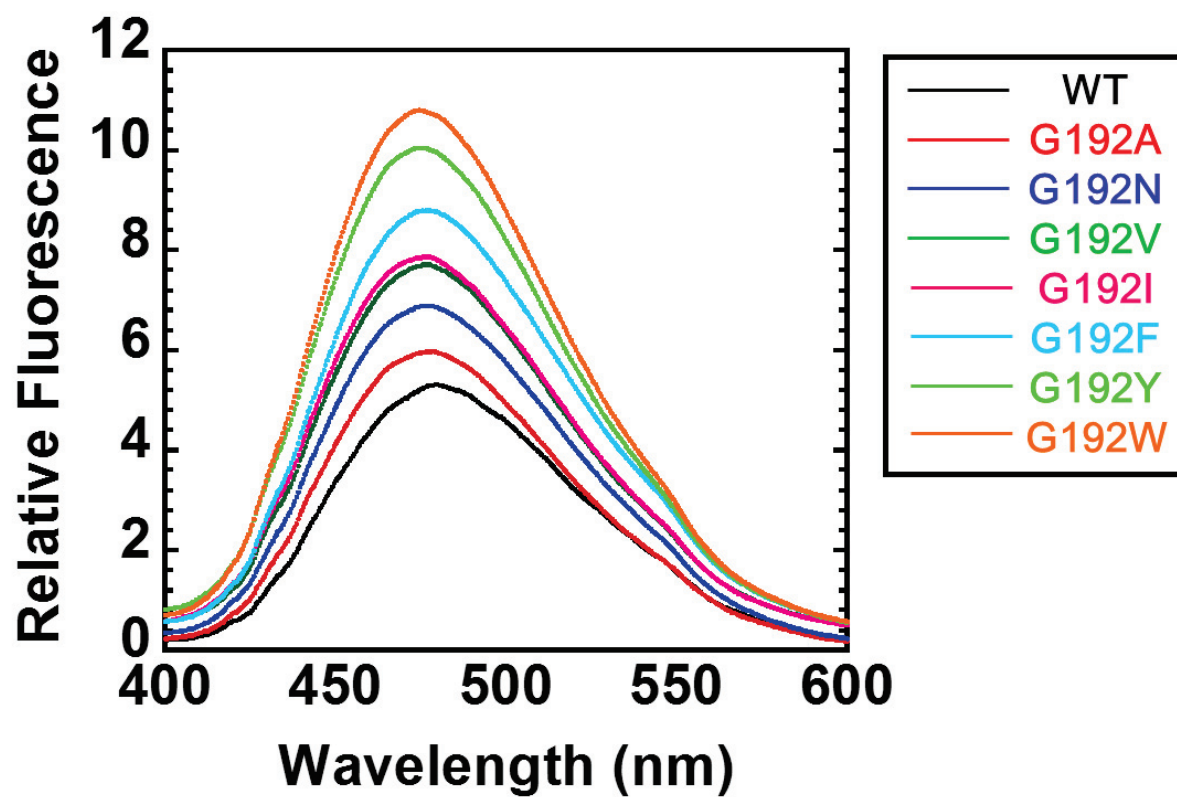


図 2-6. GroEL WT 及び各種 GroEL G192X 変異体の ANS 蛍光スペクトル測定

GroEL WT 及び各 GroEL G192X 変異体において 478 nm 付近に蛍光の極大が観測された。ファンデルワールス体積が大きくなるほど 478 nm における蛍光の極大が大きくなっているのが示された。

なお, 本章における GroEL WT 及び GroEL G192X 変異体のそれぞれのグラフにおける結果は上記と同じ色により表記する。

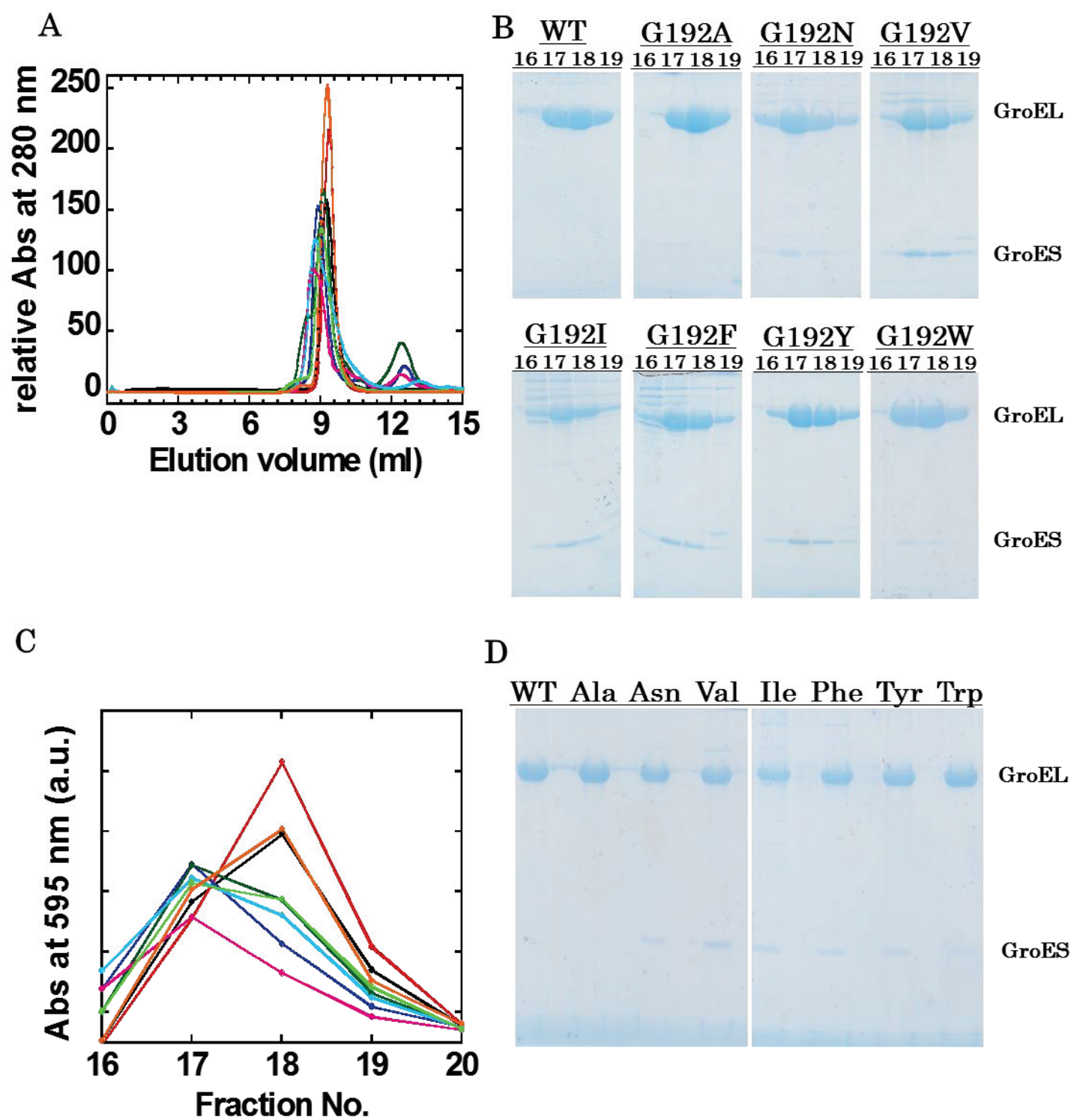


図 2-7. GroEL G192X 変異体のゲルろ過クロマトグラフィー

- A. UV 280 nm における溶出ピーク
- B. 溶出画分 16-19 番目の SDS-PAGE 分析
- C. Abs 280 nm における溶出画分 16-20 番目の溶出ピーク
- D. 溶出画分 18 番目の GroEL G192X 各変異体の SDS-PAGE

ゲル濾過クロマトグラフィー分析の結果は図 2-7 に示した。溶出後のサンプルは、GroEL WT と比較し、GroEL G192X 変異体間で溶出された体積が 0.5-1.5ml にかけてわずかにずれているようにみられる。SDS-PAGE による分析では GroEL が溶出する 17, 18 番目の画分において GroEL G192X 各変異体は GroEL WT と同じ様に GroEL の位置にバンドが確認出来た。ピーク画分に含まれているタンパク質をより詳細に解析することを目的とした protein assay Kit による定量実験の結果において、野生型 GroEL, GroEL G192A, GroEL G192W は 18 番目の画分に極大のピークがみられるのに対し、他の GroEL G192X 変異体は 17 番目の画分に極大のピークがみられた。GroEL WT における極大のピークを表している 18 番目の画分に関して、GroEL WT と各 G192X 変異体を SDS-PAGE により分析したところ変異体間で濃淡の度合いは異なっているが、全ての変異体において GroEL の位置にバンドが確認された。以上の結果より、GroEL G192X 変異体間で四次構造がわずかに変化していることが考えられた。GroEL における Gly192 を他のアミノ酸残基へ置換したことによる構造の違いがシャペロニンとしての機能に与える影響を調べるために、ATP 加水分解活性及び MDH と Rhodanese を基質に用いたリフォールディング活性測定を行った。

2-3-2. ATPase 活性測定

GroEL WT と GroEL G192X 各変異体との ATPase 活性測定の比較を行った。37℃におけるコントロールとして GroEL WT も同時に測定した。

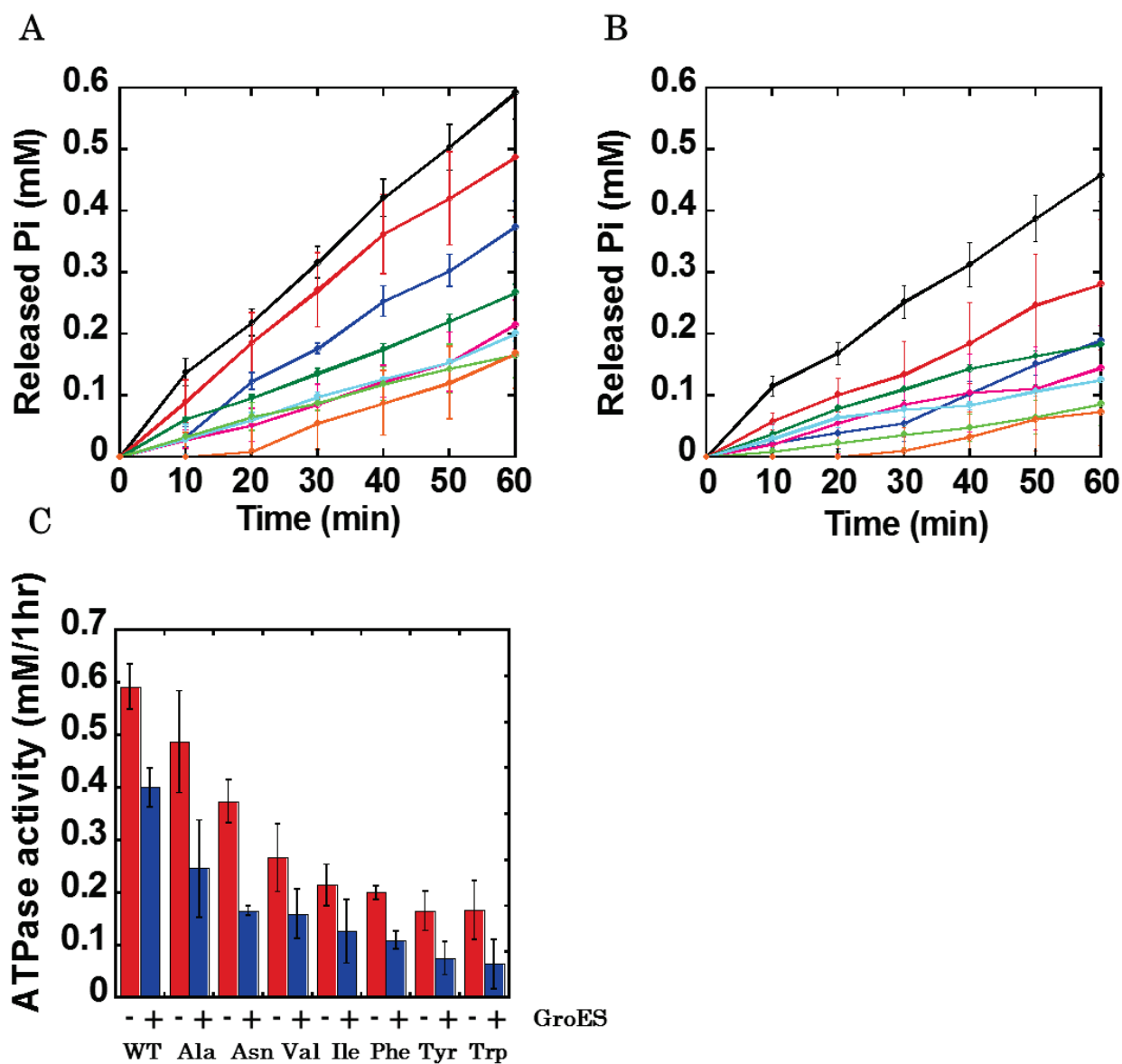


図 2-8. GroEL WT 及び GroEL G192X 各変異体の ATPase 活性測定

A: GroES 非存在下, B: GroES 存在下

C: 60 分時点における ATPase assay の測定結果

GroES 非存在下 (■), GroES 存在下 (■)

各測定は、3 回測定の平均を示し、3 回測定の標準誤差を算出した。

ATPase 活性測定 of GroES 存在下, 非存在下の測定結果は図 2-8 に示した。図 2-8A と B でそれぞれ示した測定結果では, GroES 存在下, 非存在下いずれにおいても GroEL WT と比較し, GroEL G192X 各変異体は, ATP の加水分解活性が低下していることが明らかとなった。図 2-8C で示したように, この活性の低下は, 置換したアミノ酸残基のファンデルワールス体積が大きくなるにつれて, より低下しているようにみられた。

2-3-3. MDH, Rhodanese リフォールディング活性測定

GroEL WT と GroEL G192X 各変異体のシャペロニン活性を比較するために, MDH, Rhodanese のリフォールディング活性測定を行った。図 2-9A で示したように, MDH リフォールディング活性において, GroEL G192X 変異体は GroEL WT の 40%ほどしか変性 MDH を戻しておらず, より大きい残基に置換した変異体ほどより低い活性を示していた。図 2-9B で示したように, Rhodanese リフォールディング活性はより顕著な活性の低下がみられ, 最も高い GroEL G192A 変異体においても GroEL WT の 50%程度の活性しかみられず, 他の変異体に至っては Spontaneous(変性 Rhodanese の自発的なリフォールディング)と同程度の極めて低い活性しか示さなかった。図 2-9C で示したように, GroEL G192X 各変異体の変性基質のリフォールディング能力は GroEL WT と比較し, 図 2-8C で示した ATPase assay の結果と同様に, 低下しているのがみられた。Gly192 を置換したことによる影響を明確にするために, 置換したアミノ酸残基のファンデルワールス体積とシャペロニン機能解析の結果についての関係を図 2-10 にまとめた。

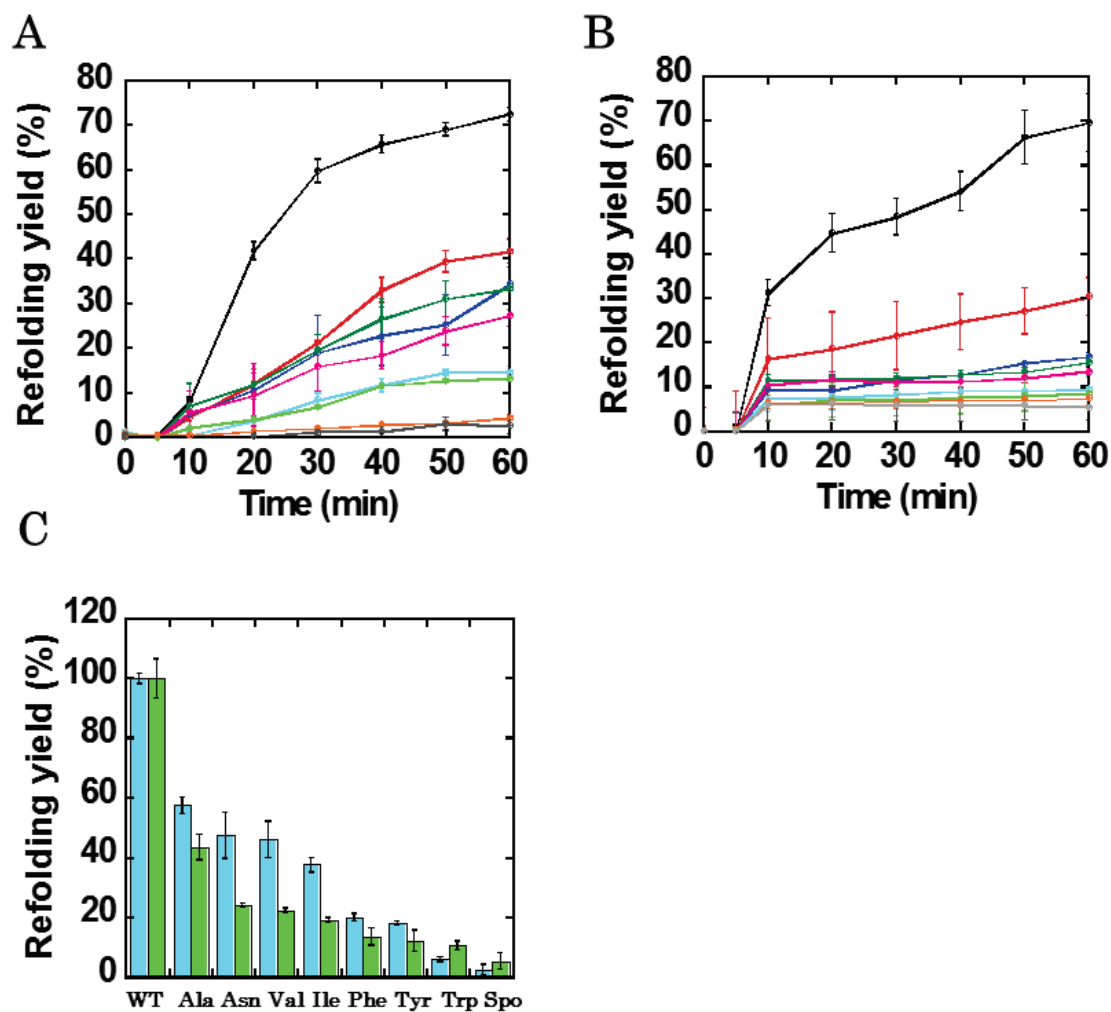


図 2-9. GroEL の MDH, Rhodanese リフォールディング活性測定

A:MDH refolding assay B:Rhodanese refolding assay

Spontaneous(ー):基質の自発的な再生を示している。

C: 60 分における MDH,Rhodanese のリフォールディング活性測定

MDH リフォールディング活性測定(■), Rhodanese リフォールディング活性測定(■)

GroEL G192X の値は, 60 分における GroEL WT の測定結果を 100 %として算出した。

各リフォールディング活性測定は 3 回測定の平均を示し, 3 回測定の標準誤差を算出した。

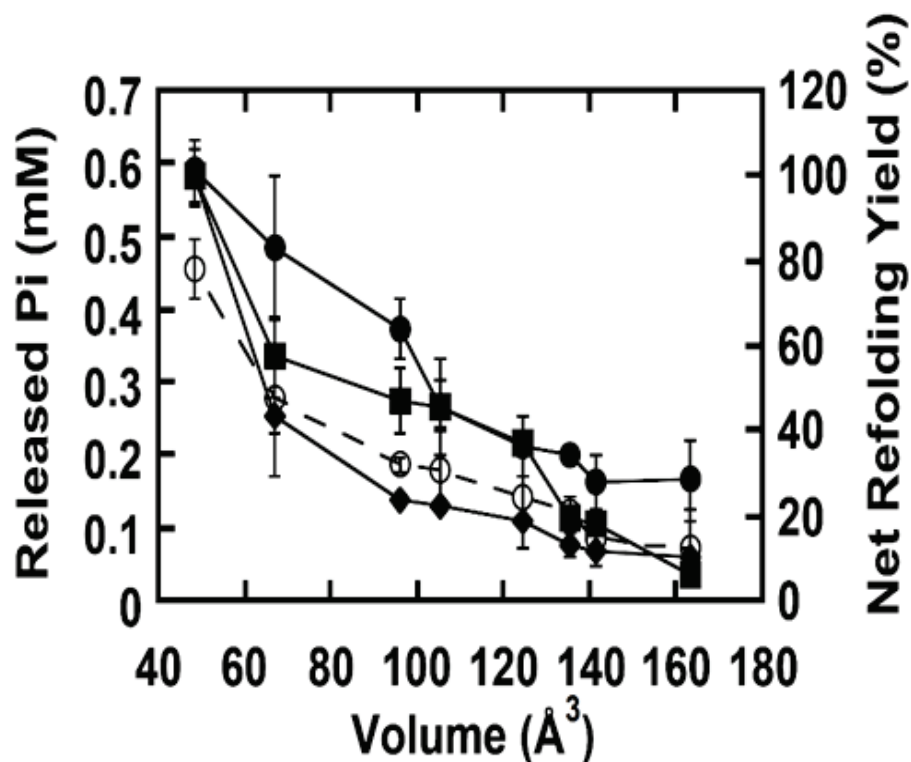


図 2-10. G192X 変異体のファンデルワールス体積とシャペロニン機能の関係

それぞれの結果は 60 分時点での数値を示し, MDH と Rhodanese のリフォールディング活性測定の結果は, GroEL WT の測定結果を 100%として算出した。

ATPase assay (GroES 非存在下: ●), ATPase assay (GroES 存在下: ○)

MDH リフォールディング活性測定(■), Rhodanese リフォールディング活性測定(◆)

それぞれの結果は, 3 回測定の平均値をプロットし, エラーバーは標準誤差を示す。

図 2-10 における GroEL G192X 各変異体のファンデルワールス体積と ATPase 活性, MDH, Rhodanese のリフォールディング活性測定の結果では, GroEL WT と比較して GroEL G192X 各変異体は更に活性が低下しているのがみられた。この結果を受けて, GroEL G192X 各変異体の *cis*-ring における Open 状態になっている度合いをより定量的な手法で解析するために QCM での測定を行うことにした。

2-3-4. GroEL G192X 変異体と GroES の相互作用解析

過去の研究において, GroEL G192W 変異体は ATP 非存在下で GroES と結合するということが明らかとなっているため, QCM(Quartz Crystal Microbalance assay)において, 各変異体と GroES との親和性を ATP 非存在下でどのような変化がみられるかの実験を行った。

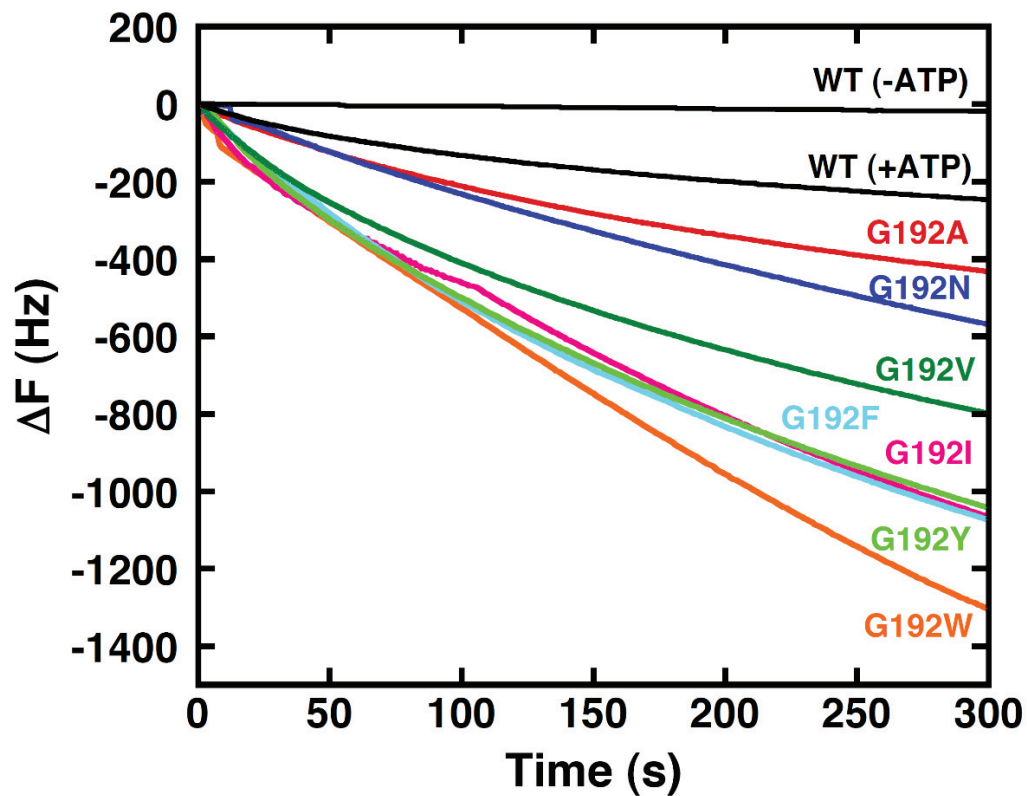


図 2-11. ATP 非存在下における GroEL G192X 変異体と GroES の相互作用測定

ホスト分子として ESC7 を $50 \mu\text{M}$ センサー上に固定化している。

ゲスト分子(添加した GroEL) を 20 nM 添加して GroEL と GroES との相互作用を解析した。

GroEL WT は ATP 非存在下では GroES と結合しないので、

ATP 存在下(+ATP), 非存在下(-ATP)における相互作用解析の結果をそれぞれ示す。

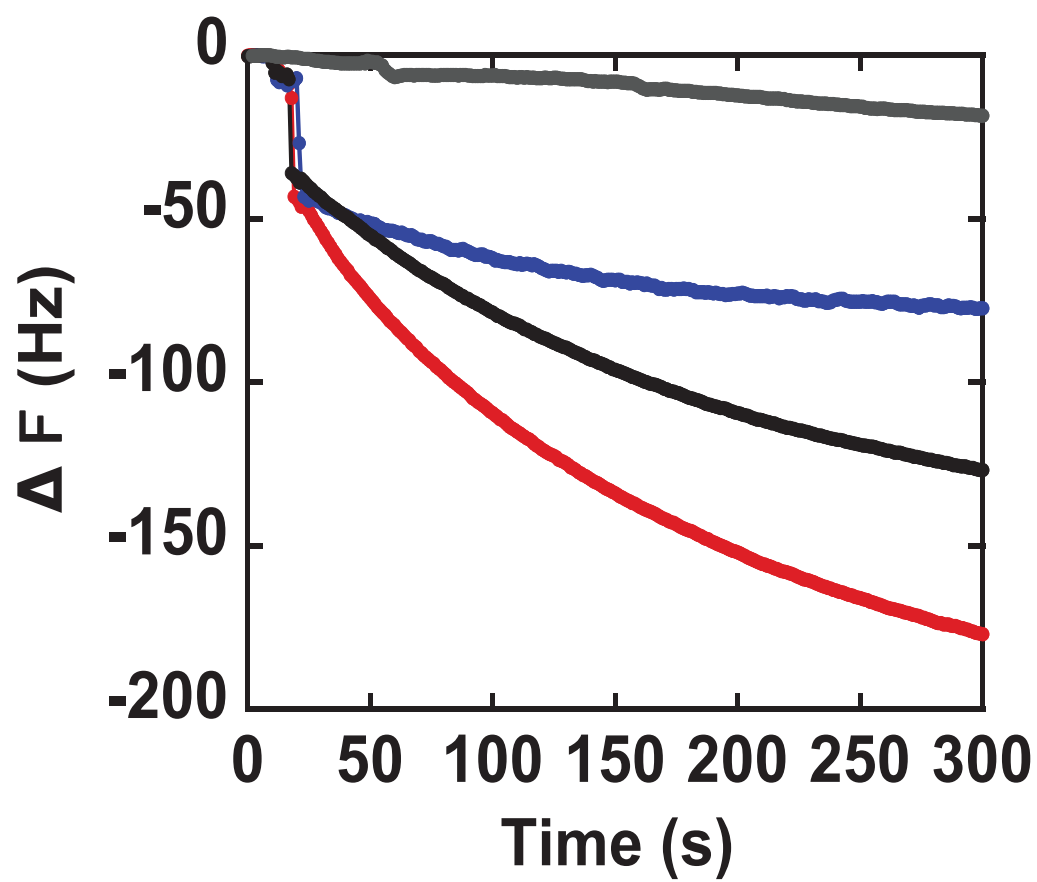


図 2-12. ATP 存在下, 非存在下における GroEL G192N 変異体と GroES の相互作用

ATP 非存在下における GroEL WT と GroES(●)

ATP 非存在下における GroEL G192N と GroES(●)

ATP 存在下における GroEL WT と GroES(●)

ATP 存在下における GroEL G192N と GroES(●)

図 2-11 に示した QCM の結果より, GroEL WT は ATP の非存在下では基板上に固定化した GroES とは結合しない。しかし, ATP の存在下では基板上に固定化した GroES へ結合している。さらに, ATP の非存在下において GroEL G192X 各変異体は ATP 存在下の GroEL WT よりもさらに GroES の結合が生じている。GroEL の Gly192 を他のアミノ酸残基に置換したことで GroEL G192W は ATP 非存在下でさえも *cis*-ring 側に GroES が結合していた。これより, 他の GroEL G192X 各変異体も, アピカルドメインが Open 状態になっており, *cis*-ring 側には GroES が結合することで基質のリフォールディングを介助していないことが考えられる。また, 図 2-12 で示したように, ATP 存在下と非存在下で GroEL G192N 変異体は基板に固定化した GroES への結合に違いがみられた。この結果と GroEL G192X 変異体間におけるシャペロニン活性の違いから *trans*-ring 側でシャペロニン機能が働いている可能性も考慮される。そのため, *trans*-ring 側における GroEL の機能を排除した GroEL シングルリング変異体 SR-1 変異体を用いた機能解析を行った。この SR-1 における Gly192 残基を Val, Ile, Trp にそれぞれ置換した変異体を作製し, これらの変異体を用いたシャペロニン活性を測定することで, より詳細な GroEL G192X 変異体のシャペロニン機能を解析することにした。

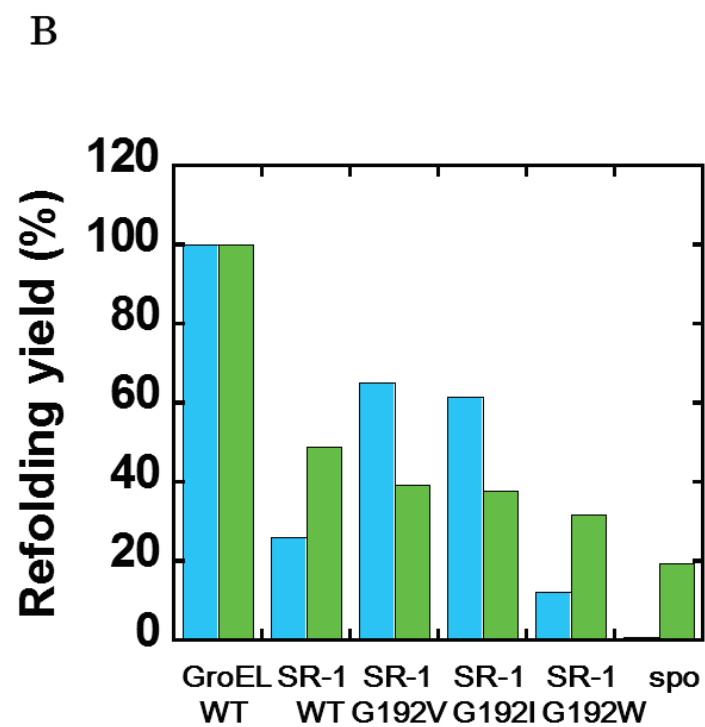
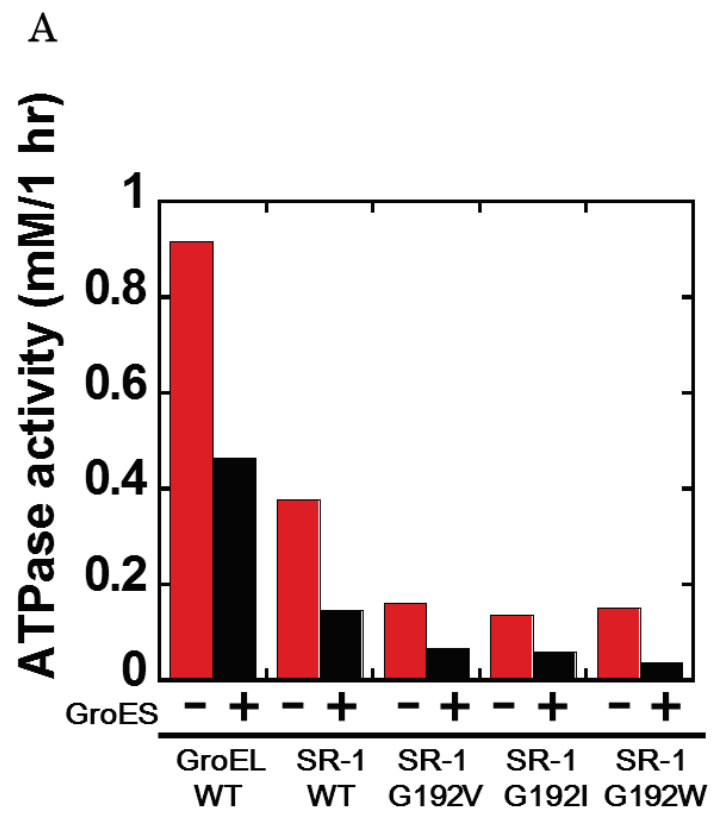


図 2-13. SR-1 G192X 変異体のシャペロニン機能解析

A. SR-1 G192X 変異体の ATP 加水分解活性

GroES 非存在下(■), GroES 存在下(■)

B. SR-1 G192X 変異体のリフォールディング活性

MDH (■), Rhodanese (■)

GroEL G192X 変異体は、ATP の非存在下で GroES が結合することを示した。シャペロニン活性の測定において、Gly192 残基を置換した残基によって活性に違いがみられた。この違いは、基質が ATP 非存在下で GroES が結合する *cis*-ring 側なのか、または ATP 存在下で GroES が結合すると考えられる *trans*-ring 側でリフォールディングが補助された結果を反映していると考えられた。そこで、どちらのリングでリフォールディングの介助を行うかをより詳細に解析するために、GroEL のシングルリング変異体(SR-1)における Gly192 残基を他のアミノ酸残基に置換した SR-1 G192X 変異体を作製し、そのシャペロニン機能の解析を行った。SR-1 G192X 変異体であれば、*cis*-ring 側のみでの機能が結果に反映されることが期待される。図 2-13A に GroEL WT, SR-1 WT, SR-1 G192X 変異体の ATP 加水分解活性の結果を示した。この結果において、SR-1 WT は GroEL WT の半分程度の活性を示し、SR-1 G192X 変異体は SR-1 WT よりもさらに低下した結果を示していた。これは、2 つのリングが 1 つになったことで ATP の加水分解効率が低下したことが考えられる。さらに、GroES 存在下では GroES 非存在下よりもそれぞれ活性が低下していたことから GroES との相互作用が考えられた。図 2-13B で示した Rhodanese refolding assay の結果において、SR-1 WT は GroEL WT の半分程度のリフォールディング活性を示しており、SR-1 G192X 変異体は置換したアミノ酸残基の大きさにより活性が低下しているのがみられた。その一方で、MDH を基質としたリフォールディング活性において、SR-1 WT はほとんど活性を示していなかった。シングルリング変異体 SR-1 はリング間のアロステリックシグナルが生じないために一度だけシャペロニンサイクルがまわる「シングルターンオーバー状態」になるとされている(89)。このため、シングルリング変異体は MDH がキャビティ内部に落とし込まれた後 GroES が解離せず外に放出されず活性は回復しない。しかし、SR-1 G192V と SR-1 G192I 変異体は SR-1 WT と比較し、高い活性を示していた。

図 2-14 及び表 2-2 に SR-1 G192I の ATP 存在下又は非存在下における GroES との相互作用解析の結果を示した。図 2-14 において、ATP 非存在下よりも ATP 存在下では濃

度が上がるにつれてより GroES とより相互作用しているようにみえる。しかし、このグラフより相互作用における各カイネティックパラメーターを算出したところ ATP の存在下, 非存在下に関わらず数値に大きな違いはみられなかった。つまり, ATP の有無に関わらず GroES との相互作用は変化しないのを確認した。表 2-2 に以前 SPR(表面プラズモン共鳴)において測定した ATP 存在下の GroEL WT 又は ATP 存在下, 非存在下における GroEL G192W 変異体と GroES とのカイネティックパラメーターを示した。この GroEL の数値と SR-1 G192I 変異体との数値を比較すると, SR-1 G192I 変異体は GroEL よりも結合速度 k_{on} の数値が小さいことから GroES との結合が遅い。さらに, SR-1 G192I 変異体の解離速度 k_{off} は GroEL WT よりも小さいことから GroES との解離は遅い。しかし, GroEL G192W 変異体よりは大きいことから, GroES との解離が早いことが確認できた。この結果より, SR-1 G192X 変異体は GroEL G192X よりも GroES が結合し難く, 解離し易い性質をもっていることが考えられる。これが前述のシャペロニン機能解析の結果に反映されていると考えられる。

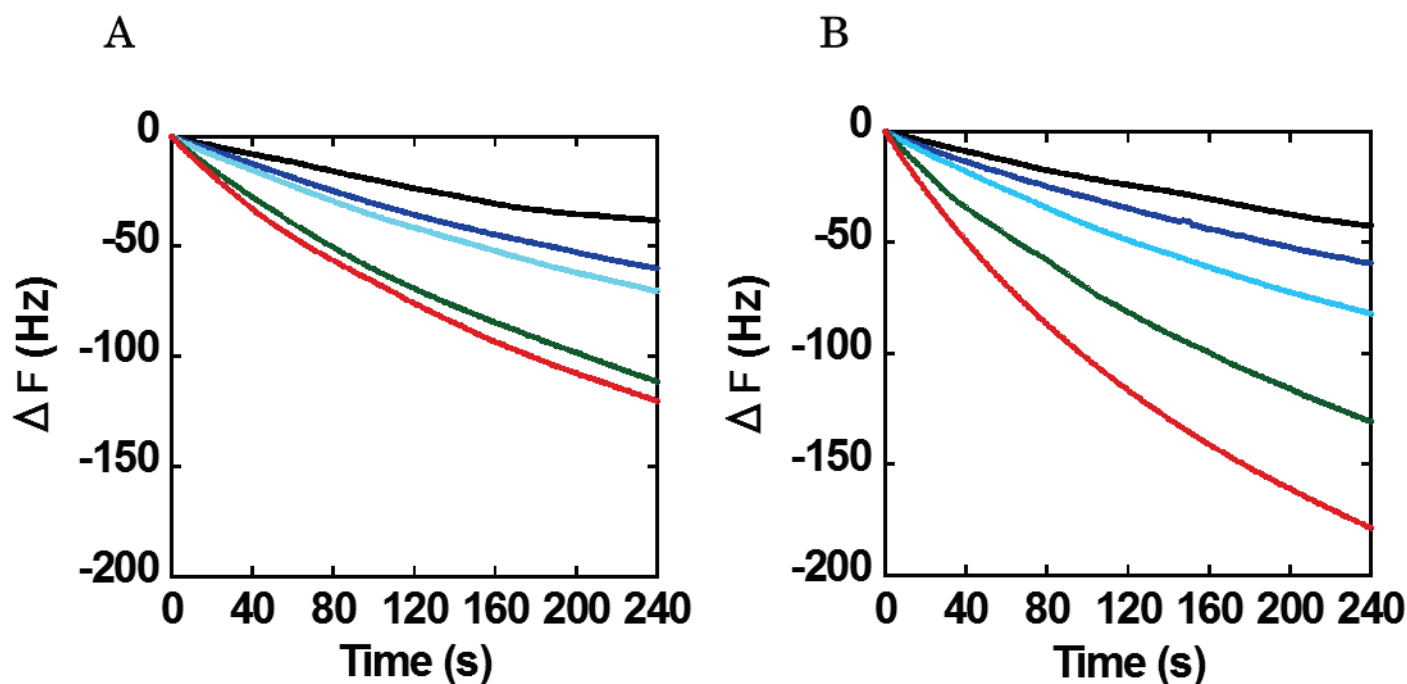


図 2-14. QCM による SR-1 G192I の ATP 存在下又は非存在下での GroES との相互作用

A. ATP 非存在下における SR-1 G192I と GroES との相互作用解析

B. ATP 存在下における SR-1 G192I と GroES との相互作用解析

A, B において, 5 nM(●), 10 nM(●), 15 nM(●), 20 nM(●), 25 nM(●)を示している。

Sample	k_{on} ($M^{-1} \cdot S^{-1}$)	k_{off} (S^{-1})	Kd (M)
SR-1 G192I (−ATP)	1.39×10^4	1.71×10^{-3}	1.22×10^{-7}
SR-1 G192I (+ATP)	1.37×10^4	1.65×10^{-3}	1.20×10^{-7}
*GroEL WT (+ATP)	1.76×10^6	1.03×10^{-2}	6.08×10^{-9}
*GroEL G192W(−ATP)	3.88×10^6	2.96×10^{-4}	7.63×10^{-11}
*GroEL G192W(+ATP)	6.82×10^6	5.08×10^{-5}	7.30×10^{-12}

表 2-2. 図 2-14 より算出した GroES と SR-1 G192I のカイネティックパラメーター

Kd (M): 解離定数, k_{on} ($M^{-1} \cdot S^{-1}$): 結合速度, k_{off} (S^{-1}): 解離速度

*Biacore2000 を使用した SPR スペクトル測定結果(19)。

2-4. 考察

本章では、野生型 GroEL と 192 番目の Gly 残基をファンデルワールス体積に注目して様々なアミノ酸残基に置換した変異体 GroEL G192X 変異体を用いて、GroEL WT と比較した構造変化に関する評価を行った(図 2-4, 表 2-1)。Gly192 残基を様々なアミノ酸残基に置換したことによる二次構造の変化は観測されなかった(図 2-5)。しかし、ANS の蛍光スペクトル解析では、GroEL WT よりも G192X 変異体はアミノ酸残基が大きくなるほどより ANS 蛍光が高くなっているようにみられた(図 2-6)。GroEL の基質結合部位を含むアピカルドメイン断片(191-345 残基)への ANS 結合に関する研究結果が報告されている(90)。これより、GroEL G192X 変異体は Open 状態になったアピカルドメインへの ANS の結合が蛍光測定の結果に反映されていると考えられる。図 2-7 のゲルろ過クロマトグラフィーによる分離分析の結果においても、GroEL WT と GroEL G192X 変異体で溶出位置が異なっていたことから、GroEL G192X 変異体における四次構造に何らかの変化が生じていることが考えられた。つまり、Gly192 を他のアミノ酸残基に置換したことで二次構造自体は変化してないが、全体的な四次構造がわずかに変化し、溶液中における疎水性領域にも影響を及ぼしていると考えられる。また、ATP 加水分解活性(図 2-8)、MDH と Rhodanese を基質としたリフォールディング介助能力におけるシャペロン機能は GroEL WT と比べ著しく低下していた(図 2-9)。特にリフォールディング活性測定において、Gly に大きさが最も近い Ala に置換した変異体でさえも活性は GroEL WT の半分程度しか活性の回復が見られなかった。MDH は二量体であるので、キャビティ内へいったん落とし込まれ、その後 GroES の解離により外に放出されなければ活性が回復しない(91)。Rhodanese もキャビティ内部に落とし込まれることにより活性が回復する(92)。以前の研究において Gly192 を最も大きいアミノ酸残基 Trp に置換した GroEL G192W 変異体は変性基質のリフォールディング能力が大きく低下しているのを報告している。その理由として、*cis*-ring 側はアピカルドメインが予め Open 構造になっているので、ATP の非存在下で GroES が基質よりも早く結合するので、基質はキャビティ内部に入れない

い。それに加え, *trans*-ring 側では ATP の存在下で GroES の結合が起こるが, 一度結合するとそれ以降解離せず, 先に基質が結合していても基質と入れ代わるようにして GroES が結合する。GroEL G192X 変異体は *cis*, *trans* どちらのリングにおいても GroES は結合できるが, キャビティ内部に基質が落とし込まれない。しかし, Gly192 残基を置換したアミノ酸により基質のリフォールディング活性に違いがみられた。69kDa の大腸菌由来のマルトデキストリングルコシダーゼ(MalZ)は, GroEL のキャビティ内部に包括化されず, *cis*-ring 側に GroES が, *trans*-ring 側に MalZ が結合した状態でのリフォールディングモデルが報告されている(93)。GroEL G192X 変異体の *cis*-ring には ATP 非存在下で GroES が結合するので MalZ のように *trans*-ring において GroES が蓋をしない状態でのリフォールディング機構も考えられる。GroEL G192X 変異体のシャペロニン機能の発現には GroES との相互作用が大きく関与していることが考えられたので QCM 法を利用した解析を行った。

GroEL G192X 変異体は, ATP の非存在下でも GroES が結合しているのが見られた(図 2-11)。さらにこの結合量は置換したアミノ酸残基が大きいほどより結合しているのが明らかとなった。つまり, G192X 変異体は予め Open 状態になっている *cis*-ring 側において ATP の非存在下で GroES と相互作用することができ, Gly192 をより大きいアミノ酸残基に置換した変異体ほど GroES と相互作用し易いことが確認された。図 2-12 において GroEL WT 及び GroEL G192N 変異体の ATP 存在下, 非存在下における GroES との相互作用解析結果を示した。この結果において, GroEL WT は ATP 非存在下よりも存在下の方が GroES と結合していた。これは, GroEL WT に ATP が結合すると Closed 状態から Open 状態になり GroES が結合できるようになる性質が反映されていると考えられる。GroEL G192N 変異体も類似した結果を示したことから, G192X 変異体の *trans*-ring におけるアピカルドメインは ATP 非存在下では Closed 状態であるが, ATP が結合することで Open 状態となり GroES が結合したと推測される。その後, GroEL WT は ATP が加水分解され ADP になると GroES が外れる。しかし, G192X 変異体は再度 Closed 状態に戻る際に構造変化の支点となる

Hinge II 部位における Gly192 残基のアミノ酸残基が変化したことにより何らかの立体障害が生じることで Closed 状態に戻れず, GroES も解離しなくなると考えられる。GroEL への変異を導入することで, 本質的な構造が変化すると, シャペロニン機能が大きく変わることにつながるが考えられる。また, ATP の加水分解により *cis*-ring の構造は変化しないが, リング間の接触により *trans*-ring でのドメインの動作が生じることがクライオ電子顕微鏡により解析されており, その後 *trans*-ring の動きにより全体のリングが展開し, ATP と基質タンパク質が結合できるようになると示されている(16)。

Open 状態である *cis*-ring 単独での GroEL G192X 変異体のシャペロニン機能をより詳細に解析することを目的とし, GroEL のシングルリング変異体 SR-1 (89)における Gly192 残基を他のアミノ酸残基に置換した変異体を用いた測定を行った(図 2-13)。SR-1 G192X 変異体の ATP 加水分解能力は GroEL WT の半分程度しかない SR-1 WT よりもさらに低かった。しかし, GroES の添加でより活性が低下していたことから, GroES との親和性があることが示された。Rhodanese のリフォールディング活性は SR-1 WT よりも低いが Spontaneous よりも高いことからキャビティ内部へ基質を取り込んでいることが考えられる。また, シングルリング変異体は通常シャペロニンサイクルが一度しか回らない「シングルターンオーバー状態」であることから, キャビティ内部に落とし込まれた変性 MDH は外に放出されなくなるので SR-1 変異体は MDH のリフォールディング介助を行わないとされている(94)。しかし, SR-1 G192X 変異体の活性はダブルリングの G192X 変異体の場合とは異なり高い活性を示していた。これより, SR-1 G192X 変異体は ATP の存在下においてシングルターンオーバーでサイクルが停止せず, GroES が外れることで MDH が外側に放出されていることも考えられる。そこで, ATP 存在下又は非存在下における GroES との相互作用の解析を行った。図 2-12 において ATP 存在下又は非存在下における SR-1 G192I と GroES の相互作用解析結果を示した。このグラフより各カイネティックパラメーターの算出を行った(表 2-2)。このパラメーターにおいて, SR-1 G192I 変異体は ATP の有無に関わらず GroES との相互作用に変化はみられなかった。

GroEL G192W 変異体の SPR の結果と比較して SR-1 G192 I 変異体は解離定数 K_d が著しく小さいことから GroES が解離しやすいことが確認できる。SR-1 における様々な部位での点変異はその分子量に違いが生じる。これらの変異体は ATP の存在下での GroES の結合が大きく減少しているが、mtMDH のリフォールディング介助能力を保持しているものも報告されている(95,96)。このように、SR-1 G192X 変異体は、SR-1 WT と比較し、Gly192 残基を変化させたことで GroES との相互作用が低下し、その結果 MDH のリフォールディングを行うことが可能になったと考えられる。さらに、SR-1 における Gly192 を置換したアミノ酸残基により MDH のリフォールディング活性に違いがみられたことから、SR-1 G192X 変異体は GroES との相互作用の強さは Gly192 を置換するアミノ酸残基により変化すると考えられる。この性質はダブルリングの GroEL における *cis*-ring 側に類似した性質が反映されている。この SR-1 G192X 変異体を用いた解析により、ATP 非存在下における GroEL G192X 変異体の *cis*-ring において、置換したアミノ酸残基によっては完全な Open 状態をとっていないために GroES との相互作用が弱いと考えられる。また、7 つの GroEL サブユニットに対して GroES のサブユニットが全て結合しておらず、GroEL-GroES の接触面において隙間が生じ、そこから基質が外に放出されることも考えられる。

以上のことより、Gly192 を置換するアミノ酸残基をより選択的にすることでアピカルドメインの Open な状態が制御され、それに伴う GroES との相互作用や変性基質のリフォールディング介助等のシャペロニンとしての機能を調節することが可能であることが示唆された。

第 3 章 GroEL Gly192 変異体によるアミロイド線維凝集の抑制効果

3-1. 緒言

第 2 章では GroEL における Hinge II 部位に存在する 192 番目の Gly 残基を様々なアミノ酸残基に置換することでアピカルドメインに及ぼす影響について示した。生体内に存在している small HSP(97-100), 分子シャペロンファミリー HSP40, HSP70, HSP104 (101-103) 等による天然変性タンパク質の凝集抑制効果は多数報告されている。その一方で, HSP60 についての抑制効果の報告は少ない。GroEL は第 2 章において示したように, 大腸菌内において MDH や Rhodanese 等の基質タンパク質のリフォールディングを介助することが一般的に示されている。この機構において, 変性基質は GroEL の内部に存在するセントラルキャビティと呼ばれる空洞に取り込まれることで自発的な折り畳みの進行, 凝集が生じたタンパク質から隔離することで凝集に巻き込まないようにする。この際重要な役割を担うのが, 基質タンパク質を認識し, 結合した後キャビティ内部に取り込むように GroEL の先端に位置しているアピカルドメインである。第 2 章の結果から Gly192 残基を置換したアミノ酸の大きさに比例してアピカルドメインの動作が抑制されていることを示した。GroEL が天然変性タンパク質などのアミロイド線維を生じさせるタンパク質の凝集を抑制しないのはアピカルドメインの役割が重要となることが考えられる。近年の研究において, NMR (Nuclear Magnetic Resonance)を用いて, GroEL と相互作用した α -Synuclein 又はアミロイド β (A β) の作用機構とその構造の解析がなされている(104,105)。この結果では, GroEL においても神経変性疾患の原因タンパク質と相互作用が可能であることは考えられる。

そこで本章では, 天然変性タンパク質に対してアピカルドメインの動作がより抑制されている GroEL G192X 変異体の相互作用について調べた。さらに, α -Synuclein のアミロイド線維形

成機構における GroEL G192X 変異体添加の効果について GroEL WT と対比し, GroEL G192X 変異体のアミロイド線維形成への影響について議論する。

3-2. 材料と方法

3-2-1. α -Synuclein の培養

E. coli BLR(DE3)に α -Synuclein WT 又は His₆-Tag 融合 α -Synuclein (α -Synuclein-His₆)発現系プラスミド pETSNCA α -Synuclein WT(α -Synuclein WT), pETSNCA α -Synuclein-His₆ (α -Synuclein-His₆) を入れ, 30 分間氷中におき, 恒温槽で 42℃, 45 秒ヒートショックし, 氷中で 2 分間インキュベートした。そして, 全量 1 ml になるように SOC 培地を入れ, 37℃(TAITEC, Personal-11 Water Bath Shaker) にて振盪培養を 1-2 時間行い, LB 寒天培地にまき, 37℃(EYELA, Soft incubator SLI-450N)で一晩静置培養した。その後, 試験管に LB 培地を入れてコロニーを植菌し, 37℃, 170 rpm で OD₆₀₀ =0.6 付近まで振盪し, プレ培養を行った。300 ml 培地の入った 1L のバッフル付き三角フラスコに, 終濃度 50 μ g/ml のアンピシリンを入れ, プレ培養した培養液を 300 μ l 添加し, 37℃で一晩振盪培養した。培養終了後, 8000 rpm, 20 分, 4℃で遠心分離により集菌した。

[LB 培地 (pH7.4)]	[SOC 培地 (pH7.0)]
Polypepton 1.0%	2.0 % (w/v) Bacto Tryptone
Yeast Extract 0.5%	0.5 % (w/v) Bacto Yeast Extract
NaCl 1.0%	10 mM NaCl
	2.5 mM KCl
	10 mM MgCl ₂
	10 mM MgSO ₄
	20 mM Glucose

3-2-2. α -Synuclein の精製

1. 菌体破碎

集菌した *E. coli* BLR(DE3)/pETSNCA α -Synuclein WT 又は pETSNCA α -Synuclein-His₆ に対して 10 倍量(w/v)の Lysis Buffer に懸濁し、これに 1/100 量のリゾチームを加え室温で 1 時間攪拌した。氷中で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 分, 4 °C) により沈殿物を除去し、上清画分を回収した。

2. 除核酸

菌体破碎後の上清画分に氷中で同体積の 5 %ストレプトマイシン溶液をゆっくりと滴下した後、室温で 1 時間攪拌して除核酸を行った。攪拌後、遠心分離 (14,500 rpm, 30 分, 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. 熱処理

除核酸後の上清画分を沸騰浴中で 75-80°C, 20 分間熱処理を行った後、氷中で 30°C 以下まで急冷し、15 分間氷中で攪拌した。攪拌後、遠心分離(14500 rpm, 30 分, 4 °C) により上清を回収した。

4. 硫酸アンモニア分画

回収した上清に氷中で攪拌しながら硫酸アンモニウムを終濃度 70 %になるまでゆっくりと添加し、添加後さらに 1 時間攪拌した。攪拌後、遠心分離 (14,500 rpm, 30 分, 4 °C) により沈殿画分を得た。この沈殿画分を適当量のゲルろ過 Buffer に溶解し、透析用 Buffer で 2 時間、4°Cで透析を行った後に Buffer を交換し、さらに一晚透析を行った。

5. 陰イオン交換クロマトグラフィー

透析後、遠心分離（14,500 rpm, 10 分, 4 °C）により沈殿した変性タンパク質を除去し、上清画分を回収した。そのサンプルをフィルター濾過した後、AKTA-FPLC system に設置した陰イオン交換クロマトグラフィー（Resource-Q (volume 6 mL)）にアプライした。0.1-1 M NaCl のグラジエントで溶出した。ピーク画分を SDS-PAGE で確認し、 α -Synuclein が溶出した画分を回収した。

6. 透析, 凍結乾燥

回収した画分は、3 mM の重炭酸アンモニウム Buffer で一晩、4°Cで透析を行い、その後 Buffer を 1 mM の重炭酸アンモニウムに交換し、さらに 2 時間、4°Cで透析を行った。透析後、EYELA 凍結乾燥器 FD-50 を用いて凍結乾燥した。凍結乾燥後のサンプルは 4°Cで保存した。

—使用 Buffer—

[Lysis Buffer]	[ゲルろ過クロマトグラフィー用 Buffer]
50 mM Tris-HCl (pH7.8 at 25 °C)	50 mM Tris-HCl (pH7.8 at 25 °C)
2 mM EDTA	2 mM EDTA
2 mM DTT	2 mM DTT
[陰イオン交換クロマトグラフィー用 Buffer]	[透析用 Buffer]
50 mM Tris-HCl (pH7.8 at 25 °C)	50 mM Tris-HCl (pH7.8 at 25 °C)
2 mM EDTA	2 mM EDTA
2 mM DTT	2 mM EDTA
1 M NaCl	2 mM DTT

図 3-1 に α -Synuclein の精製の流れを記す。

精製の流れ(α -Synuclein)

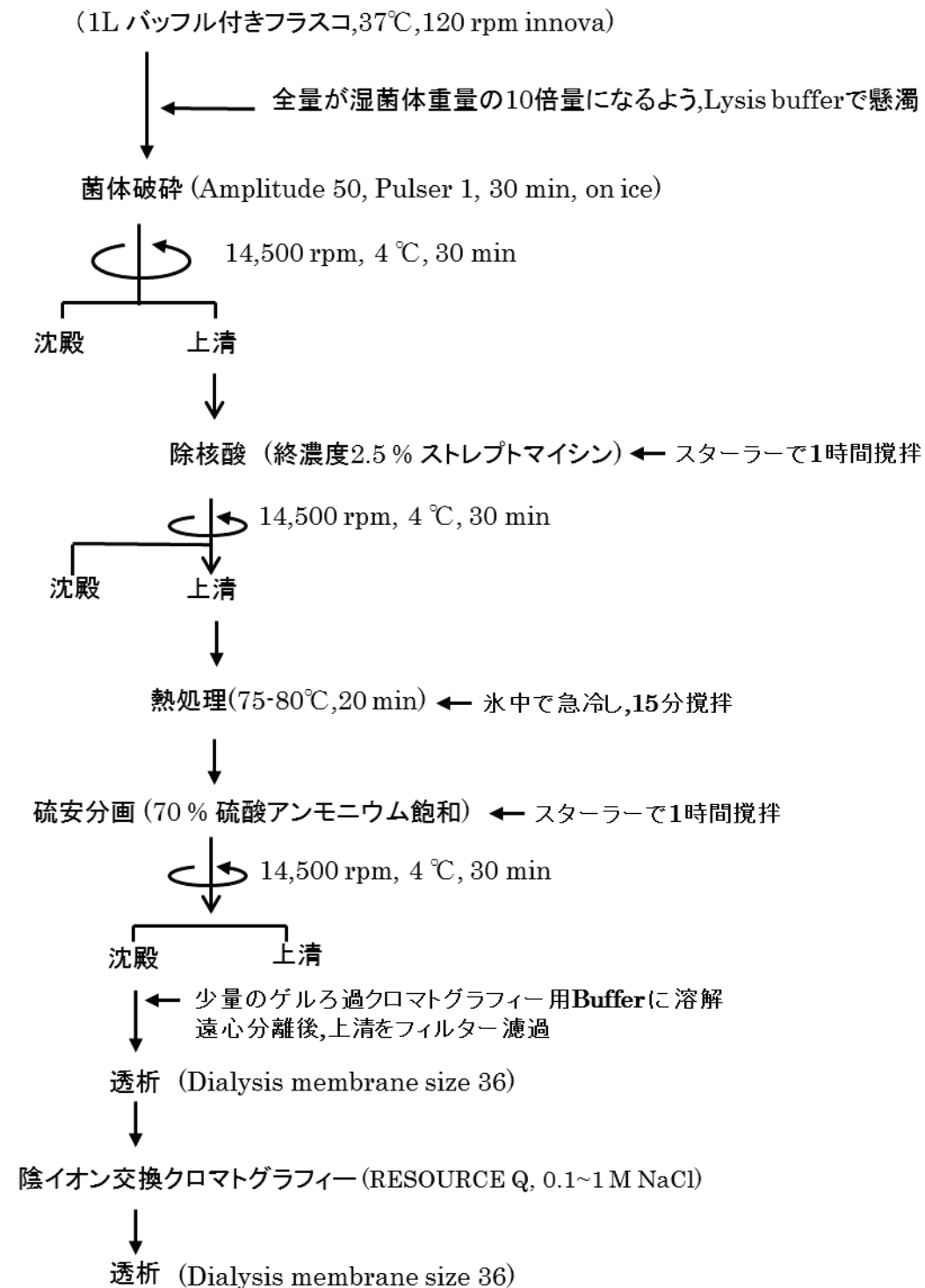


図 3-1. α -Synuclein の精製過程

3-2-3. GroES の培養と精製

<培養>

GroES 発現プラスミド pETES を LB 培地を用い、大量培養を行った。全ての培養は 37℃で行った。培地組成並びに手順を以下に示した。

[LB 培地 (pH7.4)]

Polypepton 1.0%

Yeast Extract 0.5%

NaCl 1.0%

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/Amp 培地(試験管)に植菌し、 $OD_{600} \doteq 0.6$ になるまで振盪培養した。次に 300 ml の LB/Amp 培地に培養溶液 300 μ l を植菌し、振盪培養し、 $OD_{600} \doteq 0.4$ になった時に 1 mM IPTG を添加した後、再び 5 時間振盪培養した。培養終了後、8000 rpm, 20 分, 4 °Cで遠心分離により集菌した。

<精製>

GroES 精製を行うために、室温において AKTA-FPLC system(GE Healthcare)を用いて Resource-Q(GE Healthcare)による陰イオン交換クロマトグラフィーを行った。

精製に用いた Buffer と手順を以下に示した。

—使用 Buffer—

[Lysis Buffer]	[陰イオン交換クロマトグラフィー Buffer]
50 mM Tris-HCl (pH7.8 at 25 °C)	50 mM Tris-HCl (pH7.8 at 25 °C)
2 mM EDTA	2 mM EDTA
2 mM DTT	2 mM DTT
[塩有り陰イオン交換クロマトグラフィー用 Buffer]	[透析用 Buffer]
50 mM Tris-HCl (pH7.8 at 25 °C)	50 mM Tris-HCl (pH7.8 at 25 °C)
2 mM EDTA	2 mM EDTA
2 mM DTT	2 mM DTT
1 M NaCl	

1. 菌体破碎

集菌した菌体を 10 倍量(w/v)の Lysis Buffer に懸濁し、これに 1/100 量のリゾチームを加え室温で 1 時間攪拌した。次に氷中で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 分, 4 °C)により沈殿物を除去し、上清画分を回収した。

2. 除核酸

菌体破碎後の上清画分に氷中で同体積の 5 %ストレプトマイシン溶液をゆっくりと滴下し、滴下後室温で 1 時間攪拌して除核酸を行った。攪拌後、遠心分離(14,500 rpm, 30 分, 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. 熱処理

除核酸後の上清画分を、70-75℃で熱処理を 20 分間行った。熱処理後、氷中で急冷し、15 分間静置した。その後、遠心分離 (14,500 rpm, 30 分, 4 °C) により沈殿した核酸を除去し、上清画分を回収した。

4. 硫酸アンモニウム分画

熱処理後の上清に、氷中で攪拌しながら硫酸アンモニウムを終濃度 55 %になるまでゆつくりと添加し、1 時間攪拌した。攪拌後、遠心分離(14500 rpm, 30 分, 4 °C)により沈殿画分を得た。沈殿は、適当量のゲルろ過 Buffer に溶解し、透析 Buffer により 4 °Cで一晩透析を行った。さらに、透析 Buffer を交換し、4 °Cで 2 時間透析を行った。

5. 陰イオン交換クロマトグラフィー

透析後、遠心分離 (14,500 rpm, 10 分, 4 °C) により沈殿した変性タンパク質を除去し、上清画分を回収した。そのサンプルをフィルター濾過した後、AKTA-FPLC system に設置した陰イオン交換クロマトグラフィー(Resource-Q (volume 6 mL)) にアプライした。0.1-1 M NaCl のグラジエントで溶出した。ピーク画分を SDS-PAGE で確認し、GroES が溶出した画分を回収した。

6. 透析, 凍結乾燥

3 mM の重炭酸アンモニウムで一晩透析を行った後、1 mM の重炭酸アンモニウムで 2 時間透析を行った。透析後、EYELA 凍結乾燥器 FD-50 を用いて凍結乾燥した。凍結乾燥後のサンプルは 4 °Cで保存した。

図 3-2 に GroES の精製の流れを記す。

精製の流れ (GroES)

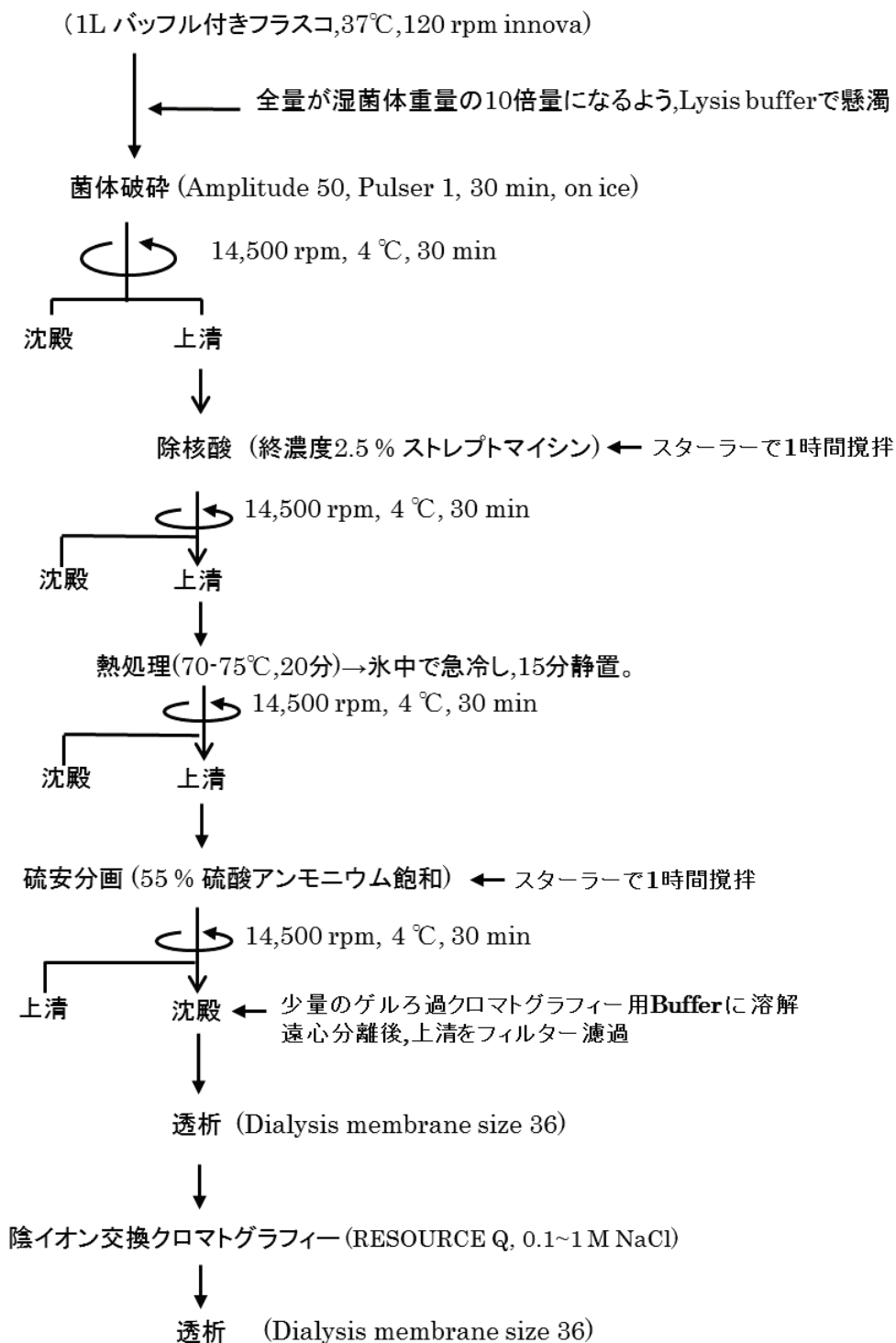


図 3-2. GroES の精製段階

3-2-4. 測定に用いたサンプルの調整

野生型 α -Synuclein 及び His₆-Tag 融合 α -Synuclein は凍結乾燥標品を 25 mM Tris-HCl pH 7.4 at 25 °C で溶解し, 280 nm におけるモル吸光係数 0.354 による α -Synuclein のタンパク質濃度を定量した。GroEL G192X 変異体と GroES は第 2 章の 2-2-6 と同様の方法にて濃度滴定を行った。A β 1-40 ペプチド(ペプチド研究所, 大阪)は 5 μ M となるようにアンモニア水で溶解したものを用いた。

3-2-5. QCM による天然変性タンパク質と GroEL の相互作用解析

第 2 章の 2-2-15 と同様に A β 1-40 は QCM センサーセル上に固定化した。GroEL と α -Synuclein の相互作用解析には, His₆-Tag が C 末端に融合している α -Synuclein を用いて Ni-NTA 法によるセンサーセルへの固定化方法を利用した。

各 Buffer 組成は以下に示す通りである。

[測定 Buffer 組成]

Non-permissive Buffer

30 mM Tris-HCl (pH7.2 at 25°C)

50 mM KCl

10 mM Mg(CH₃COO)₂

[Ni 溶液組成]

10 mM NiSO₄

20 mM HEPES pH7.5

150 mM NaCl

50 mM EDTA

[Imidazole 溶液組成]

0.4 M Imidazole

20 mM HEPES pH7.5

150 mM NaCl

<センサーの洗浄>

2-2-15 と同様の操作により行った。

<固定化>

1. 0.5 mM C₂-NTA (3,3'-Dithiobis[N-(5-amino-5-carboxypentyl)propionamide-N'-N'-diacetic acid]dihydrochloride (Dojindo) 100 μ l をセンサーセルに添加し、室温で 10 分間静置。
2. MQ で洗浄後、水分を除去。
3. Ni 溶液 500 μ l をセンサー電極部に添加し、室温で 10 分間静置。

<測定>

1. MQ で洗浄後、センサー電極を QCM 装置(AffinixQN μ , Initium)に設置し、1 μ M α -Synuclein-His₆ をセンサー電極に添加し、10 分間振動数を測定した。
2. 測定 Buffer でセンサー電極を洗浄した後、センサーの平衡化を行った。
3. GroEL をセンサー電極に添加し、振動数の変化を 10 分間測定した。
4. 測定終了後、MQ でセンサー電極を洗浄し、Imidazole 溶液を 500 μ l 添加し、室温で 30 分間静置した。
5. MQ で洗浄後、Ni 溶液 500 μ l をセンサー電極に添加し、室温で 10 分間静置した後再度測定に用いた。

3-2-6. QCM におけるカイネティックパラメーターの算出方法

カイネティックパラメーターは、2-2-16 で示した方法により算出した。センサーセルに固定化した α -Synuclein に対して、GroEL WT, GroEL G192N, GroEL G192I, GroEL G192W をそれぞれ 2.5 nM, 5 nM, 10 nM, 15 nM, 20 nM 添加し、測定した振動数よりカイネティックパラメーターの算出を行った。

3-2-7. アミロイド線維形成

α -Synuclein WT を 1 mg/ml, GroES を 1 mg/ml, A β 1-40 ペプチドを 10 μ M となるように 500 μ l をエッペンドルフチューブに調製し, 調製したサンプルを 96 穴プレート(8 \times 12 well plate; Greiner, Kremsmuenster, Austria)の 1 well につき 150 μ L ずつ, 1 つのサンプルにつき 3 well ずつ分注した。well ごとのサンプルの誤差を減らすために 1 well につき 3/32 インチのアフロンビーズ(伊藤製作所)を 1 つ入れた。その後すぐにプレートリーダー (ARVO X4, Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts)内にセットし, 以下に示した条件において 37°Cで自動振盪, 15 分ごとに自動測定させた。反応条件と測定条件は下記に表記する。

[反応条件]	[α -Synuclein の線維形成条件]
Excitation: 440 nm	1 mg/ml α -Synuclein
Emission: 486 nm	25 mM Tris-HCl buffer pH7.5
Measurement height: Default	150 mM NaCl
Measurement time: 0.1 sec	20 μ M Thioflavin-T
Emission aperture: Normal	
Excitation aperture: N/A	[A β 1-40 ペプチドの線維形成条件]
Shaking duration: 820.0 sec	10 μ M A β 1-40
Shaking speed: Fast	50 mM phosphate buffer pH7.4
Shaking type: Orbital	150 mM NaCl
Shaking diameter: 5.00 mm	20 μ M Thioflavin-T

[GroES の線維形成条件]

1 mg/ml GroES

50 mM phosphate buffer pH7.4

0.4 M guanidine hydrochloride (Gdn-HCl)

20 μ M Thioflavin-T

3-2-8. GroEL 存在下におけるアミロイド線維形成

α -Synuclein WT 1mg/ml(69 μ M, 分子量 14,500, 単量体)の線維形成反応において GroEL WT, GroEL G192N, GroEL G192I, GroEL G192W をそれぞれモル比が 0.05::1(3.45 μ M:69 μ M), 0.1:1(6.9 μ M:69 μ M), 0.2:1(13.8 μ M:69 μ M)となるように添加した。同様に GroES 1mg/ml(70 μ M, 分子量 70,000, 7 量体)と A β 1-40 10 μ M に対し GroEL WT 又は GroEL G192W 変異体のモル比が 1:1 となるように添加した。GroEL は, 単量体(分子量 57,259)における値で算出した。測定結果は, 3 回平均を示し, そこから標準誤差を算出した。

3-2-9. 異なる時間において GroEL を添加した α -Synuclein の線維形成

α -Synuclein WT 1mg/ml(69 μ M, 分子量 14,500, 単量体)の線維形成反応において GroEL WT, GroEL G192N, GroEL G192I, GroEL G192W をそれぞれモル比が 0.2:1 となるように 0 時間, 3 時間, 8 時間, 24 時間で添加し, その後 30 時間まで測定を行った。

3-2-10. 原子間力顕微鏡(AFM)測定

AFM(Nanoscope IV scanning microscope, MMAFM-2)による測定は, 大気中において, タッピングモードを用いて行なった。GroEL WT 又は GroEL G192W 変異体の存在下又は非存在下において 40 時間インキュベートした α -Synuclein のアミロイド線維サンプルを 10 倍希釈(0.1 mg/mL に調製)してマイカに 15 μ l のせ, 30 min インキュベート後に 100

μ l の Milli-Q で洗浄し、室温で一晩風乾させたものをサンプルとした。

3-2-11. 透過型電子顕微鏡(TEM)測定

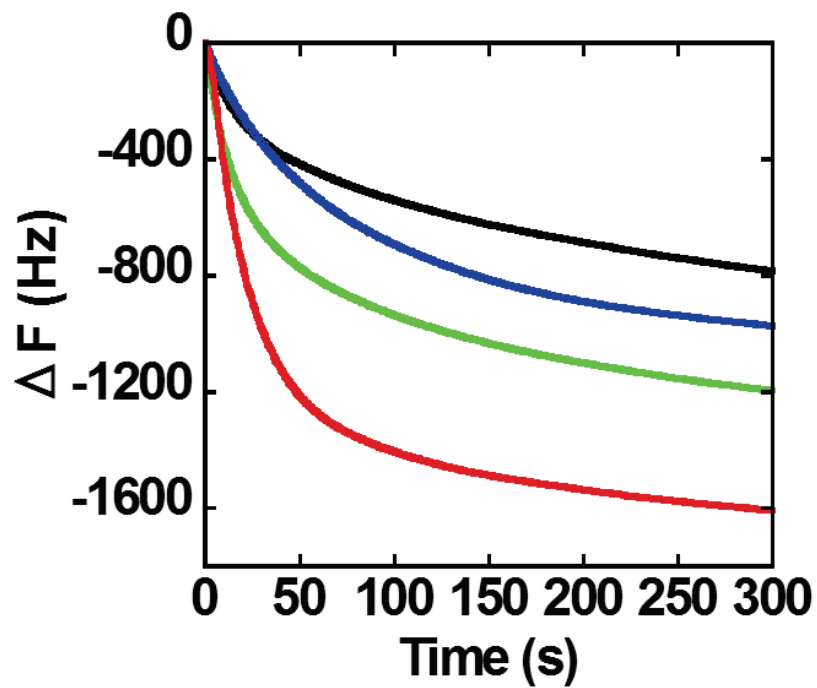
GroEL の存在下において α -Synuclein が形成したアミロイド線維の形態に違いが見られるのかを確認するために TEM 測定を行なった。GroEL を添加した α -Synuclein のアミロイド線維サンプルを 10 倍希釈してコロジオン膜貼付メッシュに 10 μ L のせ、1 min インキュベート後にろ紙で吸い取り、5 μ L の Milli-Q 水で洗浄した。その後 10 倍希釈した EM ステイナー(日新 EM)を 5 μ L のせ、30 sec インキュベートすることで染色を行なった。さらにろ紙で吸い取り、風乾させたものをサンプルとした。TEM (JEM-1400plus, JEOL)は 80 kV で行ない、 $\times 50,000$ の倍率で観測した。アミロイド線維幅は Image J により異なる 3 点からの平均と標準偏差を算出した。

3-3. 結果

3-3-1. GroEL と天然変性タンパク質の相互作用解析

GroEL WT, GroEL G192N, GroEL G192I, GroEL G192W が QCM センサーセル上に固定化した A β 1-40 に対する振動数の変化を図 3-3A に, α -Synuclein に対する振動数の変化を図 3-3B にそれぞれ示した。それぞれの結果において, GroEL WT, GroEL G192N, GroEL G192I, GroEL G192W の順に振動数が減少していたことから, 相互作用が強くなっているのが確認された。さらに, 図 3-4A-D に GroEL WT 又は GroEL G192X 変異体と α -Synuclein の濃度依存的な相互作用解析の結果を示した。表 3-1 に示した図 3-4 における測定値より算出した解離定数 K_d , 結合速度 k_{on} , 解離速度 k_{off} を示した。 K_d は GroEL WT では 3.06×10^{-8} であるが, GroEL G192N は 1.37×10^{-8} , GroEL G192I は 1.03×10^{-8} , GroEL G192W は 8.4×10^{-9} という値が得られた。 K_d は結合定数 K_a の逆数であることから, 数値が小さいほどタンパク質間の相互作用が強いことが判明する。GroEL WT に対して G192N は 2 分の 1, G192I は 3 分の 1, G192W は 4 分の 1 程度まで低下しているのが確認できる。 K_d に伴い k_{on} と k_{off} それぞれの数値が上昇している。これより, Gly192 残基をより大きいアミノ酸残基に置換したことで α -Synuclein との相互作用は強くなっておりその反応は, 結合速度が速く, 解離速度も速いことが考えられた。この相互作用解析における測定結果が α -Synuclein のアミロイド線維形成過程にどのような影響を及ぼすのかを調べるために, GroEL 存在下での α -Synuclein のアミロイド線維形成の解析を行った。

A . A β 1-40



B . α -Synuclein

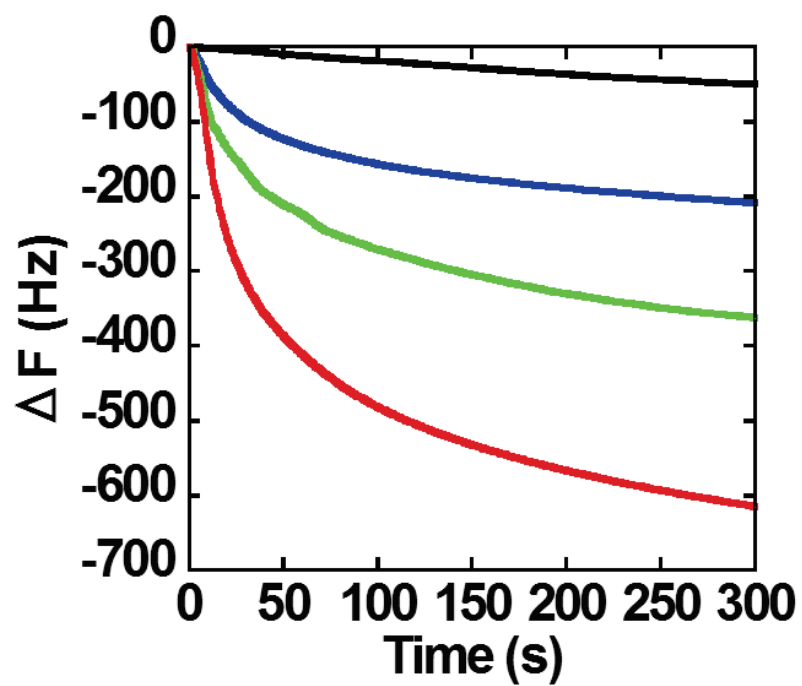


図 3-3. QCM による天然変性タンパク質と GroEL との相互作用解析

(A) A β 1-40 との相互作用解析 (B) α -Synuclein との相互作用解析

GroEL WT (●), GroEL G192N (●), GroEL G192I (●), GroEL G192W (●) を示す。

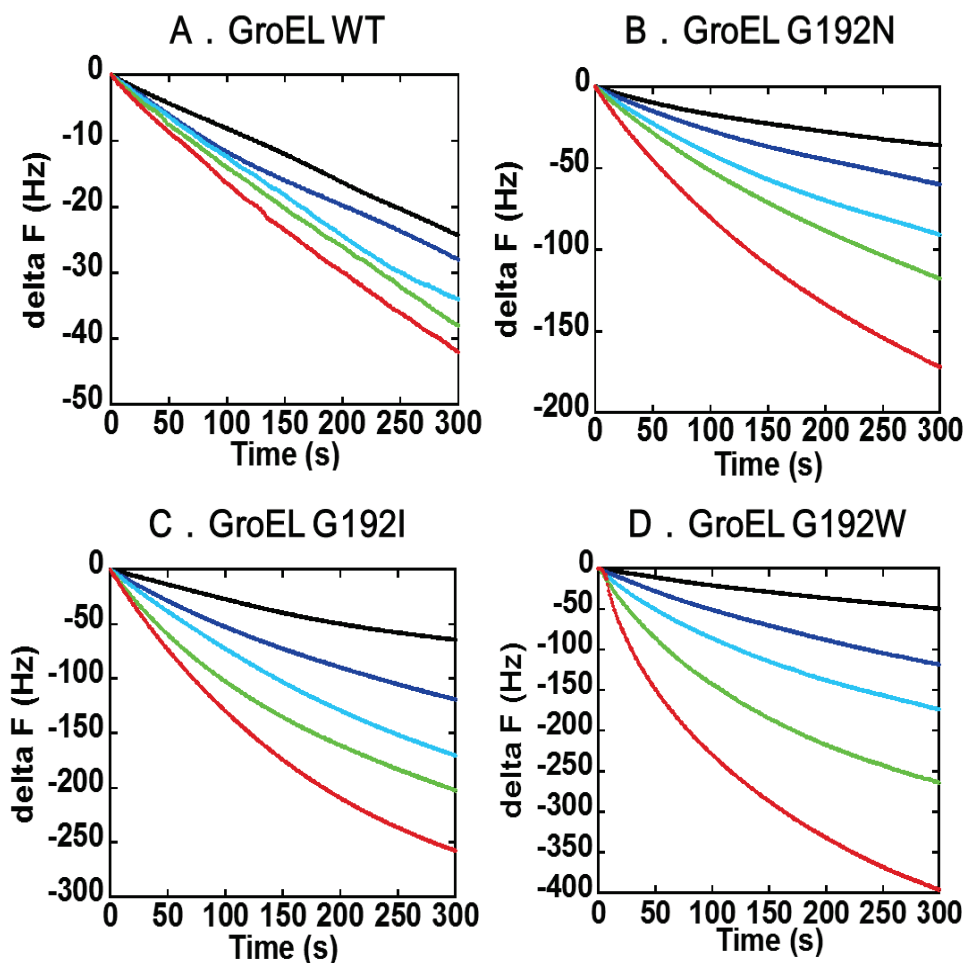


図 3-4. 濃度依存的な GroEL と α -Synuclein との相互作用解析
 (A)GroEL WT (B)GroEL G192N (C)GroEL G192I (D)GroEL G192W
 2.5 nM (●), 5 nM (●), 10 nM (●), 15 nM (●), 20 nM (●)を示している。

Sample	k_{on} ($\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})	K_d (M)
WT	2.6×10^4	7.98×10^{-4}	3.06×10^{-8}
G192N	10.5×10^4	14.4×10^{-4}	1.37×10^{-8}
G192I	15.0×10^4	15.5×10^{-4}	1.03×10^{-8}
G192W	19.6×10^4	16.4×10^{-4}	8.4×10^{-9}

表 3-1. 図 3-4 より算出した α -Synuclein と GroEL のカイネティックパラメーター
 K_d (M): 解離定数, k_{on} ($\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$): 結合速度, k_{off} (s^{-1}): 解離速度

3-3-2. GroEL 存在下における天然変性タンパク質のアミロイド線維形成

GroEL における Gly192 残基を置換したことによりアピカルドメインの動作が抑制された変異体が、 α -Synuclein のアミロイド線維形成にどのように影響するのかを調べるため、Gly192 をファンデルワールス体積が最も小さい Gly(GroEL WT), 最も大きい Trp, その間の Asn, Ile に置換した GroEL WT, GroEL G192N, GroEL G192I, GroEL G192W を用いて Thioflavin-T assay において形成した線維をその後、TEM 観察にて評価した。図 3-5 に Thioflavin-T assay の結果を示した。このとき α -Synuclein に対して GroEL WT を 0.05, 0.1 のモル比で添加すると核形成時間がわずかに遅れている。0.2 のモル比で添加するとより顕著な遅れがみられた。G192N 変異体を 0.05, 0.1 のモル比で添加すると GroEL WT における 0.05, 0.1 のモル比で添加した結果に類似しているようにみられるが、0.2 のモル比で添加した結果は更なる核形成時間の遅れがみられた。G192I 変異体は全ての条件において GroEL WT, G192N 変異体よりも核形成時間の遅れがみられ、さらに、0.1, 0.2 のモル比で添加した条件では、形成したアミロイド線維の量も減少しているようにみられた。

G192W 変異体において、0.05 のモル比で添加した条件でも他の GroEL と比べ大幅な核形成の遅れがみられ、0.1 のモル比で添加した条件では核形成の大幅な遅れに加え、アミロイド線維形成量の減少がみられた。0.2 のモル比で添加した条件では 30 時間ではほとんどの α -Synuclein 分子がアミロイド線維化していないようにみられた。

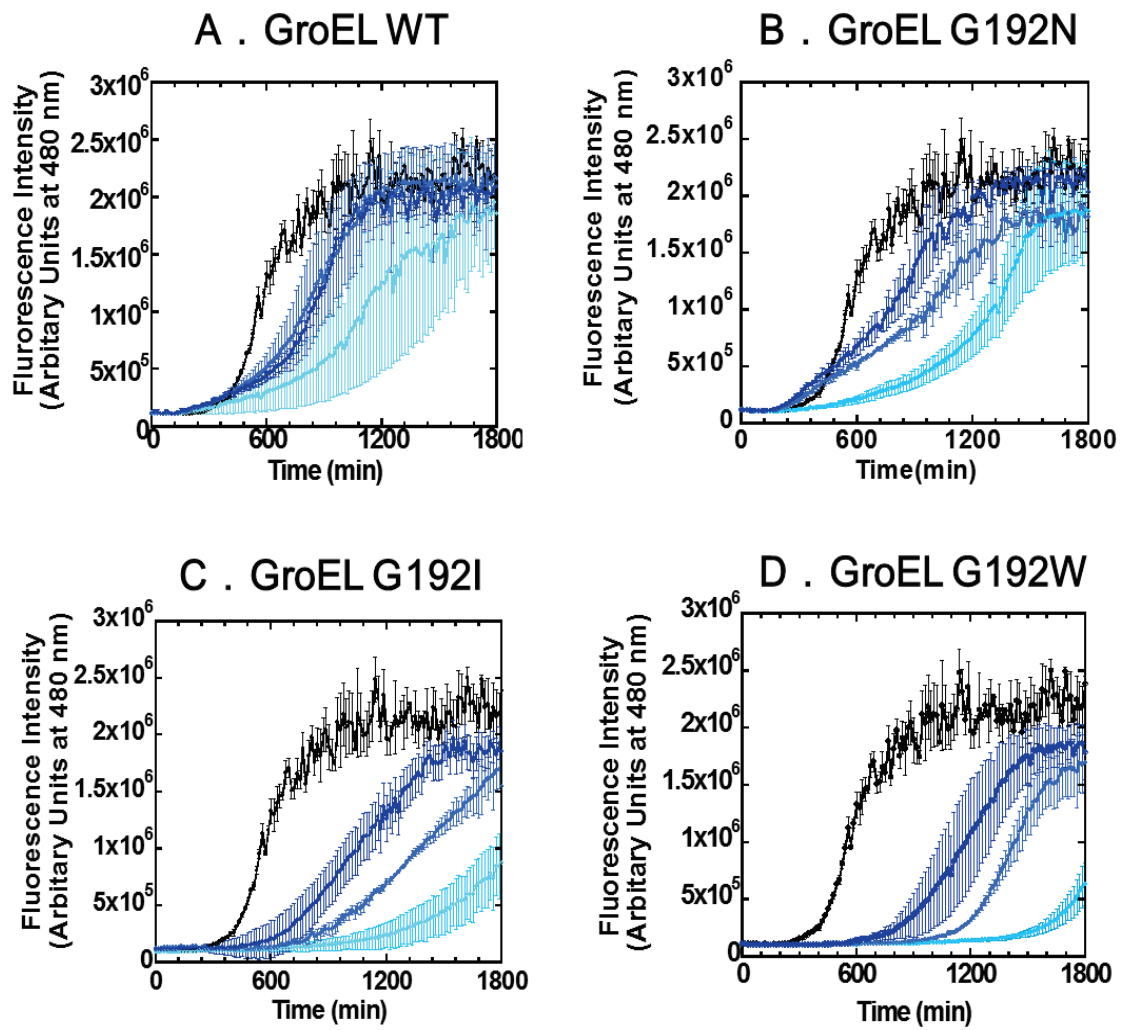


図 3-5. GroEL 存在下における α -Synuclein の線維形成

(A) GroEL WT (B) GroEL G192N (C) GroEL G192I (D) GroEL G192W
 α -Synuclein WT (●), GroEL: α -Synuclein= 0.05:1 (●), 0.1:1 (●), 0.2:1 (●),
 GroEL WT only (●, A), GroEL G192W only (●, D) を示している。

図 3-6 に野生型 GroEL 又は GroEL G192W 存在下において形成した α -Synuclein のアミロイド線維の AFM 画像を示した。さらに、AFM でみられた線維又はオリゴマーの高さを計測した結果を表 3-2 に示した。 α -Synuclein 非存在下における GroEL WT 又は GroEL G192W 変異体は図 3-5 の Thioflavin-T assay の赤線で観測したように、線維は形成しておらず、AFM においても線維状のものは観測されなかった。また、このとき形成されたオリゴマーの高さは 15-16 nm と実際に X 線結晶構造解析などにより示されている GroEL の実際の高さと類似した値を示していた。GroEL G192W 変異体を 0.2 のモル比で添加した条件においては α -Synuclein 非存在下において観測したオリゴマー状のものと類似したものがみられ、高さも類似していた。0.1 のモル比で添加した条件では短く細いプロトフィブリルが観測され、高さも α -Synuclein が形成した線維よりも大幅に低い値を示していた。それに対し、GroEL WT を 0.2 又は 0.1 のモル比で添加した条件ではどちらも長く太いアミロイド線維状のものがみられた。このときの高さも α -Synuclein が形成した線維よりも低い値を示したが、GroEL G192W 存在下において形成した線維よりは高い値であった。

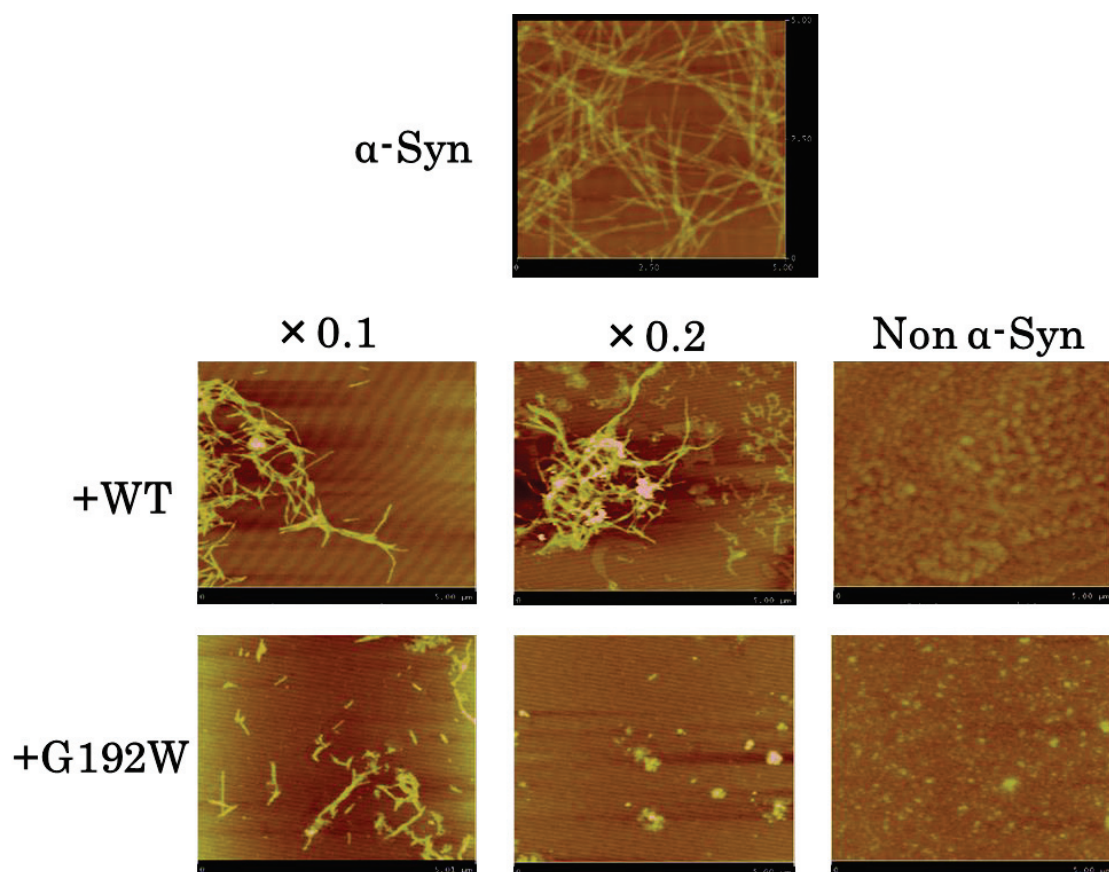


図 3-6. GroEL 存在下における α -Synuclein が形成した線維の AFM 観察

上パネル: α -Synuclein WT が形成したアミロイド線維

中央パネル: GroEL WT 存在下における α -Synuclein が形成したアミロイド線維

下パネル: GroEL G192W 存在下における α -Synuclein が形成したアミロイド線維

図中に表記した数値は α -Synuclein に対する GroEL WT 又は GroEL G192W の存在量を示す。

Sample	高さ*(nm)	Sample	高さ*(nm)
α -Syn WT	16.3 ± 1.3	+EL WT $\times 0.2$	4.8 ± 1.1
GroEL WT	15.4 ± 0.4	+EL WT $\times 0.1$	8.3 ± 0.9
GroEL G192W	15.3 ± 0.2	+G192W $\times 0.2$	10.2 ± 2.9
		+G192W $\times 0.1$	1.73 ± 0.4

表 3-2. AFM で観測したオリゴマー又はアミロイド線維の高さ

*線維の高さは図 3-6 における AFM 画像の 3 ヶ所における平均値 \pm 標準偏差を示している。

より詳細に形成された線維の形態を解析するために TEM による解析を行った。図 3-5 の各条件における 30 時間時点の TEM 観察の結果を図 3-7 に示した。GroEL WT を 0.2 のモル比, GroEL G192N を 0.05 のモル比, GroEL G192I を 0.1 のモル比で添加した条件において青四角で示した部分では AFM において GroEL WT を 0.1 又は 0.2 のモル比で添加した条件でみられたような長い直線状の形態のアミロイド線維が観測された。その一方で GroEL G192N, GroEL G192I, GroEL G192W それぞれを 0.2 のモル比で添加した条件において, 赤四角で示した部分には AFM の GroEL G192W を 0.1 のモル比で添加した条件でみられたような細く短い線維がねじれた形態をとったアミロイド線維が観測された。GroEL の添加と添加量の違いにより形成するアミロイド線維の形態が変化したことが考えられる。TEM の測定結果から算出した線維幅を表 3-3 に示した。GroEL WT は添加する量を増加させても形成された線維の幅は大きな変化が見られなかった。GroEL G192N も類似した結果を示していた。しかし, GroEL G192N は, 0.05 のモル比において GroEL G192N の 0.2 のモル比よりも狭い線維幅であった。さらに, GroEL G192I の添加量を増加させていくことで線維の幅が狭くなっていくのが確認された。GroEL G192W は 0.05 のモル比において GroEL G192I の 0.2 のモル比よりも狭い幅の線維が観測された。0.1 と 0.2 のモル比で GroEL G192W を添加して形成した α -Synuclein のアミロイド線維の線維幅は極めて細く, 線維幅を測定することが出来なかった。

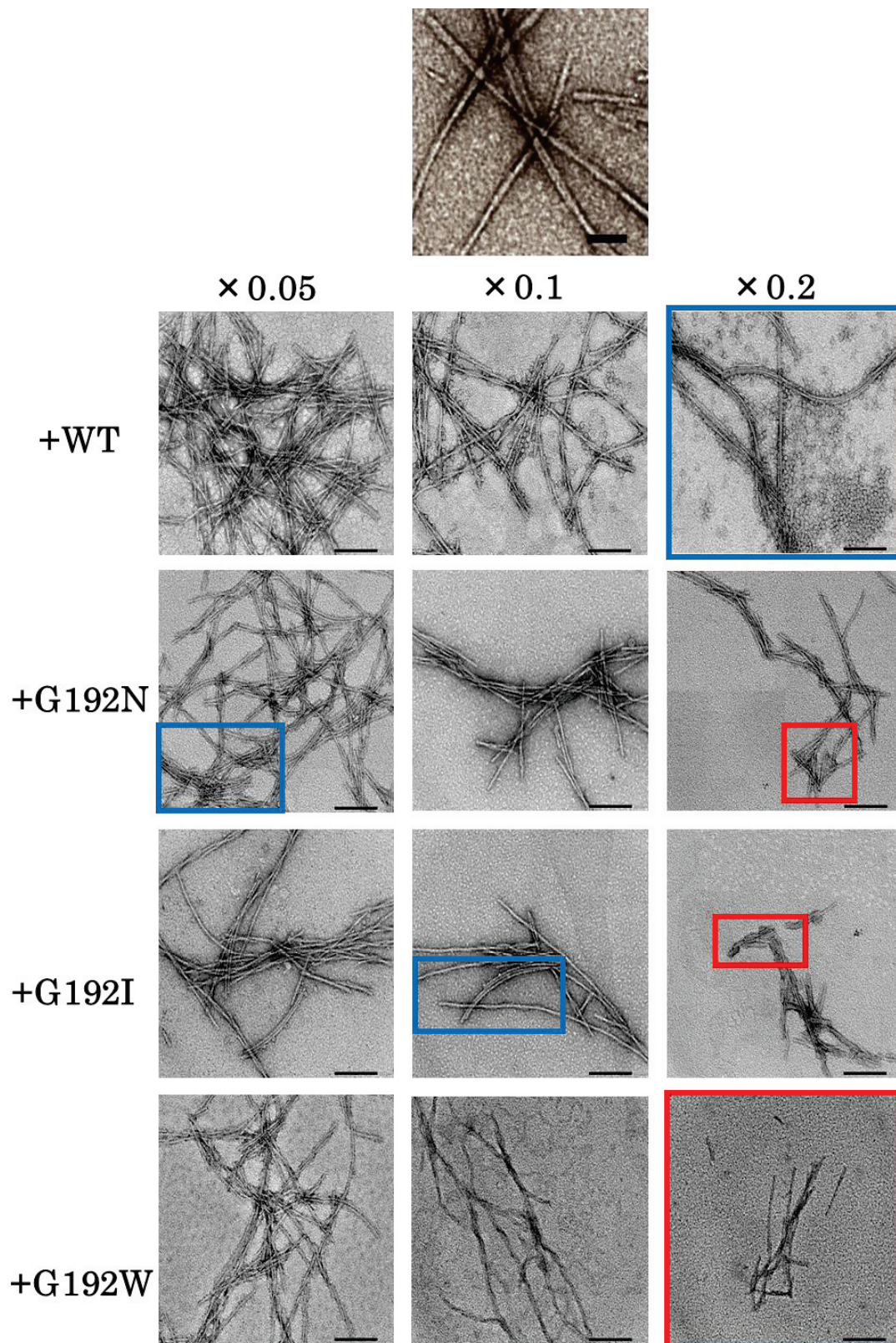


図 3-7. GroEL 存在下における α -Synuclein の線維形成の TEM 観察

図 3-5 における各反応条件の 30 時間時点の TEM 画像を示している。

スケールバーは 200 nm を表している。

Sample	線維幅*(nm)		
	GroEL 添加量		
	×0.05	×0.1	×0.2
+GroEL WT	11.6±0.9	11.2±1.8	10.6±3.8
+GroEL G192N	11.1±1.2	10.7±2.8	9.7±2.9
+GroEL G192I	9.1±2.5	8.0±2.0	7.7±2.3
+GroEL G192W	7.6±2.2	—	—

表 3-3. 図 3-7 で観測したアミロイド線維の線維幅

*線維幅は図 3-7 より得られた TEM 画像より、線維の 3 ヶ所における平均値±標準偏差を示している。—:測定不可

さらに、最も α -Synuclein のアミロイド線維形成を抑制していた GroEL G192W に注目して、他のアミロイド形成タンパク質に対する凝集抑制の効果を検討した(図 3-8)。この結果において、0.4 M の塩酸グアニジン存在下における GroES は 6 時間(360 分)あたりから線維核の形成が開始しているようにみられるのに対し、GroEL G192W を添加した条件下では 15 時間(900 分)あたりからわずかな線維核の形成がみられた。A β 1-40 の場合、GroEL 非存在下では反応開始とともに線維核の形成が始まっている。その一方で、GroEL WT の添加時においても A β 1-40 の線維核形成は遅くなっており、さらに形成される線維量は大幅な減少がみられた。これに対し、GroEL G192W の添加時は GroEL WT よりもさらに線維核の形成が遅延し、さらに形成される線維量も減少しているのが確認された。この結果より、GroES と A β 1-40 のアミロイド線維形成に対して GroEL G192W は α -Synuclein の場合と同様の抑制効果をもっていることが明らかになった。

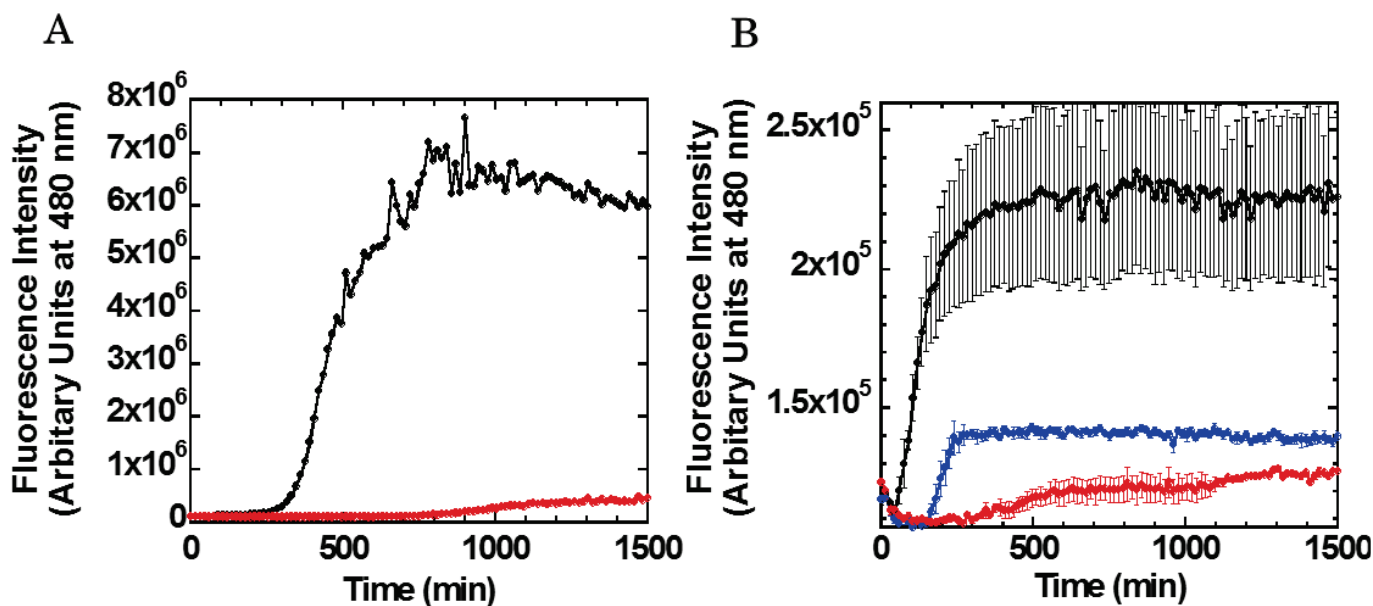


図 3-8. GroES, A β 1-40 のアミロイド線維化における GroEL G192W の効果

A. GroEL G192W による 0.4 M Gdn-HCl 存在下における GroES の線維化抑制効果

GroES(●), GroES+GroEL G192W(●)

B. GroEL による A β 1-40 の線維化抑制効果

A β 1-40(●), A β 1-40+GroEL WT(●), A β 1-40+GroEL G192W(●)

3-3-3. 異なる時間における GroEL を伴った α -Synuclein の線維形成

α -Synuclein の線維形成過程における GroEL の影響をより詳細に調べるため線維形成過程の異なる時間(0, 3, 8, 24 時間)に GroEL の添加を行った。図 3-9 に GroEL WT, GroEL G192N, GroEL G192I, GroEL G192W を α -Synuclein に対しモル比 0.2 になるように 0, 3, 8, 24 時間において添加した線維形成過程を示した。GroEL WT は, 0, 3 時間の添加において, 核形成の遅延はみられるが, 線維伸長過程である 8 時間の添加においてわずかに傾いていた。しかし, 最終的に形成された線維量に差はみられなかった。24 時間における全ての GroEL を添加した条件において, GroEL の影響は見られなかった。GroEL G192N, GroEL G192I の 0, 3 時間における GroEL の添加は, 多少の線維形成がみられるが, 形成された量は添加していない場合と比較し, 大幅に減少していた。G192W において, 0, 3 時間の添加では, 形成される線維はなかった。また, 8 時間の時点における GroEL G192X 各変異体を添加することにより線維伸長が途中で止まっているのが確認された。

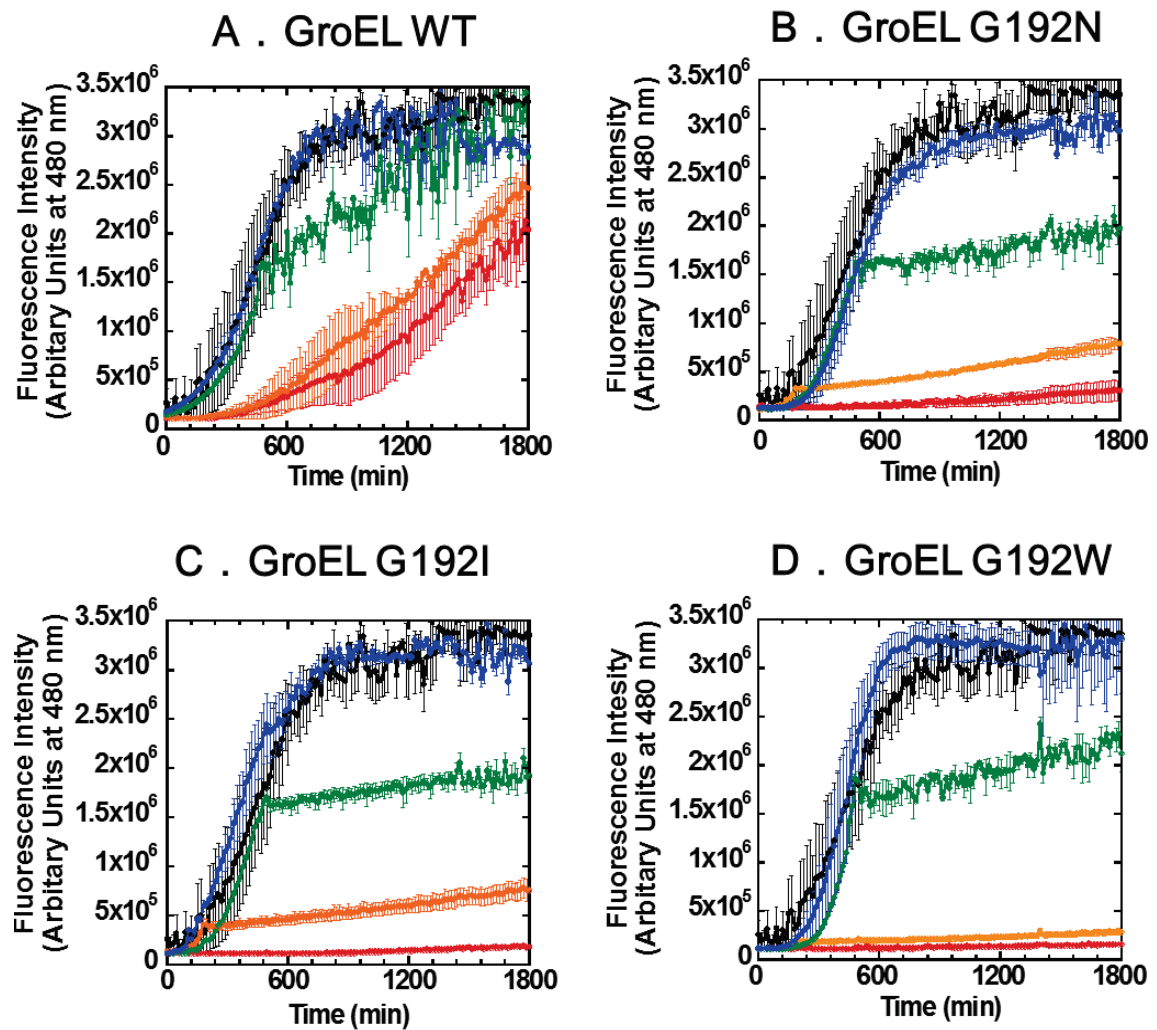


図 3-9. 異なる時間における GroEL 存在下での α -Synuclein のアミロイド線維形成

(A) GroEL WT, (B) GroEL G192N, (C) GroEL G192I, (D) GroEL G192W

GroEL 0 時間 添加 (●), GroEL 3 時間添加 (●), GroEL 8 時間添加 (●)

GroEL 24 時間添加 (●), α -Synuclein (●)

図 3-10 に図 3-9 の各条件における 30 時間の TEM 画像を示した。図 3-9 の 24 時間における GroEL を添加した結果を反映し、どの GroEL を添加した条件でも多くの線維がみられた。0, 3 時間における GroEL WT の添加では、図 3-6 でみられたように長く直線状の形態をとった線維がみられた。しかし、より遅い時間における GroEL WT の添加では、 α -Synuclein の線維形成により類似し、ねじれた形態の線維がみられた。これとは対照的に、GroEL G192W の存在下における線維形成は、どの時間においても一様にねじれた形態の線維がみられた。図 3-10 において観測したアミロイド線維より解析した線維幅を表 3-4 に示した。この結果において、GroEL WT はアミロイド線維形成段階において GroEL を添加する時間が遅くなるほど線維幅が狭くなっていくのが確認された。これは GroEL G192N, GroEL G192I でも 0, 3, 8 時間に GroEL を添加したときは線維幅が狭くなっていくのを確認した。しかし、Thioflavin-T の蛍光観測において完全に線維が形成されている時間である 24 時間に GroEL を添加しても線維幅は 8 時間に GroEL を添加した線維幅よりも広がっていた。これは、GroEL G192W においても同様の結果であった。これを TEM により観測された形態学的な観点と合わせると、GroEL WT と GroEL G192X 変異体では α -Synuclein のアミロイド線維化に及ぼす影響が異なることが示唆される。つまり、図 3-6 で示したように、添加する GroEL の種類により、形成される線維の形態が異なることが再度確認された。

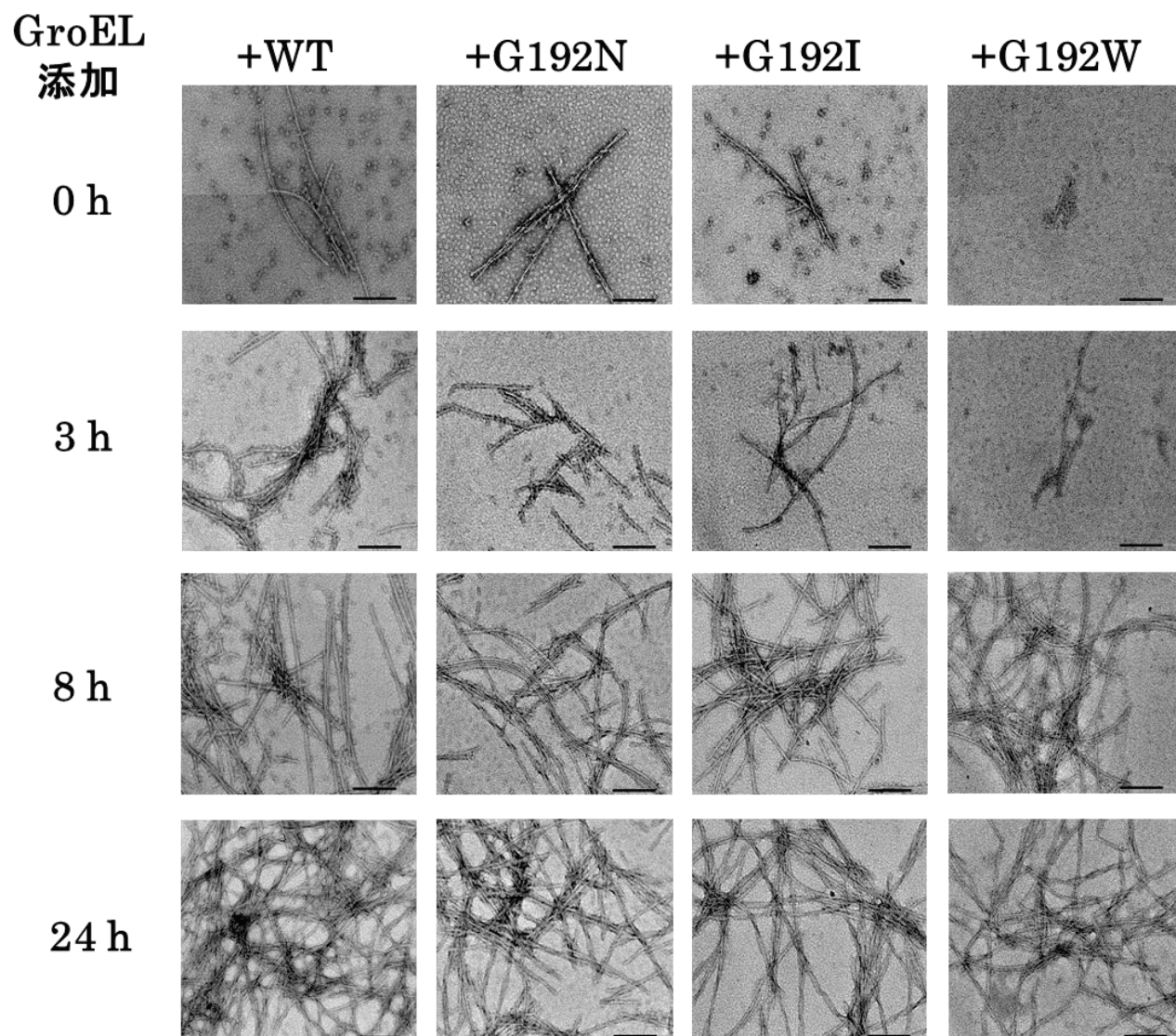


図 3-10. 異なる時間における GroEL 存在下での α -Synuclein が形成した線維の TEM 画像
各 GroEL は、 α -Synuclein のアミロイド線維形成において左側に示した時間において添加を行った。

TEM によるアミロイド線維の観察は、図 3-7 の Thioflavin-T assay における

30 時間形成した線維を用いた解析を行った。

スケールバーは 200 nm を表している。

表 3-4. 図 3-10 で観測したアミロイド線維の線維幅

添加時間	線維幅*(nm)			
	サンプル			
	EL WT	G192N	G192I	G192W
0h	11±1.8	8.7±1.8	8.3±1.7	—
3h	8.8±1.1	8.3±0.9	7.8±2.6	—
8h	8.2±0.8	7.9±0.5	6.9±1.2	6.4±1.0
24h	7.8±1.1	10±1.9	8.4±0.4	8.3±1.8

*線維幅は図 3-7 より得られた TEM 画像より, 線維の 3 ヶ所における平均値±標準偏差を示している。—:測定不可

異なる時間の GroEL の添加における Thioflavin-T 蛍光測定と TEM 観察の結果より, GroEL G192X 変異体は α -Synuclein のアミロイド線維形成時様々な状態において相互作用しており, さらに形成される線維の形態が Gly192 を置換したアミノ酸により違いが生じるのを確認した。この形成されるアミロイド線維の形態の違いは微小な変化である。しかし, 凝集中間体の形成も, 線維伸長にも α -Synuclein の単量体が関連している。そのため, Gly192 を置換したアミノ酸残基の大きさにアピカルドメインの傾きを変化させたことで α -Synuclein 単量体との相互作用に違いが生じ, これにより最終的に形成される線維の形態にも違いが起これらと考えられる。これをより詳細に調べるために Seed 存在下における α -Synuclein の線維への GroEL WT 又は GroEL G192W 変異体の影響を解析した。 α -Synuclein は線維核に単量体が結合していくことで線維の伸長が生じる。これは, 予め線維核が存在することで線維伸長が加速することが報告されている(106)。そこで, Seed 存在下で α -Synuclein の単量体と GroEL G192W 変異体が相互作用しているのであれば GroEL WT 存在下よりも線維形成が遅くなることが予測される。

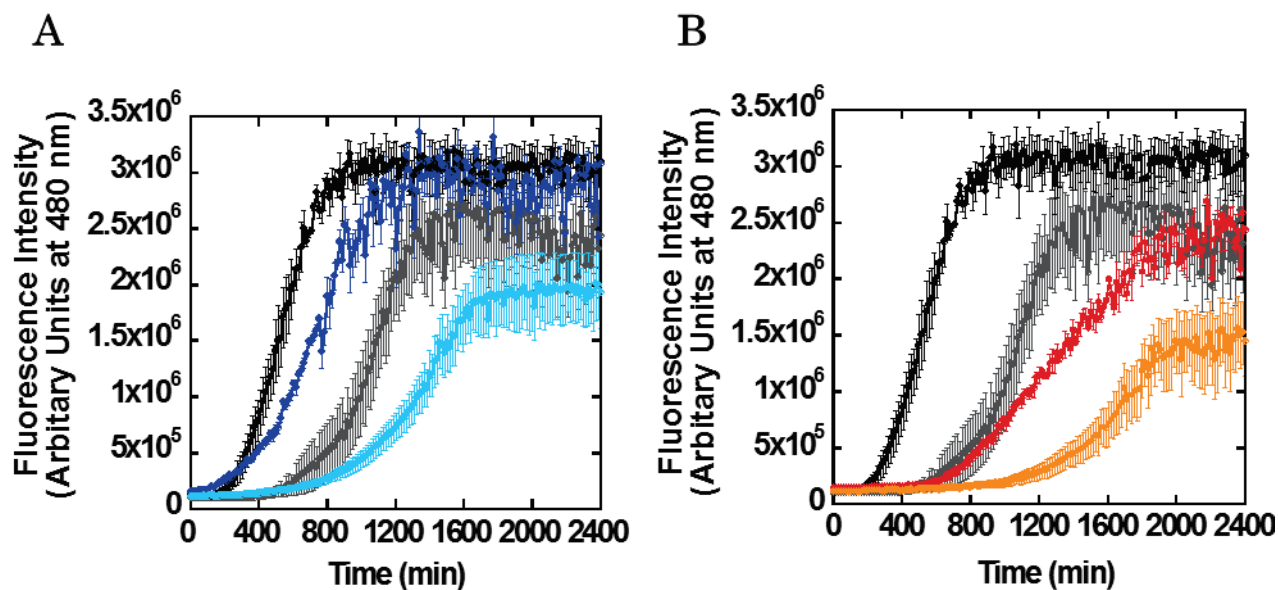


図 3-11. Seed 存在下における α -Synuclein の線維形成時の GroEL の影響

A: GroEL WT 存在下
 10 % Seed 存在下での α -Syn(●),
 Seed+ α -Syn+GroEL (●), α -Syn(●), α -Syn+GroEL(●)
 B: GroEL G192W 存在下
 10 % Seed 存在下での α -Syn(●),
 Seed+ α -Syn+GroEL(●), α -Syn(●), α -Syn+GroEL(●)

図 3-11 に示したように、Seed 存在下で α -Synuclein は、核形成が急速に行われ、その後の形成される線維量も増加しているようにみられた。これに対し、野生型 GroEL を添加した Seed 存在下においてあまり大きな変化はみられなかった。しかし、GroEL G192W 変異体を添加すると Seed 存在下における核形成は大幅に遅延していることが確認された。この結果より、GroEL G192W 変異体は α -Synuclein 単量体が Seed に結合してアミロイド線維の伸長をするよりも早く結合することで線維伸長を阻害していることが示された。

3-4. 考察

HSP60 は, ATP の非存在下ではシングルリング構造であるが, ATP 及び HSP10 存在下ではフットボール型複合体構造をとり, 変性基質タンパク質のリフォールディングを補助されている(107,108)。さらに HSP60 は, 近年 A β 1-40 の凝集を抑制することが報告されている(109)。GroEL WT も A β 1-40 に対するアミロイド線維化の抑制効果が示されている(104)。これより HSP60 は, GroEL とは異なる独自のシャペロニン機構をもっているが, 類似した天然変性タンパク質の凝集抑制効果を示していることから従来考えられている変性基質に対する GroEL の機能とは直接的に関係していないことが推測される。そこで, 本章では, GroEL の Hinge II 部位における Gly192 残基を置換したことで従来のシャペロニン活性を保持していない GroEL G192 変異体を用いて, 天然変性タンパク質の凝集に対する影響について評価した。Hinge II 部位における Gly192 をより大きいアミノ酸残基にすることで, A β 1-40 及び α -Synuclein への親和性が増加しているのを図 3-3 に示した。図 3-5 で示したように, α -Synuclein との親和性の増加は, その線維形成機構における抑制能力と一致しており, 特に, Gly192 を最も大きいアミノ酸残基に置換した G192W 変異体は α -Synuclein の線維形成を最も抑制した。より大きいアミノ酸に置換した変異体は, アピカルドメインの傾きを増加させることで Open 状態となり, 様々な変性タンパク質の疎水性相互作用が高くなると考えられる。実際に過去の研究において, GroEL G192W の TEM 画像では, アピカルドメインが ATP の非存在下において Open 状態となっていた(19)。第 2 章において, Gly192 残基をファンデルワールス体積に注目して様々なアミノ酸残基に置換した変異体は置換した側鎖の大きさによりアピカルドメインの傾きが変化しているのを示した。アピカルドメインの傾きを変化させることで, GroEL の α -Synuclein のアミロイド線維形成機構に及ぼす影響が変化すると考えられた。実際に, 図 3-6 及び図 3-7 で示したように, GroEL 存在下によって形成される α -Synuclein のアミロイド線維の形態は Gly192 を置換した変異体で異なっていることから Gly192 を置換するアミノ酸残基によって調整できることが考えられた。さらに, 図 3-10 で示し

たように, GroEL WT は, α -Synuclein の線維形成における初期の段階で添加することで α -Synuclein が形成するアミロイド線維本体のねじれた形態とは異なり, プロトフィブリルがお互いに並行に配置した平らな形態であるのを確認した。この形成する線維の形態を調節する能力は, α -Synuclein に対する GroEL WT の最も弱い相互作用が影響していることが考えられる。GroEL G192W は α -Synuclein に対して最も強い相互作用を示していた。GroEL との相互作用は, α -Synuclein の単量体において観測した。 α -Synuclein のアミロイド線維形成機構は, 始めに単量体分子が凝集し, オリゴマーとなり, そこから線維核が生じ, この線維核に単量体分子が次々と結合していくことで線維伸長が起こるとされている。つまり, Gly192 を他のアミノ酸残基に置換することでより α -Synuclein との親和性が増加した GroEL G192X 変異体は, α -Synuclein 単量体分子と結合することで凝集を阻害するか, 単量体の線維核への結合を阻害していることが考えられた。さらに, 図 3-11 で Seed 存在下における α -Synuclein の線維形成において, GroEL WT は Seed 存在下で α -Synuclein の線維形成が加速された。しかし, GroEL G192W は Seed 存在下においても線維化が加速されなかった。この結果より, 線維核に対する α -Synuclein 単量体の相互作用よりも GroEL G192W に対する α -Synuclein 単量体の相互作用の方がより強固であることが考えられた。

これらの結果より, GroEL は, 線維形成における初期の段階に影響を及ぼし, GroEL の Hinge II 部位における Gly192 残基におけるアミノ酸残基を置換したことで, アピカルドメインの傾きと α -Synuclein 単量体への親和性に違いが生じ, その結果 α -Synuclein が形成する線維の形態にも変化が生じたことが考えられる。さらに, 図 3-8 で示したように, GroES と A β 1-40 における GroEL G192W のアミロイド線維形成の抑制について検討したところ, それぞれ α -Synuclein の場合と同様に高い抑制効果がみられた。A β 1-40 における線維形成の Thioflavin-T 蛍光は GroEL G192W 存在下では GroEL WT 存在下と比較して線維核の形成が遅延し, さらに形成される線維量も減少しているようにみられた。A β 1-40 は 40 残基の

アミノ酸からなる低分子ペプチドである。A β 1-40 は Closed 状態の GroEL でもキャビティ内部に取り込まれると考えられるが、GroEL G192W 変異体はさらに Open 状態となることでキャビティ内部に取り込まれやすくなり、アミロイド線維形成をより抑制していると考えられる。また、GroEL G192W は ATP の非存在下において GroES が結合することを以前報告している(19)。GroES は GroEL のアピカルドメインにおける GroES 結合部位に結合する。GroES の基質結合部位は基質結合部位に近い位置に存在している(10)。さらに、GroES の線維形成過程は、GroES が変性することで 7 量体構造が単量体に解離した後アミロイド線維を形成するようになる(110)。図 3-7 において GroEL G192W に GroES が単量体に解離するよりも早く結合することでアミロイド線維形成を抑制している可能性も考えられる。GroEL G192W は α -Synuclein, GroES, A β 1-40 におけるアミロイド線維形成を抑制していることを示し、様々なアミロイド線維を形成するタンパク質の凝集抑制効果を有している可能性が考えられる。これらのアミロイド線維を形成するタンパク質に対して GroEL G192W は Gly192 残基を最も大きいアミノ酸である Trp に置換したことで効果的な抑制を示したことから、GroEL のアピカルドメインはアミロイド線維抑制機構に対して重要な役割を果たしていると考えられる。そのため、第 4 章では α -Synuclein, GroES, A β 1-42 を用いてアピカルドメイン単独(GroEL-AD)によるアミロイド線維形成抑制効果について解析を行う。

第 4 章 ミニシャペロン「GroEL-AD」を用いたアミロイド線維形成抑制効果

4-1. 緒言

第 2 章において Gly192 残基を置換したアミノ酸残基によりアピカルドメインの傾きが変化しているのが示された。これは、第 3 章における天然変性タンパク質への相互作用の強さにも反映されていた。さらに、 α -Synuclein の線維形成過程において GroEL G192X 変異体は GroEL WT とは異なる影響を及ぼし、形成される線維の形態も変化させていることを示した。グループ II 型シャペロニンである CCT は近年になり、ヌクレオチド存在下において α -Synuclein の家族性変異体の 1 つである A53T 変異体のアミロイド線維形成を抑制することが報告されている(111)。CCT は、ハンチントン病の原因タンパク質とされているポリグルタミンタンパク質(poly-Q)の凝集を抑制することも報告されている(112-114)。シャペロニンは、未だ報告は少ないが、多くのアミロイド形成タンパク質の線維形成機構を抑制できる可能性が考えられる。この際、重要な役割を果たすと考えられるのがアピカルドメインである。

以前本研究室ではグループ II 型シャペロニンにおけるアピカルドメインの先端に位置する Helical protrusion 領域が酵母由来の Sup35NM のアミロイド線維形成を抑制するのを報告した(86)。また、GroEL は A β 1-40 の凝集を抑制するのも報告されており、この際 A β 1-40 は GroEL のアピカルドメインと相互作用していることが示されている(104)。シャペロニンの最も先端に位置し、変性基質の認識と結合を行うアピカルドメインは、アミロイド線維を形成するタンパク質とも相互作用し、その凝集を抑制する機能を持っていることが考えられる。

本章では、アピカルドメイン単独(GroEL-AD)でアミロイド線維を形成するタンパク質と相互作用し、さらに、そのアミロイド線維形成抑制に効果があることを実証した。このとき、天然変性タンパク質 A β 1-42、 α -Synuclein だけでなく、変性条件におけるコシャペロニン GroES を

モデル基質として用いた実験を行った(図 4-1)。GroEL-AD が、様々なタンパク質における凝集経路における効果を検討することにより、線維化タンパク質の変調器及び検知器としての可能性についても考察した。

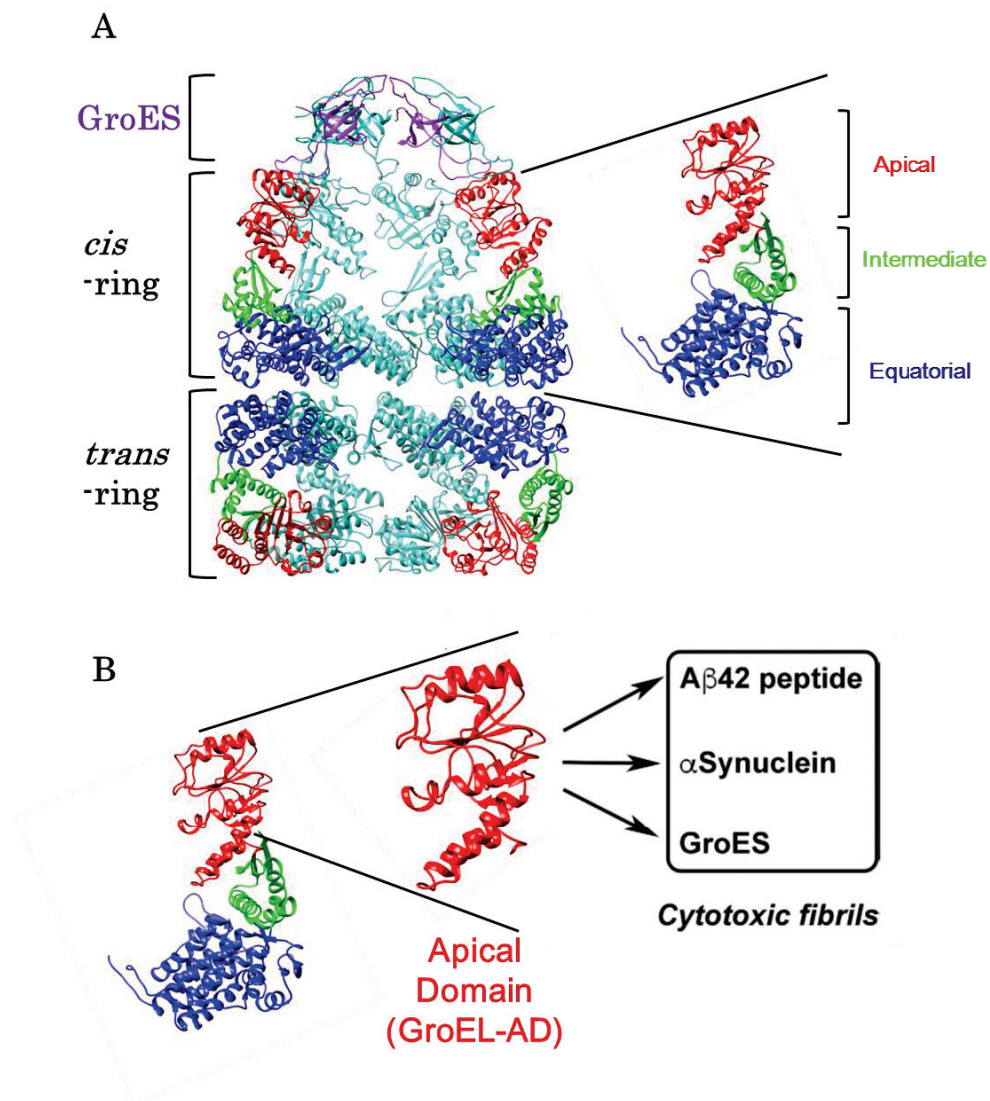


図 4-1. アピカルドメインの構造

A: GroEL 全長(左図)における 1 つのサブユニット(右図)

B: GroEL サブユニット(左図)におけるアピカルドメイン(右図)

この GroEL アピカルドメインの標的となる 3 つのポリペプチド

(Aβ 1-42, α-Synuclein, GroES)を最も右に記した。

4-2. 材料と方法

4-2-1. GroEL-AD の作製

GroEL-AD 発現プラスミド(pET-AD)は, GroELS 発現用プラスミド pUCELS を鋳型として PCR により作製した。PCR で使用したプライマー配列は下記に示す。

アピカルドメイン sequence forward

5' -AGGAGATATACATATGGAAGGTATGCAGTTCGACCGT-3'

アピカルドメイン sequence reverse

5' -GAATTCGGATCCGCGTTAAACGCCGCCTGCCAGT-3'

作製した GroEL-AD 発現プラスミド pET-AD は, DNA Sequencing で配列を確認した。

4-2-2. GroEL-AD の培養と精製

[培養]

LB 培地を用い, 大量培養を行った。全ての培養は 37℃で行った。培地組成並びに手順を以下に示した。

[LB 培地 (pH7.4)]

Polypepton 1.0%

Yeast Extract 0.5%

NaCl 1.0%

菌体は BLR(DE3)に形質転換後, 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/Amp 培地(試験管)に植菌し, 16 時間振盪培養した。培養終了後, 8000 rpm, 20 分, 4 °Cで遠心分離により集菌した。

[精製]

1. 菌体破碎

集菌した BLR(DE3)/pET-AD は 10 倍量の精製用 Buffer を加えて懸濁し、水中にて超音波処理を行い、菌体を破碎した。破碎後、遠心分離(14,500rpm, 30 分, 4℃)した後、上清を回収した。

2. 除核酸処理

菌体破碎後の上清画分に水中で同体積の 5% ストレプトマイシン溶液をゆっくりと滴下し、滴下後室温で 1 時間攪拌して除核酸を行った。攪拌後、遠心分離(14,500 rpm, 30 分, 4 °C)により上清画分を回収した。

3. 熱処理

除核酸後の上清画分は、70-75 °C で 10 分間熱処理を行った後水中で急冷し、15 分間静置した。その後遠心分離(14,500 rpm, 30 分, 4 °C)により上清画分を回収した。除核酸後の上清画分は、70-75℃, 10 分間熱処理を行った後水中で急冷, 15 分間静置した。

4. 硫酸アンモニウム分画

熱処理後、遠心分離(14,500 rpm, 30 分, 4 °C)により回収した上清画分に、水中で攪拌しながら硫酸アンモニウムを終濃度 65 % になるまでゆっくりと添加し、添加後さらに 1 時間攪拌した。攪拌後、遠心分離(14,500rpm, 30 分, 4 °C)により沈殿画分を得た。

5. ゲルろ過クロマトグラフィー

硫酸沈殿後の沈殿を精製バッファーで溶解し、ゲルろ過クロマトグラフィー(Sephacryl S-300:GE Healthcare)にアプライし、ゲルろ過クロマトグラフィー用バッファーで、流速 0.5

ml/min により溶出を行った。溶出したピーク画分は SDS-PAGE で確認し, GroEL-AD が溶出した画分を回収した。

6. 透析, 凍結乾燥

回収したゲルろ過クロマトグラフィー後の画分は, 5 mM 重炭酸アンモニウム溶液により 4℃で一晩透析を行った後, 1 mM 重炭酸アンモニウム溶液により 4℃で 2 時間透析を行った。透析後, EYELA 凍結乾燥器 FD-50 を用いて凍結乾燥した。凍結乾燥後のサンプルは 4℃で保存した。

GroEL-AD の精製に用いた Buffer は下記に記す。

—使用 Buffer—

[精製用 Buffer]	[ゲルろ過クロマトグラフィー用 Buffer]
50 mM Tris-HCl (pH7.5 at 25 °C)	50 mM Tris-HCl (pH7.5 at 25 °C)
2 mM EDTA	0.1 mM EDTA
2 mM DTT	0.1 mM DTT
0.1 mM PMSF	100 mM NaCl

図 4-2 に詳細な精製過程を示す。

精製の流れ(GroEL-AD)

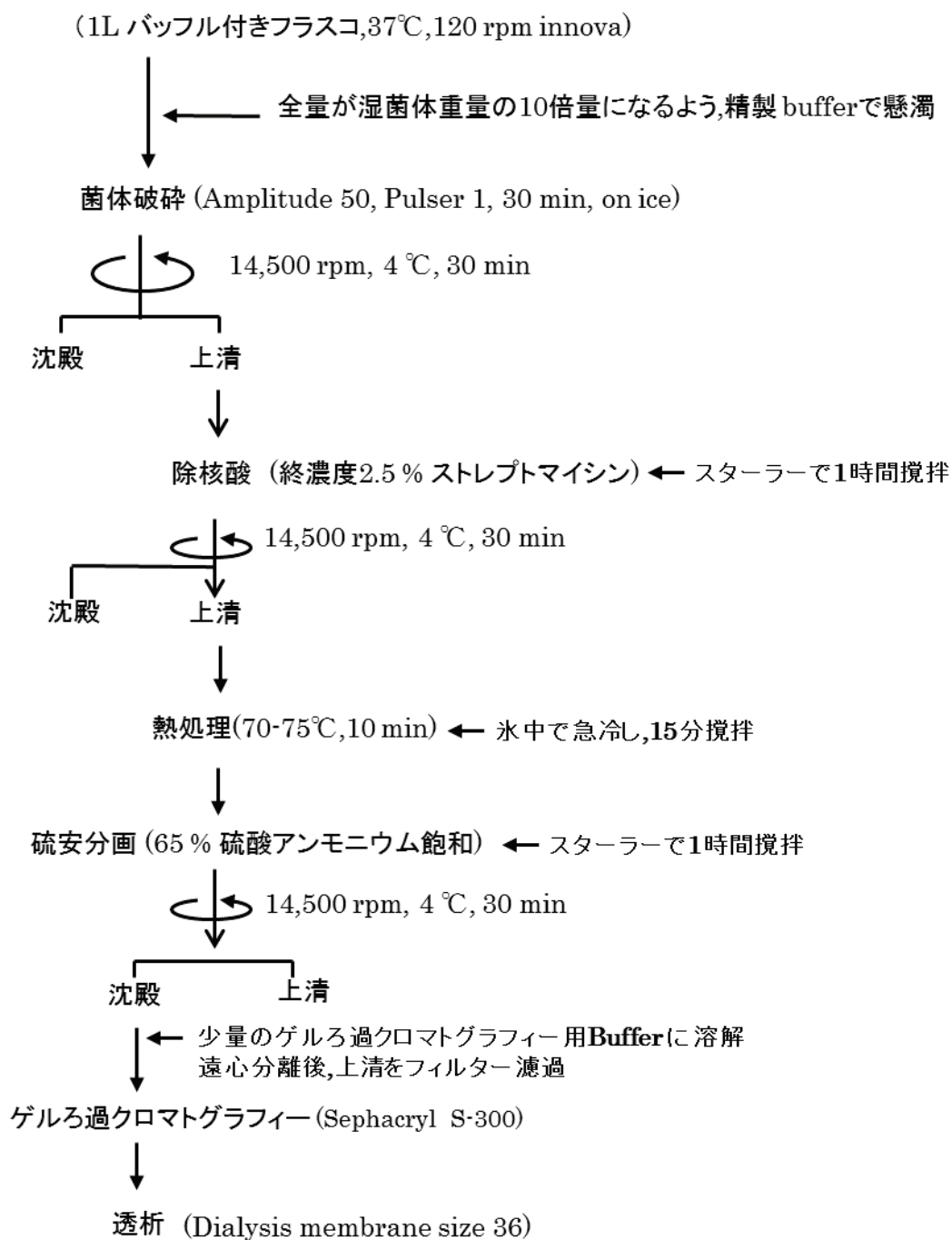


図 4-2. GroEL-AD の精製過程

4-2-3. 測定に用いたサンプルの調整

α -Synuclein は, 3-2-2 で示したように精製した。また, α -Synuclein は 3-2-3 で示したように調整し, A β 1-42 は 3-2-4 の A β 1-40 と同様の手順で調整を行った。GroES と GroEL-AD の凍結乾燥標品は, 測定用の Buffer で溶解した後, 2-2-6 に示したタンパク質定量法により調整を行った。

4-2-4. GroEL-AD を伴った変性タンパク質の線維形成実験

GroEL-AD 存在下又は非存在下における変性タンパク質のアミロイド線維形成は, 3-2-6 と同様の方法により行った。線維形成の測定における測定条件は下記に示す。

[GroES の線維形成条件]	[α -Synuclein の線維形成条件]
1 mg/ml GroES	1 mg/ml α -Synuclein
50 mM phosphate buffer pH7.4	25 mM Tris-HCl buffer pH7.5
0.4 M guanidine hydrochloride (Gdn-HCl)	150 mM NaCl
20 μ M Thioflavin-T	20 μ M Thioflavin-T

[A β 1-42 ペプチドの線維形成条件]
10 μ M A β 1-42
50 mM phosphate buffer pH7.4
150 mM NaCl
20 μ M Thioflavin-T

GroEL-AD の凍結乾燥標品は, α -Synuclein における測定では 25 mM Tris-HCl (pH7.5)に, A β 1-42 と GroES における測定では 50 mM phosphate buffer (pH7.4) によりそれぞれ溶解したものを使用した。

4-2-5. アミロイド線維の観察

GroEL-AD 存在下又は非存在下において形成したアミロイド線維は, TEM 又は AFM による測定を行った。TEM による観察は, 3-2-9 と同様の手順で行った。AFM (Nanoscope IV scanning microscope, MMAFM-2) による測定は, 大気中において, タッピングモードを用いて行なった。GroEL-AD 存在下又は非存在下において 40 時間インキュベートした α -Synuclein, GroES と 30 時間インキュベートした A β 1-42 のアミロイド線維サンプルを 10 倍希釈 (0.1 mg/mL に調製) してマイカに 15 μ l のせ, 30 分間インキュベート後に 100 μ l の Milli-Q で洗浄し, 室温で一晩風乾させたものをサンプルとした。

4-2-6. GroEL-AD と変性タンパク質の相互作用解析

GroEL-AD と変性タンパク質との相互作用は, 分子間相互作用定量装置 AffinixQNPμ (Initium) を用いて定量的に解析を行った。GroEL-AD と α -Synuclein 又は A β の測定では GroEL-AD 100 ng/ μ l をセンサー電極に固定化し, 反応 Buffer 500 μ l 中でセンサーを安定化させた後, 5 μ l のゲストタンパク質 (α -Synuclein または A β 1-42) を添加した。GroEL-AD と変性条件下における GroES の測定では, GroES をセンサー電極に固定化し, 0.4 M Gdn-HCl を含む反応 Buffer 500 μ l 中でセンサーを安定化させた後, ゲストタンパク質 (GroEL-AD) を添加した。センサー電極への GroEL-AD または GroES の固定化は, 2-2-14 と同様の手順で行った。解析後の固定化タンパク質と結合したゲストタンパク質は 1.6 M Gdn-HCl を含む反応 Buffer 中で 30 分間インキュベートすることで除去した。その後, 反応 Buffer 中で 30 分間インキュベートすることで変性した固定化タンパク質のリフォールディング反応を行った後, センサー電極上の固定化タンパク質は再度解析に使用した。GroES を固定化したセンサー電極は測定前に 0.4 M Gdn-HCl を含む反応 Buffer 中で 30 分間インキュベートを行った。GroEL-AD と α -Synuclein 又は変性条件下における GroES の相互作用解析後のカイネティックパラメーターの算出は, 3-2-5 と同様の手順で行った。

反応に用いた Buffer の組成は以下に示した。

—使用 Buffer—

[反応 Buffer]

50 mM Tris-HCl (pH7.8 at 25 °C)

2 mM EDTA

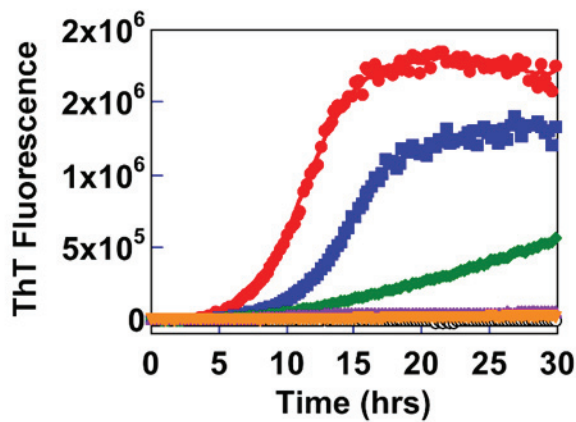
2 mM DTT

4-3. 結果

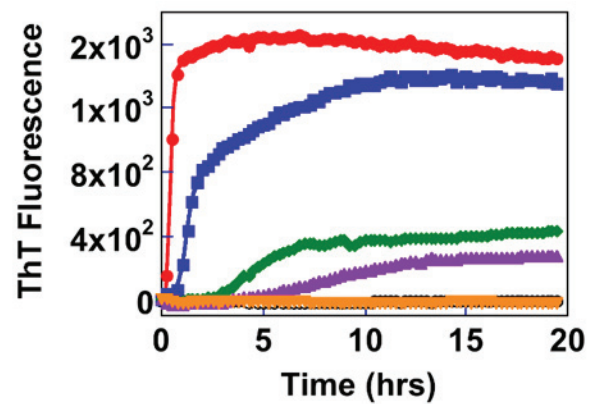
4-3-1. GroEL-AD による様々なタンパク質への相互作用と線維形成抑制

α -Synuclein はパーキンソン病に関与し, A β 1-42 はアルツハイマー病に関与している。GroES は特定の病気への関与はみられないが, Gdn-HCl の存在下などの変性条件下においてアミロイド線維を形成するモデル蛋白質としての特徴を持っている。マウス神経細胞において, GroES の線維化において形成されるオリゴマー分子は, 細胞毒性が示されている。3 つのタンパク質(α -Synuclein, A β 1-42, GroES)の凝集における GroEL-AD の影響を Thioflavin-T 蛍光測定により解析した(図 4-4)。3 つのタンパク質はインキュベートを開始してから 0~6 時間後に線維形成の開始がみられる。各タンパク質において, GroEL-AD を添加することで線維形成における影響がみられた。 α -Synuclein のモル比 1:0.5, A β 1-42 のモル比 1:1, GroES のモル比 1:2 で GroEL-AD を添加すると, 初めの線維核形成段階に GroEL-AD が影響し, その後のアミロイド線維形成も徐々に減少していた。より高い比率で GroEL-AD を添加することで完全に線維形成が抑制され, GroEL-AD による強い阻害効果 が示された。GroEL-AD のみのコントロール実験では線維の形成はみられなかった。図 4-4D のように, 3 つのタンパク質の完全なアミロイド線維の形成を抑制するために, α -Synuclein のモル比 1:3, A β 1-42 のモル比 1:20, GroES のモル比 1:4 と GroEL-AD の必要量が違うことから, 各タンパク質のアミロイド線維化を GroEL-AD が止めるのに異なる影響を及ぼしている と示された。

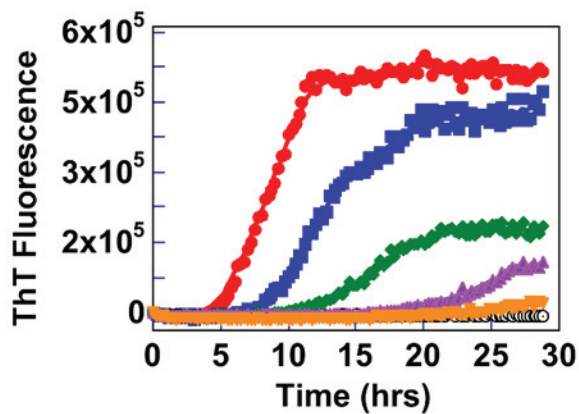
A: α -Synuclein



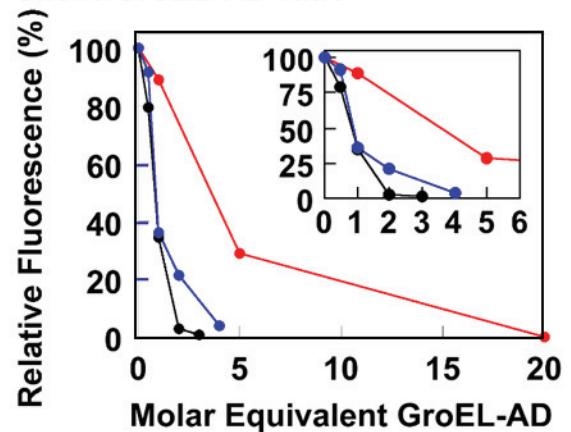
B: A β 1-42 Peptide



C: GroES



D: Client:GroEL-AD ratio



4-4. GroEL-AD を伴った α -Synuclein, A β 1-42, GroES の Thioflavin-T 測定

(A) GroEL-AD 存在下又は非存在下における α -Synuclein の線維形成

(B) GroEL-AD 存在下又は非存在下における A β 1-42 の線維形成

(C) GroEL-AD 存在下又は非存在下における GroES の線維形成

(D) GroEL-AD と 3 つの標的タンパク質の線維形成抑制の関係

α -Synuclein(●), A β 1-42(●), GroES(●)をそれぞれ示す。

4-3-2. GroEL-AD の存在下において形成されたアミロイド線維の形態観察

GroEL-AD の存在下において形成されたアミロイド線維の形態を観察するために、AFM による観察を行った(図 4-5)。一番左側の図においてそれぞれのタンパク質が GroEL-AD の非存在下において異なる形態のアミロイド線維を形成するのが確認できる。GroEL-AD のみでは、凝集せず、アミロイド線維を形成していない。GroEL-AD の存在下でそれぞれのタンパク質は、形成されたアミロイド線維の形態が明確に変化している。より高い割合で GroEL-AD を添加してもアミロイド線維はみられるが、線維は短くなり、全体的な線維の量は極めて少量まで減少していた。これらの条件において、線維と同様にいくつかの小さいアモルファスな凝集が確認できた。 α -Synuclein のモル比 1:3, A β 1-42 のモル比 1:20, GroES のモル比 1:4 と過剰量の GroEL-AD の存在下において最終的に成熟した線維はみられず、いくつかの小さい球状の凝集が代わりにみられる。一番右に示した図と GroEL-AD only で示した図を比較することで、標的となるタンパク質または過剰量の GroEL-AD のアモルファスな凝集であることが考えられる。

以上の結果より、線維形成反応における GroEL-AD の関与は、標的となるタンパク質が形成するアミロイド線維の形態を大きく変化させるのではなく、各標的タンパク質が最終的に形成する線維量を阻害する働きがあると考えられた。

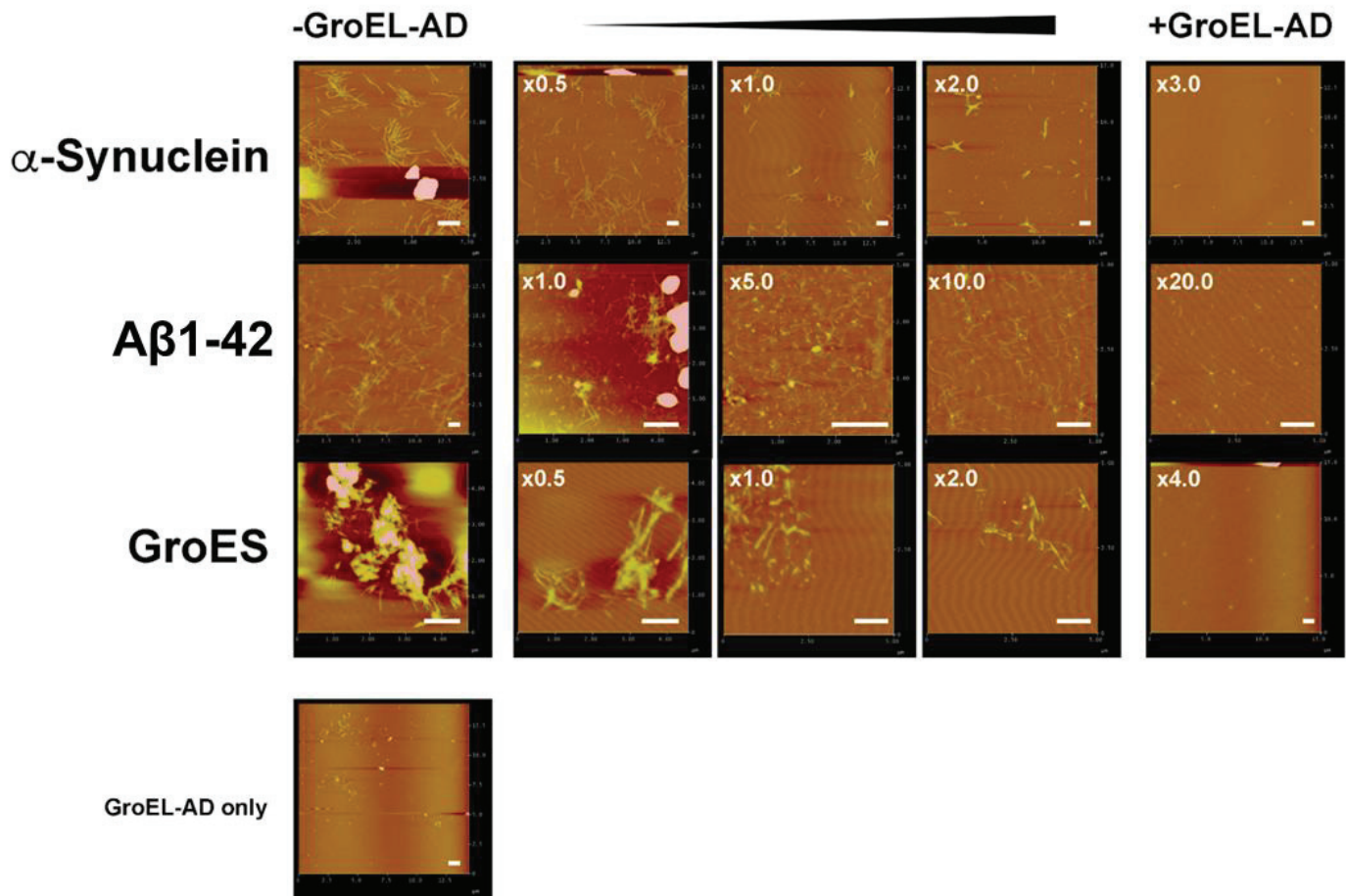


図 4-5. GroEL-AD を伴った線維形成後の AFM 観察
スケールバーは, 1 μ m を示す。

次に、3 つの標的タンパク質が形成する線維の形態への GroEL-AD の影響をより詳細に解析するために、TEM による解析を行った(図 4-6)。このときコントロールとして GroEL-AD の代わりに等モル濃度の牛血清アルブミン(BSA)を使用した。図 4-6 において、BSA は 3 つの標的タンパク質の線維形成反応に影響しているのが確認できる。しかし、等モル濃度の GroEL-AD は 3 つの標的タンパク質の線維形成をさらに阻害していることから、線維形成における BSA の影響は非特異的であるのが示される。BSA の各標的タンパク質への非特異的な影響はタンパク質で異なっている。BSA 存在下の A β 1-42 は Thioflavin-T 蛍光が全体でわずかに減少しているのがみられるが、線維核形成又は形成される線維量に影響しない。それに対し、BSA 存在下の GroES は線維核形成が著しく遅延している。BSA 存在下の α -Synuclein は線維核形成と線維伸長の両方に影響している。この BSA の添加における異なる影響は、各標的タンパク質の線維化反応を推進する特異的な分子間相互作用の違いが影響している。各標的タンパク質の異なる条件で形成された線維の形態に大きな違いはなかった。しかし、例外が 2 つある。1 つは、BSA の存在下で形成した A β 1-42 の線維は、A β 1-42 単独と GroEL-AD 存在下の A β 1-42 において形成した線維よりも短いことである。そして、GroEL-AD の存在下で形成した α -Synuclein の線維は、他の 2 条件で形成した線維よりも幅が著しく細くみえることである。線維の全体的な形態は図 4-5 における AFM で観察された結果と一致している。

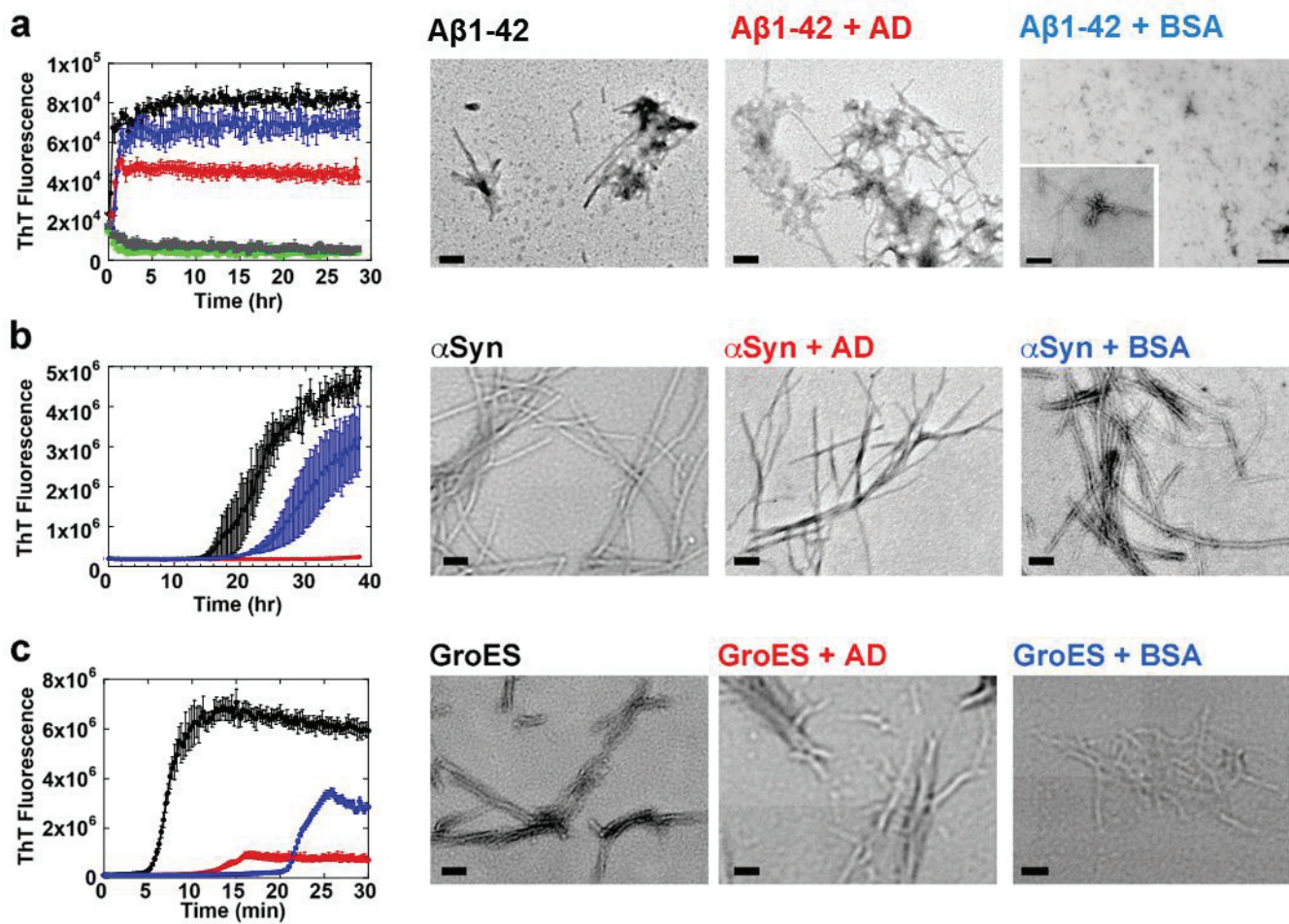


図 4-6. GroEL-AD を伴った線維形成後の TEM 観察

左 : a. Aβ1-42, b. α-Synuclein, c. GroES の Thioflavin-T 蛍光測定結果

GroEL-AD 非存在下(●), GroEL-AD 存在下(●), BSA 存在下(●)

右 : 左図の 30 時間(Aβ1-42, GroES) と 40 時間(α-Synuclein)の線維形成後の TEM 画像

図上に示した文字の色はそれぞれ左図のものを対象にしている。

4-3-3. 異なる時間における GroEL-AD を伴ったアミロイド線維形成への影響

次に、各標的タンパク質の線維形成における異なる時間で GroEL-AD を添加したときの影響について検証した(図 4-7)。各標的タンパク質において、 α -Synuclein では 0, 3, 8, 24 時間に、 $A\beta$ 1-42 では 0, 0.5, 1.5, 8 時間に、GroES では 0, 6, 10, 24 時間に GroEL-AD を添加した。4-3-1 で示したように線維形成を完全に抑制するようにそれぞれ α -Synuclein のモル比 1:3, $A\beta$ 1-42 のモル比 1:20, GroES のモル比 1:4 で GroEL-AD を添加した。各実験において、GroEL-AD を線維化の途中で添加することで形成した線維はもとの状態に戻らないが、更なる線維伸長を阻害することはできた。GroEL-AD は各時間において添加してすぐ影響を及ぼしているのが見て取れる。標的タンパク質に関係なく、とても早い時間に GroEL-AD を添加することで線維形成を完全に阻害できるのが示された。この結果と 4-3-2 で示した AFM, TEM の図と合わせて、GroEL-AD は検出可能なタンパク質線維の構造を修正する能力があるのではなく、アンフォールドした可溶性の単量体タンパク質に直接作用しているのか、線維を形成させる様々な中間体分子種の濃度を減少させている働きがあると考えられた。多量体ハンチンチンの構造に影響を及ぼす遊離タンパク質濃度を調節する類似した分割機構が HSP70 と HSP40 で報告されている。しかし、本研究における、GroEL-AD 存在下での α -Synuclein の場合、形成される線維の形態がわずかに変化していることが示唆された。

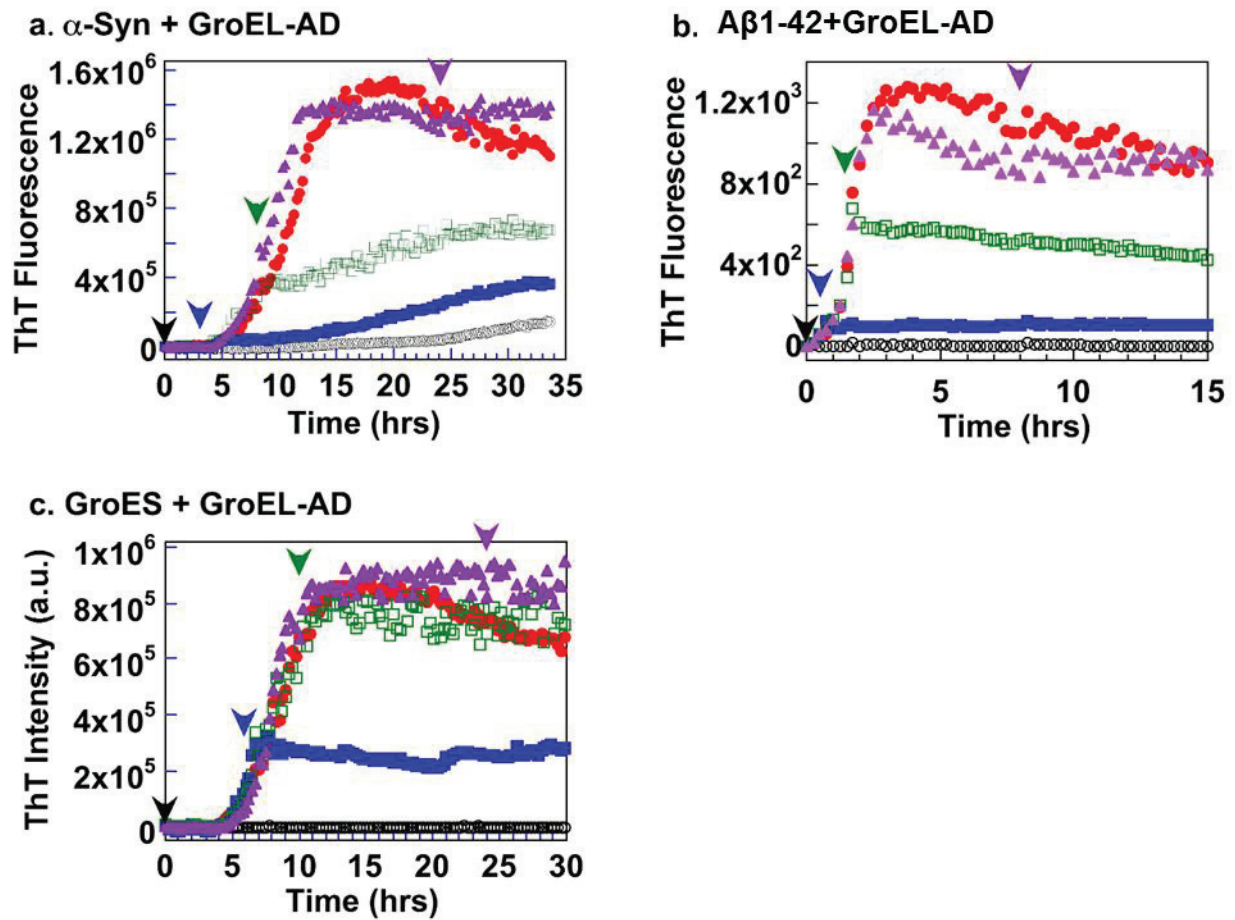


図 4-7. 異なる時間に GroEL-AD を添加したときの線維形成反応

(a) α -Synuclein, (b) $A\beta$ 1-42, (c) GroES

各タンパク質における GroEL-AD の添加時間は以下の通りである。

(a) 0 時間(●), 3 時間(●), 8 時間(●), 24 時間(●)

(b) 0 時間(●), 0.5 時間(●), 1.5 時間(●), 8 時間(●)

(c) 0 時間(●), 6 時間(●), 10 時間(●), 24 時間(●)

において GroEL-AD を添加した。

(●)は, GroEL-AD 非存在下における線維形成結果を示している。

4-3-4. GroEL-AD と標的タンパク質との相互作用解析

直接的な質量の解析が行える QCM を使用して GroEL-AD と標的タンパク質間の相互作用をより詳細に解析した。QCM は、センサー電極にタンパク質を固定化しておき、相互作用するタンパク質を添加していくことで生じる微量な質量変化を振動数変化としてリアルタイムに検出できる。そのため、タンパク質間の相互作用を高感度に測定できる方法である。図 4-8a に GroEL-AD と 3 つの標的タンパク質の相互作用解析結果を示した。反応 Buffer を添加したとき、振動数は変化してないが、各標的タンパク質の添加することにより早急な振動数変化が生じている。振動数の減少量は標的タンパク質の種類により異なっている。GroEL-AD と GroES 又は α -Synuclein の相互作用は、ほとんど振動数が減少していない。それに対し、A β 1-42 は添加するとすぐに振動数が減少している。この変化は、反応量が多いのか、非特異的な結合を反映していることが考えられる。A β 1-42 による解析は、他の 2 つの標的タンパク質と比べ、その反応は不安定であった。これは、A β 1-42 の分子サイズが小さすぎるのか、前述したように A β 1-42 の線維化抑制に多量の GroEL-AD が必要な性質が反映され、正確な解析が行えないことから、QCM による分析に適していないように考えられる。

A β 1-42 と GroEL-AD の相互作用解析と比較し、GroEL-AD:GroES と GroEL-AD: α -Synuclein の相互作用解析はより正確な測定を行うことが可能である。図 4-8b-d に 0.4 M Gdn-HCl 存在下における GroEL-AD と GroES の相互作用解析結果を示した。図 4-8b において、GroES への濃度依存的な GroEL-AD の結合を示した。この結果では、GroEL-AD を添加した各濃度における飽和吸着量 ΔF を算出し、横軸を GroEL-AD の濃度、縦軸を飽和吸着量としてプロットすることで、解離定数 K_d の算出を行った。図 4-8c において示したように、 $|\Delta F|$ をラインフィッティングすることで $(7.0 \pm 1.6) \times 10^{-6} (M)$ の K_d 値を得られる。また、図 4-8b で確認できる GroES と様々な濃度における GroEL-AD の吸着カーブをフィッティングすることで、横軸を GroEL-AD の濃度、縦軸を k_{obs} としてプロットすることで、解離速度 k_{off} , 結合速度 k_{on} を算出した。図 4-8d において k_{obs} vs [GroEL-AD] のプロットより算出した

k_{off} がネガティブな値を示すので, 図 4-8d における測定ではこの数値は 0 に設定した。この条件において算出した k_{on} は $4.1 \times 10^4 (\text{M}^{-1} \text{s}^{-1})$ であった。この条件下におけるデータ分析では, 反対にできるカイネティック率定数の概算を通した K_d を概算できなかった。しかし, 図 4-8c では, GroES と GroEL-AD の間において, 不可逆なカイネティック率定数における相互作用と一致していた。

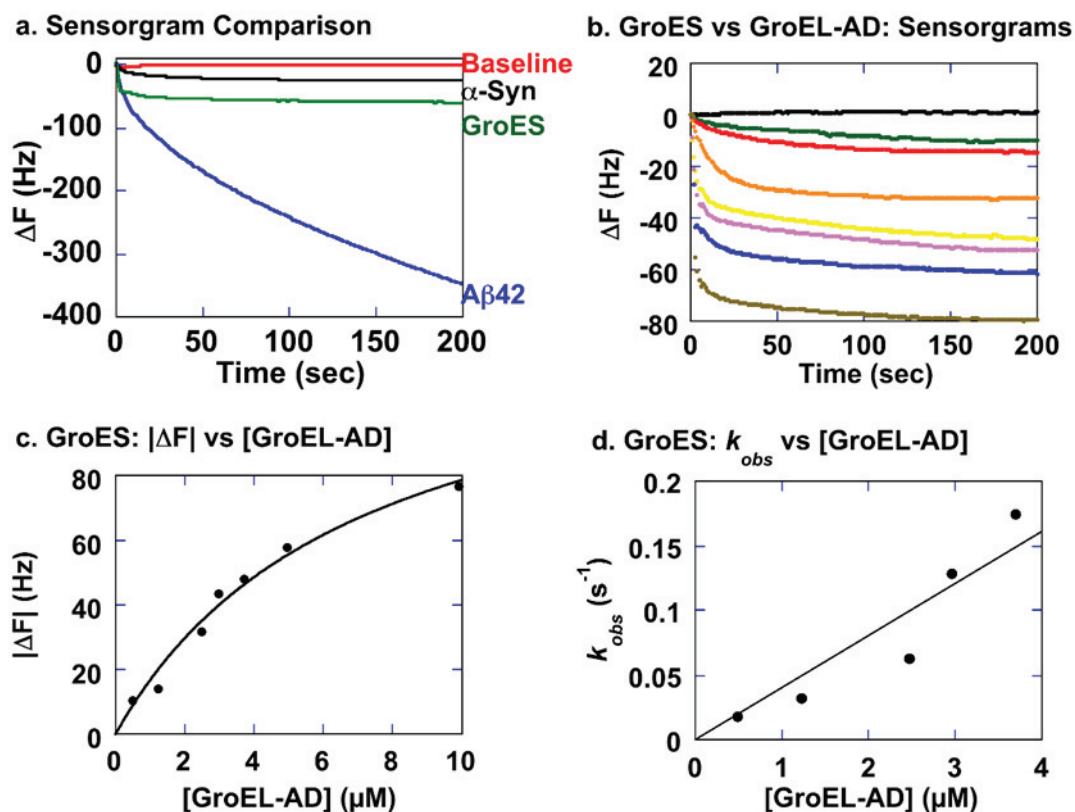


図 4-8. GroEL-AD と α -Synuclein, A β 1-42, GroES 間の AffinixQN μ における相互作用解析

(a) GroEL-AD と α -Synuclein(—), GroES(—), A β 1-42(—)との相互作用解析

(b) GroEL-AD と変性条件下における GroES との相互作用解析

0 μ M(—), 0.495 μ M(●), 1.23 μ M(●), 2.48 μ M(●), 2.97 μ M(●), 3.71 μ M(●), 4.95 μ M(●), 9.90 μ M(●) におけるプロットをそれぞれ示している。

(c)異なる濃度における GroEL-AD を添加したときの GroES との $|\Delta F|$ の値のプロット

(d)異なる濃度における GroEL-AD と GroES において観測された k_{obs} の線形回帰線

Sample	k_{on} ($M^{-1} \cdot S^{-1}$)	k_{off} (S^{-1})	Kd (M)
GroES	4.1×10^4	0.29	7.0×10^{-6}

表 4-1. GroES と GroEL-AD の相互作用において算出したカイネティックパラメーター
センサー上には GroES を固定化し, 0.4 M Gdn-HCl 存在下での解析を行った。

図 4-9 に GroEL-AD と α -Synuclein との相互作用の解析結果を示した。この結果からは、GroES と GroEL-AD 間の相互作用とは比べ、異なった反応を示しているのが確認できる。AffinixQN μ を用いた QCM 測定により観測された結合カーブは、推奨されている単指数反応へ適合しなかった。さらなる分析では、各 α -Synuclein 濃度における GroEL-AD への結合は、異なる外見上の定数率における 2 つの別々な結合反応である二重指数関数に最も適合していた。相互作用の解析より振幅の合計を使用し、図 4-9b より、 $Kd = (1.23 \pm 0.31) \times 10^{-6}$ (M)を算出した。外見上の速い定数率($k_{\text{obs fast}}$)とより遅い定数率($k_{\text{obs slow}}$)の両方をそれぞれ用いて結合反応における $k_{\text{on}}/k_{\text{off}}$ を算出した(図 4-9c, d)。図 4-8 に示すように、 $k_{\text{obs fast}}$ より、 $k_{\text{on}} = 1.20 \times 10^3$ (M $^{-1}$ s $^{-1}$)と $k_{\text{off}} = 0.25$ (s $^{-1}$)の値を導き出した。これより、 $Kd = 2.1 \times 10^{-4}$ (M)を算出した。次に、図 4-9d で示したように、 $k_{\text{obs slow}}$ から $k_{\text{on}} = 9.2 \times 10^2$ (M $^{-1}$ s $^{-1}$)と $k_{\text{off}} = 0.017$ (s $^{-1}$)のカイネティック率をそれぞれ導き出した。これより、解離定数 $Kd = 1.8 \times 10^{-5}$ (M)の数値を算出した。

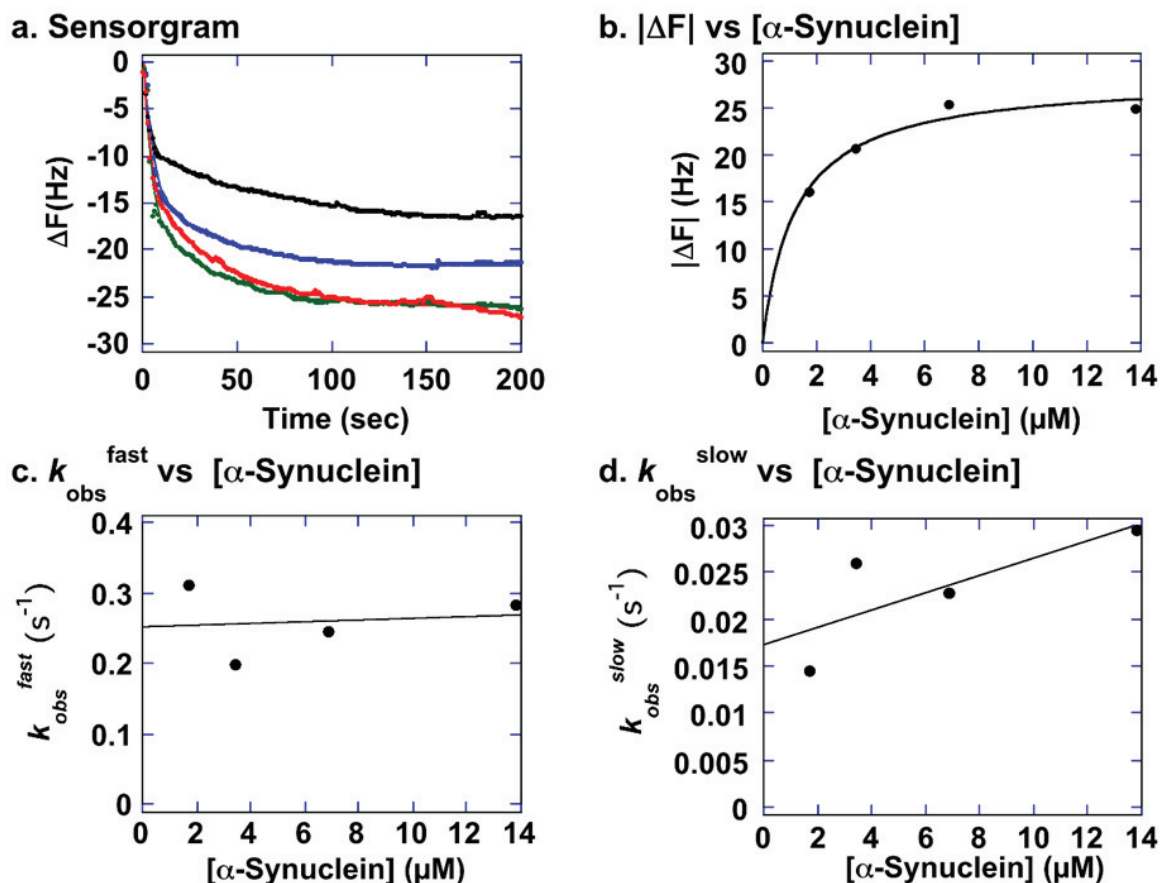


図 4-9. QCM を用いた GroEL-AD 分子と α -Synuclein の相互作用解析

(a) 異なる濃度において添加した α -Synuclein と GroEL-AD の QCM による相互作用解析

1.72 μ M (●), 3.45 μ M (●), 6.90 μ M (●), 13.8 μ M (●) をそれぞれ示している。

(b) 異なる濃度において添加した α -Syn と GroEL-AD との $|\Delta F|$ 値の非線形フィッティング

(c) 異なる濃度において添加した α -Syn の GroEL-AD に対する k_{obs}^{fast} の線形回帰分析

(d) 異なる濃度において添加した α -Syn の GroEL-AD に対する k_{obs}^{slow} の線形回帰分析

k_{obs}	k_{on} ($M^{-1} \cdot s^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})	Kd (M)
Fast	1.2×10^3	0.25	2.1×10^{-4}
Slow	9.2×10^2	0.017	1.8×10^{-5}

表 4-2. α -Synuclein と GroEL-AD の相互作用において観測された 2 つのモードにおいて

それぞれ算出したカイネティックパラメーター

センサー上には GroEL-AD を固定化して反応を行った。

これらの分析において、 α -Synuclein の GroEL-AD への結合の重要な特徴である著しい k_{off} 速度に関係する結合機構を明らかにした。GroEL-AD と GroES との結合は、1つの不可逆な結合であるのに対し、図 4-9 で示したように、 α -Synuclein と GroEL-AD 間の 1 つの単純ではない多様な様式における動的な結合による平衡を示していた。GroEL-AD は、*in vitro* において、アミロイドを形成するタンパク質の線維形成における様々な形態を認識し結合することができる能力を本質的に備えている。これにより、GroEL-AD は様々なアミロイド状粒子の形成を抑制することが可能になると考えられる。

4-4. 考察

本章では、シャペロニン GroEL より単離したアピカルドメイン(GroEL-AD) を作製し、A β 1-42, α -Synuclein, GroES のアミロイド線維に対する凝集抑制効果を検討した。過剰量の GroEL-AD を添加した条件において A β 1-42, α -Synuclein, GroES のアミロイド線維形成は完全に抑制されるのを示した(図 4-4)。 α -Synuclein や GroES の線維形成においては、過剰量の GroEL-AD を添加しなくても、十分な抑制効果がみられた。しかし、A β 1-42 では完全な抑制効果を得るためには 20 倍量以上の GroEL-AD が必要であった。 α -Synuclein や GroES では完全な抑制がみられた濃度においても、A β 1-42 では完全な抑制を示さなかった(図 4-4d)。完全に線維化を抑制する量より低い濃度の GroEL-AD を添加すると、凝集傾向のあるタンパク質分子と相互作用することで、最終的に形成する線維量が減少していると考えられた。GroEL-AD の存在下において形成した線維の形態には違いがみられなかった。これは、従来考えられているアミロイド線維を形成する機構が反映されていると考えられる(図 4-5, 図 4-6)。しかし、 α -Synuclein の場合は例外で、GroEL-AD 存在下において形成した線維の TEM 画像は α -Synuclein 単独及び線維形成に無関係な BSA の存在下において形成した線維よりも細くみられた(図 4-6)。図 4-9 の QCM 実験における GroEL-AD と α -Synuclein 間の相互作用観測された複数の結合様式のために、GroEL-AD が α -Synuclein の線維伸長を抑制しており、さらに形成する線維の形態を変化する能力も有していることが考えられた。

本章において確認された GroEL-AD の様々な標的タンパク質の線維形成を強固に抑制する能力は、様々な実験条件下においてさらに明らかとなった。まず、GroEL-AD は、42 アミノ酸残基の短い A β 1-42 ペプチドと、97 アミノ酸残基の GroES 及び 140 アミノ酸残基の α -Synuclein の普通の大きさの両方を標的として結合できた。それに加え、これら標的となるタンパク質の構造は様々で、短いポリペプチドである A β 1-42、天然変性タンパク質の α -Synuclein、そしてネイティブ構造のオリゴマーが部分的に変性した GroES が存在する。それ

にもかかわらず、個々のタンパク質において観測されるそれぞれの線維形成条件においてGroEL-ADは結合に伴いアミロイド線維凝集を制御することができた。しかし、QCMによる結合の分析において、標的タンパク質とGroEL-ADの結合における結合様式は一定ではないのが確認された。これは、3つの標的タンパク質とGroEL-ADとの結合機構における異なる凝集機構が反映されていると考えられる。

GroELは、細胞内ストレスにより一時的に蓄積したアンフォールドタンパク質分子への疎水的感受性がよく知られている。GroELのアピカルドメインは、これらの分子を区別し、結合する疎水性センサーとして働くドメインであるのが立証されている(図4-1, ヘリックスH, I)。本章ではさらに、3つのアミロイド線維化が生じる標的タンパク質に対する疎水性効果への寄与を示した。線維化タンパク質における疎水性の役割は、BSAをコントロールとした実験においてより詳細に確認された(図4-6)。BSAは、標的タンパク質に対して影響がない脂質と結合し、血流を通して様々な栄養となる分子を輸送する血清タンパク質である。BSAは、A β 1-42, α -Synuclein, GroESの線維形成において影響を及ぼしているようにみられるが、等濃度のGroEL-ADを添加した条件と比較してその影響は弱い(図4-6)。このコントロール実験において、GroESでは核形成に、A β 1-42では形成される線維の形態が著しく変化しているように、BSAはそれぞれの標的タンパク質の線維形成に対し異なる影響を及ぼしている。この結果より、アミロイド線維形成過程の核形成と線維伸長における疎水性相互作用は多種多様な様式をもっていることが示された。それに、A β 1-40の線維形成に関する以前の研究において、様々な正と負の電荷をもつ化合物を用いた線維化における静電相互作用が関与していることも報告されており、疎水性相互作用だけが線維化を調整しているのではないと考えられる(115,116)。外因による刺激への感受性に対するタンパク質の線維化には多くの相互作用が関与している。これは、タンパク質とタンパク質の相互作用による線維化のNMRや質量分析などの原子レベルにおける分析より明らかとなるであろう。

第 5 章 総合考察

本研究では、第 2 章で GroEL G192X 変異体によるシャペロニン機能解析、第 3 章で GroEL G192X を用いた天然変性タンパク質の相互作用とアミロイド線維形成への関与について、第 4 章では GroEL のアピカルドメインを単離した GroEL-AD を用いて、アミロイド線維形成への関与を評価した。本章では以上の結果をふまえて、GroEL におけるアピカルドメインが関与しているアミロイド線維形成への重要な役割について総合考察する。

第 2 章において GroEL WT の Hinge II 部位における Gly192 残基をファンデルワールス体積に注目して様々なアミノ酸残基に置換した GroEL G192X 変異体は、大きいアミノ酸残基に置換した変異体ほどシャペロニン機能に影響を及ぼしていることを示した。そこで、5-1 にて GroEL の Hinge II 部位における Gly192 残基の役割について述べる。

さらに、第 3 章より GroEL G192X 変異体は変異体間において線維形成の異なる過程に影響を及ぼし、形成された線維の形態も変化していた。そこで、5-2 にて GroEL の Gly192 残基の変化したことによる線維形成への影響について考察する。

また、第 4 章より、GroEL-AD がアミロイド線維形成の抑制を行っているのを示した。そこで、5-3 にてアミロイド線維を形成するタンパク質に対する GroEL-AD の寄与について議論する。

5-1. Hinge II 部位に存在する Gly192 残基の GroEL における役割

GroEL の Hinge II 部位における Gly192 残基は、アミノ酸残基を変化させてもその二次構造と四次構造に大きな違いはなかった(図 2-5, 2-7)。一方で、ANS 蛍光測定による表面疎水性の解析から、Gly192 残基の置換したアミノ酸残基が大きいほど表面疎水性が高くなっていた(図 2-4)。GroEL の内部は、疎水性領域が多いとされている(16)。Gly192 残基を変化させたことで GroEL が Open 構造になり、ANS による GroEL のアピカルドメインへの結合が変化することで、ANS 蛍光強度の変化に影響していることが考えられた。*Pyrococcus*

furiosus 由来のグループ II 型シャペロニン(PfCPN)において, Gly345 残基を Asp に置換した G345D 変異体は, Co(2+)の存在下において野生型の約 25%しか ATP/ADP 加水分解活性を示さず, *in vitro* において変性 MDH のフォールディング介助の能力が減少していた(117)。Gly-345 は古細菌グループ II 型シャペロニンに高く保存されており, アピカルドメインとインターメディアイトドメインの間付近に存在している。シャペロニンは変性基質のリフォールディングを補助する際に大規模な構造変化が生じることが知られている。そのため, シャペロニンが機能を果たすにあたり, 構造変化の支点となる部位に存在するアミノ酸を置換することで, 構造変化とそれに伴う機能発現における役割を詳細に調べることができる。GroEL における Gly192 残基を変化させたことによるシャペロニン機能への影響を調べたところ, ATP の加水分解能力, MDH と Rhodanese を基質として用いたリフォールディング介助能力は, Gly192 残基を置換したアミノ酸残基が大きいほどそれぞれの活性が低下していた。Zachary W. White らは, GroEL における 3 番目の Lys を Glu 残基に置換した GroEL K3E 変異体を用いた研究において, GroEL K3E は, 単量体構造であるが, その二次構造は GroEL WT と類似しており, GroEL WT と比較し, 高い ANS 蛍光が観測された。しかし, ヌクレオチド存在下において変性基質のリフォールディングを補助することができなかった(118)。以前, Gly192 残基を最も大きいアミノ酸残基である Trp に置換した GroEL G192W 変異体は, ATP の非存在下において *cis*-ring 側に GroES が結合することを報告した(19)。GroEL G192X 変異体のシャペロニン機能解析の結果より, GroEL G192X 変異体は, Gly192 残基を置換したアミノ酸により GroES との相互作用に変化が生じていることが考えられた。QCM 法による ATP 非存在下における GroEL G192X 変異体と GroES の相互作用を解析した結果では, Gly192 を大きいアミノ酸残基に置換した変異体ほど GroES との相互作用が強いことが明らかとなった(図 2-11)。

GroEL G192X 変異体における *cis*, *trans*-ring の働きをより詳細に解析することを目的とし, *cis*-ring の機能だけをもつ GroEL のシングルリング変異体 SR-1 の Gly192 におけるアミ

ノ酸残基を置換した SR-1 G192X 変異体を用いたシャペロニン機能解析を行った。MDH のリフォールディング活性測定の結果において、シングルターンオーバー(94)が原因で活性をほとんど示さない SR-1 WT と比較して SR-1 G192V と SR-1 G192I 変異体では高い活性を示していた。以前の研究において、タンデムに繋がった GroES 7 量体におけるいくつかの GroES サブユニットを Asp 残基に置換したことで、SR-1 との相互作用は弱まるが、変性 MDH のリフォールディング活性が GroES WT よりも増加していることが報告されている(119)。さらに、GroEL と相互作用することができるサブユニットの数を変化させた GroES において、7 員環 GroES サブユニット当たり GroEL と相互作用することができるサブユニットが 5 つ存在していると GroEL WT と GroES WT と同程度のリフォールディング活性を示すことが報告されている(120)。この報告ではさらに GroES のサブユニットが隣接しているほど野生型に類似した機能を保持することが示されている。これらの報告から、基質のリフォールディングを介助するにあたり、GroEL と GroES は 7 員環同士が全て結合していない可能性も考えられる。SR-1 G192X 変異体のシャペロニン機能解析の結果より、GroEL G192X 変異体の *cis*-ring における GroES との相互作用は Gly192 残基を最も大きい Trp に置換することで完全に GroES と結合するが、それより小さいアミノ酸では完全には GroES と結合していないことが考えられる。これより、GroEL G192X 変異体における GroES との相互作用は、Gly192 残基を置換するアミノ酸残基を選択することで Open 状態のアピカルドメインを調節することで変化させることが可能になると考えられる。さらに、GroES との相互作用を変化させることで変性基質のリフォールディング介助能力も調節することが可能となると考えられた。

以上より、Gly192 残基は、GroEL が本来有している変性タンパク質のリフォールディング補助能力を決定する重要な因子であり、この Hinge II 部位に位置する残基を変化させることで GroEL のシャペロニン機能をタンパク質工学的に調整することが可能であることが示唆された。このときの考えられるシャペロニンサイクルを図 5-1 に示す。

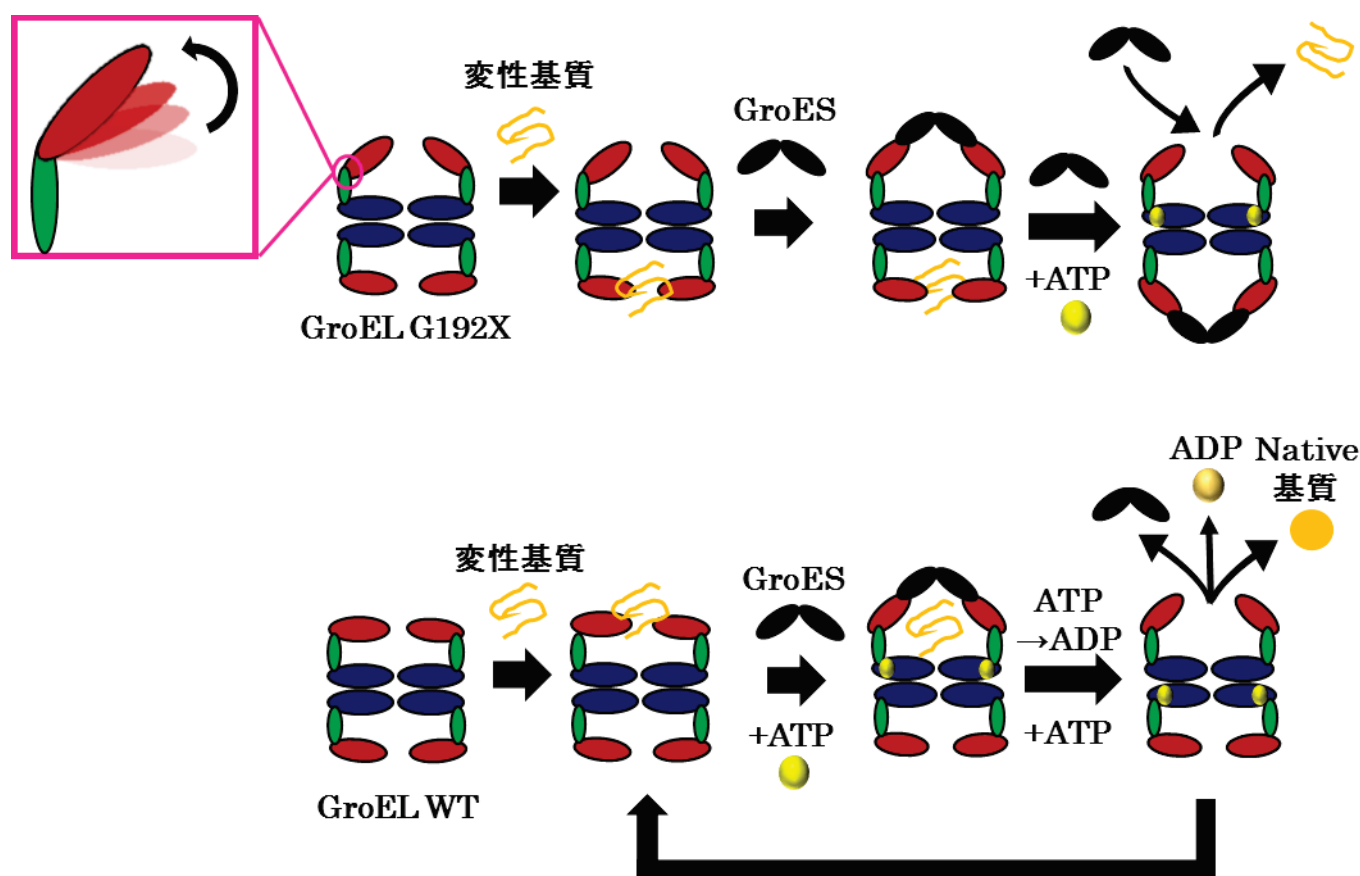


図 5-1. GroEL WT と GroEL G192X 変異体のシャペロニンサイクルの比較

上図: GroEL G192X 変異体のシャペロニンサイクル

Hinge II 部位の Gly192 残基を置換することでアピカルドメインの傾きを変化させている(■内)。

この傾きの変化は Gly192 をファンデルワールス体積により置換した残基により変化する。

GroEL G192X 変異体は、アピカルが上がっている *cis*-ring には ATP 非存在下で GroES が結合する。*trans*-ring には変性基質が結合する。その後、ATP とさらなる GroES の添加で *trans*-ring の変性基質と GroES が置き換わる。置換したアミノ酸残基によっては一部がキャビティ内に入り込んでリフォールディングの介助が行われる。

下図: GroEL WT のシャペロニンサイクル

GroEL WT は変性基質を *cis*-ring に結合させた後 ATP の存在下で GroES が結合することで、大規模な構造変化を引き起こし内部にセントラルキャビティと呼ばれる空洞を作り出し、変性基質を落とし込む。その後変性基質が存在している状態では変性基質を *trans*-ring 側に結合する。結合している ATP が ADP に加水分解されると GroES が外れ、変性基質が外に放出される。

5-2. 天然変性タンパク質のアミロイド線維形成過程における GroEL

の Hinge II 部位に存在する Gly192 残基の役割

GroEL の Hinge II 部位はアピカルドメインの動作に重要な役割を果たし、この部位に存在している Gly192 残基を他のアミノ酸残基に置換することでアピカルドメインの動きを調整できる可能性は前節で示した。GroEL のアピカルドメインでは、基質の結合部位と GroES の結合部位は類似した位置に存在している(121)。Gly192 を他のアミノ酸残基に置換したことで Open 状態になると GroEL G192X 変異体は ATP の非存在下で GroES が結合する。これにより変性状態の MDH と Rhodanese はセントラルキャビティ内に入ることができず、リフォールディングを介助できないことが示された。ANS 蛍光測定の結果において、Gly192 残基を置換したアミノ酸残基が大きいほど Open 状態となりアピカルドメインが溶液中に曝された G192X 変異体ほど表面疎水性が高くなったことから、その表面に疎水性残基を多く含んでいる天然変性タンパク質とより相互作用しやすいことが考えられた。膵臓から分泌されるペプチドホルモンの一つであるインスリンは、アミロイド線維研究のモデルタンパク質としてされている(122)。これまで、グループ II 型シャペロニンに属する超高熱性の古細菌由来のシャペロニン(HSP60)の C 末端における柔軟性が増加し、高温条件下でなくとも高い活性を示す変異体において、インスリンが形成する線維断片と結合し、線維を分解することが報告されている(123)。この HSP60 は ATP の存在下においてインスリン線維の Thioflavin-T 蛍光が ATP 非存在下よりも低下しており、ATP 存在下で β シートがさらに減少しているのが示されている。さらに、SHSY5Y 細胞を使用した MTT 分析において、HSP60 と ATP 存在下においてアミロイド線維は脱凝集され、線維のみと比較して特に高い毒性産物を形成した。ATP 非存在下における HSP60 はインスリン線維のみと同程度の毒性であった。ATP 存在下で HSP60 は線維の脱構築を ATP 非存在下よりも加速することで、線維より毒性が高いアモルファスな凝集と線維断片を生産することで毒性が増加していることが考えられている(124)。これより、

天然変性タンパク質の凝集における形態変化、それに関係した毒性の発現に対してシャペロニンが重要な役割を果たす可能性が考えられる。パーキンソン病の原因となるレビー小体(LB)は天然変性タンパク質 α -Synuclein が主な構成成分であるのが知られている(45)。LBにおいて α -Synuclein は HSP ファミリーと共局在化することが報告されている(125-128)。さらに、近年 α -Synuclein の凝集過程においてその凝集を HSP ファミリーが抑制する性質から、*in vitro*, *in vivo* の両方において α -Synuclein と HSP の関係性が注目されている。Thioflavin-T 蛍光測定と AFM による解析では、small HSP(sHSP)の一種である HSP27 が α -Synuclein と結合し、 α -Synuclein の成熟線維の形成を阻害することが報告されている(129)。さらに、*in vitro* において α - β -クリスタリンは、部分的にフォールディングした α -Synuclein 単量体と相互作用することにより α -Synuclein の会合を阻害する潜在能力が示されている(130)。

本研究において、GroEL G192X 変異体も Gly192 を置換したアミノ酸残基が大きいほど α -Synuclein と強く相互作用した結果、アミロイド線維形成の抑制効果が高くなるのを示した。しかし、GroEL G192X 変異体は添加する変異体の種類と添加する量により α -Synuclein が形成するアミロイド線維の形態に違いがみられた。その原因として、 α -Synuclein 単量体と GroEL の相互作用における強さが大きく関係していると考えられる。QCM 法を利用した α -Synuclein 単量体と GroEL との相互作用は、使用した GroEL の種類によって異なっていた(図 3-3)。単量体の状態における α -Synuclein と G192X 変異体の相互作用には、GroEL の Open 構造の違いが大きく関与していると考えられた。実際に、図 3-4 から数値が小さいほど結合が強いとされる解離定数 K_d を算出したところ、GroEL WT よりも GroEL G192W の値は極めて小さく、G192N, G192I 変異体は WT と G192W 変異体の間位の値を示していた(表 3-1)。この結合をより詳細に解析するために、結合速度 k_{on} , 解離速度 k_{off} を算出したところ、Gly192 残基をより大きいアミノ酸残基に置換した変異体ほど結合が速く、解離も速いという結果が得られた。また、GroEL 存在下における α -Synuclein の線維形成を測定した結

果, 192 番目のアミノ酸残基が最も小さい Gly をもつ GroEL WT は, 線維伸長の遅延に働いており, 形成した線維の形態は平らで真っ直ぐな形態のものがみられた(図 3-5, 図 3-7)。これに対し, 最も大きいアミノ酸残基である Trp に置換した GroEL G192W 変異体では, 線維核自体の形成を抑制しており, 形成した線維は従来の線維よりも短く, 細いねじれの形態となっていた。これらの間に位置する GroEL G192N は GroEL WT に, GroEL G192I は GroEL G192W に類似した線維形成過程を示し, 形成された線維は平らで真っ直ぐな形態と細いねじれの形態の線維が混合しているようにみられた。また, α -Synuclein の線維形成過程における異なる時間つまり, 異なる段階で GroEL G192X 変異体を添加した結果から, 0 時間, 3 時間の GroEL の添加で, 線維核の形成が抑えられていた(図 3-9, 図 3-10)。これに対し, 24 時間における GroEL の添加では変化が生じていないことから, 形成されたアミロイド線維に GroEL は影響を及ぼさないと考えられた。8 時間において GroEL を添加すると線維伸長の遅延に働いていることから, 線維核自体には影響しないが, 線維核に結合する単量体の α -Synuclein と相互作用していることが考えられた。GroEL による α -Synuclein のアミロイド線維形成に対する抑制効果は, GroEL のアピカルドメインと線維形成過程における α -Synuclein との結合の速さに関係していると考えられる。192 番目のアミノ酸残基が最も小さい GroEL WT は α -Synuclein との結合が遅く, 相互作用するまでにアミロイド線維形成過程が凝集中間体や線維核の形成まで進んでしまい, GroEL WT は線維伸長において線維核に結合する単量体に相互作用することが線維伸長の遅延に繋がっていると考えられる。その一方で, G192X 変異体は, α -Synuclein との結合が速く, 単量体や凝集中間体と結合することが線維核形成の抑制に繋がったと考えられた。また, GroEL WT 存在下で形成されたアミロイド線維の TEM 画像において, 他の GroEL と比べて多くの GroEL が存在し, さらに, 線維上にも存在しているようにもみられる。これより, 一度 GroEL WT に結合した α -Synuclein 単量体は離れるのが遅いが, キャビティ内部には落とし込まれず, 外側を向いた状態で結合しており, この状態で線維伸長に関与していくことも考えられた。この際に形成さ

れたアミロイド線維は平らで直線状のものになる。一方で、G192W 変異体は、速く α -Synuclein と結合できるため、単量体や凝集中間体との相互作用により線維核の形成を遅らせるが、その後 GroEL から解離した単量体や凝集中間体は線維核の形成や線維伸長に関与することが考えられる。G192N や G192I は G192W 変異体と比較し、完全な Open 構造ではないことが、 α -Synuclein の線維形成に関係して、細いねじれた形態の線維に混じり平らで直線状のものもみられるようになったことが考えられた。

HSP70 において、 α -Synuclein の線維伸長段階の前に相互作用することで会合を停止する(83)。ADP が結合した HSP70 は、 α -Synuclein と高い共凝集傾向を示す(131)。HSP90 は ATP 非存在下で、 α -Synuclein の線維形成を阻害し、オリゴマーの蓄積を促進する。その一方で、ATP 存在下では線維の形成を促進する(80)。これより、HSP90 は HSP70 による α -Synuclein への働きと反対の作用を示すと分かる。以上のことから、HSP は α -Synuclein のアミロイド線維形成を抑制するのに、ヌクレオチドによる影響が大きく関与していると考えられるが、HSP70 は α -Synuclein の凝集形成において ATP 結合部位を欠損させた変異体は、ATP 非存在下において線維形成を抑制することが報告されている(84)。GroEL G192X 変異体を用いた α -Synuclein のアミロイド線維形成の抑制効果においても ATP は要求されなかった。これは、Gly192 残基を大きいアミノ酸残基に置換したことで、ATP の非存在下において GroEL WT の ATP 存在下のような Open 構造となったことが関与していると考えられる。

以上のことより、GroEL の変性基質の認識し、相互作用するアピカルドメインがアミロイド線維形成の抑制に強く関与していることが考えられた。図 5-2 に本研究における結果から考えられる GroEL G192X 変異体の α -Synuclein に対するアミロイド線維形成機構における抑制効果のモデルを示す。

GroEL G192X

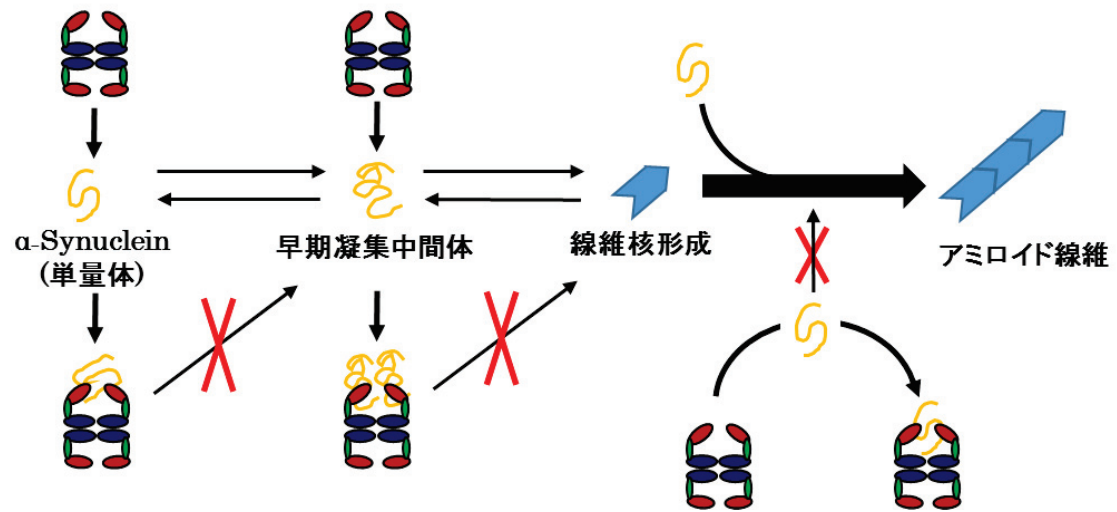


図 5-2. GroEL G192X 変異体による α -Synuclein の凝集抑制機構

α -Synuclein 単量体は、天然状態で変性しているが、その後凝集して線維核を形成する。この線維核に対して α -Synuclein 単量体が結合していき線維の伸長が起こる。線維が伸長していくことでアミロイド線維となる。これに対して GroEL G192X 変異体は、 α -Synuclein 単量体又は凝集中間体に結合し、線維核の形成を妨げる。さらに、線維伸長における線維核に結合していく α -Synuclein 単量体に結合することで線維の伸長を阻害する。

5-3. GroEL アピカルドメインによるアミロイド線維形成の抑制

GroEL G192X 変異体を用いた α -Synuclein のアミロイド線維形成抑制効果より, GroEL のアピカルドメインが抑制に影響していることが考えられた。NMR を用いた研究において, A β 1-40 と α -Synuclein は GroEL のアピカルドメインにおける特異的な部位に結合することが示されている(104,105)。さらに, GroEL-AD 単独で β_2 -ミクログロブリンの線維形成も抑制することが報告されている(87)。そこで, 本研究では α -Synuclein, A β 1-42, GroES に対する GroEL のアピカルドメインを単離した GroEL-AD によるアミロイド線維形成の抑制効果について検証した。QCM 法を利用した解析において, α -Synuclein と GroES では GroEL-AD と異なる相互作用をしているようにみられた(図 4-8)。GroES は, 濃度依存的な相互作用を示していたが, α -Synuclein においては見かけ上異なる 2 つの結合方法が存在していることが考えられた。図 4-7 で示したように, アミロイド線維形成の開始, 核形成, 線維伸長のどの段階においても GroES 又は α -Synuclein を添加することで更なる線維伸長を阻害していることが観測された。そのため, GroEL-AD による各標的タンパク質の線維形成抑制機構に関する性質に大きな違いはないと考えられた。しかし, QCM 法による GroEL-AD と GroES 又は α -Synuclein の相互作用解析において, GroES と α -Synuclein ではその結合方法に違いがみられた。これは, アピカルドメインにおける標的タンパク質への認識が反映されていると考えられた。 α -Synuclein は特定の構造を持たない天然変性タンパク質である。GroES は変性すると単量体構造をとり, そこからアミロイド線維の形成に繋がっていく(110)。しかし, GroES はそもそも GroEL のコシャペロニンであり, GroEL のアピカルドメインには GroES の結合部位が存在している。そのため, 変性条件下でモノマーに解離した GroES は線維形成が生じる前に GroEL-AD の GroES 結合部位と相互作用することができるので, 他の標的タンパク質より相互作用しやすいことが考えられる。QCM 法による GroEL-AD と変性条件下での GroES との相互作用解析の結果から算出した K_d の数値が, GroEL-AD と α -Synuclein の数値よりも小さいことから, 結合が強いことが考えられる。つまり, GroEL-AD は α -

Synuclein よりも GroES との相互作用が強いことがわかる。また, GroEL WT は ATP 非存在下では Closed 状態であるために, GroEL G192W 変異体のようにアピカルドメインの疎水性部位が溶液中に曝されていない。これにより GroEL WT は α -Synuclein と相互作用することができないので, α -Synuclein の凝集抑制効果についての報告が少ないことが考えられる。しかし, GroEL-AD は α -Synuclein の線維形成を抑制していることから, 相互作用することは可能であるのが示された。このように, GroEL-AD は標的とするタンパク質により認識と結合の方法に違いがあると考えられた。

ミニシャペロン GroEL(193-335 残基)は, *in vitro* において GroEL 全長の機能には劣るが, 変性 Rhodanese のリフォールディングを介助することが報告されている(85)。本研究においても, GroEL-AD 単独で様々なタンパク質の線維形成に対する抑制効果を示した。そこで, GroEL-AD 単独とリング構造を形成している GroEL G192X 変異体によるアミロイド線維形成に対する抑制効果を比較し, どちらがより効率的なのかを検討した。第 3 章で示したように GroEL G192X 変異体存在下における α -Synuclein の線維形成への影響より, GroEL G192X 変異体は単量体換算でモル比 0.2 倍量を添加しても高い抑制効果が示された(図 3-5, 図 3-7)。これに対し, GroEL-AD 存在下における α -Synuclein の線維形成への影響では, 単量体換算でモル比 0.5 倍量を添加しても大きな変化はみられなかった(図 4-4)。さらに, QCM 法における α -Synuclein 単量体と GroEL G192X 変異体との相互作用解析の結果より算出したカイネティックパラメーターの数値は, 192 番目のアミノ酸残基が最も小さい Gly をもつ GroEL WT において, K_d は 3.1×10^{-8} M, k_{on} は 2.6×10^4 M⁻¹・s⁻¹, k_{off} は 7.98×10^{-4} s⁻¹ の数値が得られた(表 3-1)。これに対し, α -Synuclein 単量体と GroEL-AD との相互作用解析の結果より算出した 2 つの様式(k_{obs}^{Fast} , k_{obs}^{Slow})におけるカイネティックパラメーターの数値のいずれも K_d の数値は大きく, さらに, k_{on} は小さく, k_{off} は大きかった(表 4-2)。つまり, Open 構造ではなく, アピカルドメインが溶液中に曝されていないと考えられる GroEL WT よりも GroEL-AD は相互作用が弱く, 結合速度は遅く, 解離速度は速いという結

果が得られた。以上のことより、 α -Synuclein 単量体は GroEL-AD よりも GroEL G192X 各変異体と相互作用しやすく、線維形成における抑制効果も高いことが明らかとなった。これは、GroEL G192X 変異体は、リング構造においてアピカルドメインが隣り合うことで、 α -Synuclein の単量体や凝集中間体がより相互作用しやすくなっていることが考えられる。今後さらに詳細な研究を行うことで、GroEL G192X 変異体は α -Synuclein のアミロイド凝集に対する抑制において、GroEL-AD 以上に有効な手段となることが考えられる。しかし、生細胞など生体内の環境により近い条件において研究を行うにあたり、GroEL 全長では分子量が 800 kDa と大きいため使用条件が大きく制限されてしまうことが考えられる。これに対し、GroEL-AD は分子量が 22 kDa と小さいので、利用しやすいことが期待される。本研究より、GroEL-AD 単独でも凝集や線維形成が生じるタンパク質の構造変化を検知し、それ以上凝集を引き起こさない「ミニシャペロン」としての効果が今後期待できると考えられる。アピカルドメインが溶液中に曝されている GroEL G192X 変異体はアミロイド線維形成を抑制する効果が示された。また、GroEL-AD 単独でも多くのアミロイド線維形成を抑制する効果を示した。これより、アピカルドメインは線維形成を抑制する効果をもつことが明らかとなった。図 5-3 に本研究における結果から考えられる GroEL-AD の標的タンパク質に対するアミロイド線維形成機構における抑制効果のモデルを示す。

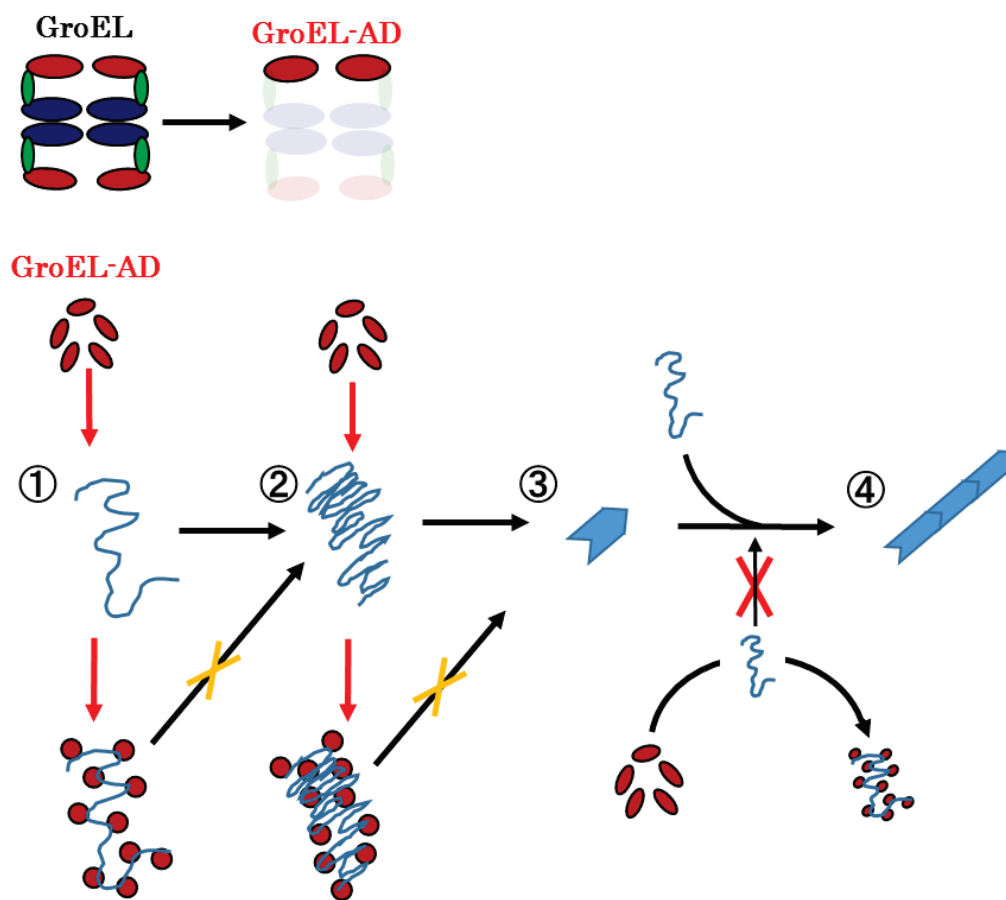


図 5-3. GroEL-AD によるアミロイド線維の凝集抑制機構

①アミロイド凝集タンパク質単量体:

アミロイド線維機構を形成するタンパク質は、単量体の状態において、GroEL-AD が存在することで凝集中間体(②)の形成が抑制される。

②アミロイド凝集中間体:

凝集中間体状態においても GroEL-AD が結合することで線維核(③)の形成を阻害する。

③アミロイド線維核形成: 形成された線維核に対して単量体が結合していくことで線維伸長がおこる。

このとき、線維核に結合する単量体と GroEL-AD が結合することにより線維の伸長を抑制する結果、アミロイド線維(④)の形成が阻害される。

④アミロイド線維

第 6 章 結語

近年神経変性疾患と呼ばれる治療が困難な病気の発症において生体内に存在している多くの天然変性タンパク質の凝集が関与しているとされている。そのため、依然として明らかになっていない天然変性タンパク質の凝集経路の解明及び凝集の抑制効果に対する研究において分子シャペロンの関与は今後さらに重要になることが期待される。本研究では大腸菌由来のシャペロニン GroEL による天然変性タンパク質の凝集抑制機構に注目した研究を行った。第 2 章 GroEL における Hinge II 部位に存在している Gly192 残基の重要性を明らかにした。さらに第 3, 4 章の結果より、天然変性タンパク質の凝集抑制機構において GroEL に存在するアピカルドメインが特に重要な役割を果たしていることを示した。

GroEL は ATP 存在下において GroES がアピカルドメインに結合することで大規模な構造変化を引き起こし内部にセントラルキャビティと呼ばれる空洞を作り出し、ここに変性タンパク質を取り込みリフォールディングの介助を行う。この際構造変化を引き起こす支点となるのが各ドメイン間に存在する 2 つの Hinge 部位である。その内の 1 つである Hinge II 部位に存在する Gly192 残基をファンデルワールス体積に注目して様々なアミノ酸残基に変化させた GroEL G192X 変異体を作製し、そのシャペロニン機能の解析を行った。その結果、GroEL G192X 変異体はアミノ酸側鎖が大きくなるにつれてアピカルドメインの動作が抑制されていた。これより、Gly192 におけるアミノ酸残基を変化させることで GroEL の全体的な構造とシャペロニン機能の調整に繋がることが推測された。

さらに、Gly192 を他のアミノ酸残基に置換したことで Open 構造をとっている GroEL G192X 変異体による天然変性タンパク質との相互作用を調べた。その結果、A β 1-40 又は α -Synuclein との相互作用は Gly192 を置換したアミノ酸残基が大きくなるにつれて増加していることを発見した。さらに、 α -Synuclein の線維化におけるいくつかの GroEL G192X 変異体及び GroEL WT 存在下における影響を比較したところ、GroEL G192X 変異体は、線

維形成を非常に強く抑制していた。このとき形成された線維も GroEL 変異体存在下では形態が異なることも確認された。

さらに、 α -Synuclein の線維形成段階における異なる段階での GroEL の添加は、G192X 変異体と GroEL WT では異なる様相を示した。これより、 α -Synuclein の線維形成機構において GroEL WT と G192X 変異体とで異なった段階に寄与していることが考えられた。この機構において特に重要と考えられたのが、GroEL の先端に位置するアピカルドメインである。アピカルドメインの主な機能は変性基質の認識と結合、さらにコシャペロニンである GroES との結合である。アピカルドメインは基質の疎水性、形態等の様々な要因を認識して結合することが可能である。そのため、GroEL WT よりも Hinge II 部位に位置している Gly192 残基を置換したことでアピカルドメインが Open 構造をとり、より溶媒中に曝されるようになった G192X 変異体は天然変性タンパク質でさえも認識し、結合を行ったことが凝集形成に影響を及ぼしていることが考えられた。そこで、このことを立証するために、GroEL のアピカルドメインだけを単独に切り離した GroEL-AD によるアミロイド線維形成機構への関与を解析した。この結果では、GroEL-AD は、 α -Synuclein, GroES, A β 1-42 と変性機構、性質が異なるタンパク質を標的として凝集を抑制したことから、GroEL-AD は他の多くの神経変性疾患の発症に係っているタンパク質を標的とした抑制効果も期待できることが示された。

本研究における GroEL による天然変性タンパク質の凝集抑制効果に対する結果は、病気の治療における知見に大いに貢献できると考えられる。GroEL は細菌由来のタンパク質であるが、ヒトや動物においては GroEL のホモログである HSP60 が存在している。そこで、今後は HSP60 における天然変性タンパク質の凝集経路の解明及び凝集抑制効果の検討により現在は確立されていない多くの神経変性疾患に対する有用な治療方法となることが期待されるであろう。

引用文献

1. Anfinsen, Christian B. (1973) Principles that Govern the Folding of Protein Chains. *SCIENCE* **181**, 223-230
2. Tissieres, A., Mitchell, H. K., and Tracy, U. M. (1974) Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. *J Mol Biol* **84**, 389-398
3. Ellis, J. (1987) Proteins as molecular chaperones. *Nature* **328**, 378-379
4. Bukau, B., Deuerling, E., Pfund, C., and Craig, E. A. (2000) Getting newly synthesized proteins into shape. *Cell* **101**, 119-122
5. Goloubinoff, P., Gatenby, A. A., and Lorimer, G. H. (1989) GroE heat-shock proteins promote assembly of foreign prokaryotic ribulose biphosphate carboxylase oligomers in *Escherichia coli*. *Nature* **337**, 44-47
6. Booth, C. R., Meyer, A. S., Cong, Y., Topf, M., Sali, A., Ludtke, S. J., Chiu, W., and Frydman, J. (2008) Mechanism of lid closure in the eukaryotic chaperonin TRiC/CCT. *Nat Struct Mol Biol* **15**, 746-753
7. Braig, K., Otwinowski, Z., Hegde, R., Boisvert, D. C., Joachimiak, A., Horwich, A. L., and Sigler, P. B. (1994) The crystal structure of the bacterial chaperonin GroEL at 2.8 Å. *Nature* **371**, 578-586
8. Skjaerven, L., Cuellar, J., Martinez, A., and Valpuesta, J. M. (2015) Dynamics, flexibility, and allostery in molecular chaperonins. *FEBS Lett* **589**, 2522-2532
9. Roseman, A. M., Chen, S., White, H., Braig, K., and Saibil, H. R. (1996) The chaperonin ATPase cycle: mechanism of allosteric switching and movements of substrate-binding domains in GroEL. *Cell* **87**, 241-251
10. Wayne A.Fenton , Yechezkei Kashi , Krystyna & Arthur L.Horwich. (1994) Residue in chaperonin GroEL required for polypeptide binding and release. *Nature* **371**, 614-619
11. Kawata, Yasushi, Kawagoe, Masashi, Hongo, Kunihiro, Miyazaki, Takuya, Higurashi, Takashi, Mizobata, Tomohiro, and Nagai, Jun. (1999) Functional Communications between the Apical and Equatorial Domains of GroEL through the Intermediate Domain†. *Biochemistry* **38**, 15731-15740
12. John F.Hunt , Arthur J.Weaver , Samuel J.Landry , Lila Gierasch & Johann Deisenhofer. (1996) The crystal structure of the GroES co-chaperonin at 2.8 Å resolution. *Nature* **379**, 37-45

13. Manajit K.Hayer-Hartl, Frank Weber and F.Ulrich Hartl. (1996) Mechanism of chaperonin action: GroES binding and release can drive GroEL-mediated protein folding in the absence of ATP hydrolysis. *EMBO J* **15**, 6111-6121
14. Zhaohui Xu , Arthur L.Horwich & Paul B.Sigler. (1997) The crystal structure of the assymmetric GroEL-GroES-(ADP)₇ chaperonin complex. *Nature* **388**, 741-750
15. Sakikawa, C., Taguchi, H., Makino, Y., and Yoshida, M. (1999) On the maximum size of proteins to stay and fold in the cavity of GroEL underneath GroES. *J Biol Chem* **274**, 21251-21256
16. Ranson, N. A., Clare, D. K., Farr, G. W., Houldershaw, D., Horwich, A. L., and Saibil, H. R. (2006) Allosteric signaling of ATP hydrolysis in GroEL-GroES complexes. *Nat Struct Mol Biol* **13**, 147-152
17. Ueno, Taro, Taguchi, Hideki, Tadakuma, Hisashi, Yoshida, Masasuke, and Funatsu, Takashi. (2004) GroEL Mediates Protein Folding with a Two Successive Timer Mechanism. *Molecular Cell* **14**, 423-434
18. Burston, S. G., Weissman, J. S., Farr, G. W., Fenton, W. A., and Horwich, A. L. (1996) Release of both native and non-native proteins from a cis-only GroEL ternary complex. *Nature* **383**, 96-99
19. Machida, K., Fujiwara, R., Tanaka, T., Sakane, I., Hongo, K., Mizobata, T., and Kawata, Y. (2009) Gly192 at hinge 2 site in the chaperonin GroEL plays a pivotal role in the dynamic apical domain movement that leads to GroES binding and efficient encapsulation of substrate proteins. *Biochim Biophys Acta* **1794**, 1344-1354
20. Sameshima, T., Ueno, T., Iizuka, R., Ishii, N., Terada, N., Okabe, K., and Funatsu, T. (2008) Football- and bullet-shaped GroEL-GroES complexes coexist during the reaction cycle. *J Biol Chem* **283**, 23765-23773
21. Rye, H. S., Burston, S. G., Fenton, W. A., Beechem, J. M., Xu, Z., Sigler, P. B., and Horwich, A. L. (1997) Distinct actions of cis and trans ATP within the double ring of the chaperonin GroEL. *Nature* **388**, 792-798
22. Koike-Takeshita, A., Yoshida, M., and 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**, 23774-23781
23. Koike-Takeshita, A., Arakawa, T., Taguchi, H., and Shimamura, T. (2014) Crystal structure of a symmetric football-shaped GroEL:GroES2-ATP14 complex determined at 3.8Å reveals rearrangement between two GroEL rings. *J Mol Biol* **426**, 3634-3641

24. Motojima, F., and Yoshida, M. (2010) Polypeptide in the chaperonin cage partly protrudes out and then folds inside or escapes outside. *EMBO J* **29**, 4008-4019
25. Motojima, F., and Yoshida, M. (2015) Productive folding of a tethered protein in the chaperonin GroEL-GroES cage. *Biochem Biophys Res Commun* **466**, 72-75
26. Glenner, G. G. (1980) Amyloid deposits and amyloidosis: the beta-fibrilloses (second of two parts). *The New England journal of medicine* **302**, 1333-1343
27. Westermarck, P. (1998) The pathogenesis of amyloidosis: understanding general principles. *The American journal of pathology* **152**, 1125-1127
28. Hammer, N. D., Wang, X., McGuffie, B. A., and Chapman, M. R. (2008) Amyloids: friend or foe? *Journal of Alzheimer's disease : JAD* **13**, 407-419
29. Jarrett, J. T., and Lansbury, P. T., Jr. (1993) Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? *Cell* **73**, 1055-1058
30. Klunk, W. E., Jacob, R. F., and Mason, R. P. (1999) Quantifying amyloid by congo red spectral shift assay. *Methods in enzymology* **309**, 285-305
31. LeVine, H., 3rd. (1993) Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease beta-amyloid peptides: detection of amyloid aggregation in solution. *Protein Sci* **2**, 404-410
32. Guijarro, J. I., Sunde, M., Jones, J. A., Campbell, I. D., and Dobson, C. M. (1998) Amyloid fibril formation by an SH3 domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 4224-4228
33. Sunde, M., Serpell, L. C., Bartlam, M., Fraser, P. E., Pepys, M. B., and Blake, C. C. (1997) Common core structure of amyloid fibrils by synchrotron X-ray diffraction. *J Mol Biol* **273**, 729-739
34. Cascio, M., Glazer, P. A., and Wallace, B. A. (1989) The secondary structure of human amyloid deposits as determined by circular dichroism spectroscopy. *Biochem Biophys Res Commun* **162**, 1162-1166
35. Zako, T., Sakono, M., Hashimoto, N., Ihara, M., and Maeda, M. (2009) Bovine insulin filaments induced by reducing disulfide bonds show a different morphology, secondary structure, and cell toxicity from intact insulin amyloid fibrils. *Biophys J* **96**, 3331-3340
36. Iwasa, H., Kameda, H., Fukui, N., Yoshida, S., Hongo, K., Mizobata, T., Kobayashi, S., and Kawata, Y. (2013) Bilberry anthocyanins neutralize the cytotoxicity of co-chaperonin GroES fibrillation intermediates. *Biochemistry* **52**, 9202-9211
37. Kocisko, D. A., Baron, G. S., Rubenstein, R., Chen, J., Kuizon, S., and Caughey,

- B. (2003) New inhibitors of scrapie-associated prion protein formation in a library of 2000 drugs and natural products. *Journal of virology* **77**, 10288-10294
38. Yang, F., Lim, G. P., Begum, A. N., Ubeda, O. J., Simmons, M. R., Ambegaokar, S. S., Chen, P. P., Kaye, R., Glabe, C. G., Frautschi, S. A., and Cole, G. M. (2005) Curcumin inhibits formation of amyloid beta oligomers and fibrils, binds plaques, and reduces amyloid in vivo. *J Biol Chem* **280**, 5892-5901
 39. Zhu, M., Rajamani, S., Kaylor, J., Han, S., Zhou, F., and Fink, A. L. (2004) The flavonoid baicalein inhibits fibrillation of alpha-synuclein and disaggregates existing fibrils. *J Biol Chem* **279**, 26846-26857
 40. Chattopadhyay, M., Durazo, A., Sohn, S. H., Strong, C. D., Gralla, E. B., Whitelegge, J. P., and Valentine, J. S. (2008) Initiation and elongation in fibrillation of ALS-linked superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 18663-18668
 41. Mold, M., Ouro-Gnao, L., Wieckowski, B. M., and Exley, C. (2013) Copper prevents amyloid-beta(1-42) from forming amyloid fibrils under near-physiological conditions in vitro. *Sci Rep* **3**, 1256
 42. Bocharova, O. V., Breydo, L., Salnikov, V. V., and Baskakov, I. V. (2005) Copper(II) inhibits in vitro conversion of prion protein into amyloid fibrils. *Biochemistry* **44**, 6776-6787
 43. Lauren, J., Gimbel, D. A., Nygaard, H. B., Gilbert, J. W., and Strittmatter, S. M. (2009) Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid-beta oligomers. *Nature* **457**, 1128-1132
 44. Mizuno, Y., Hattori, N., Kubo, S., Sato, S., Nishioka, K., Hatano, T., Tomiyama, H., Funayama, M., Machida, Y., and Mochizuki, H. (2008) Progress in the pathogenesis and genetics of Parkinson's disease. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* **363**, 2215-2227
 45. Spillantini, M. G., Schmidt, M. L., Lee, V. M., Trojanowski, J. Q., Jakes, R., and Goedert, M. (1997) Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature* **388**, 839-840
 46. Iwaki, T., Wisniewski, T., Iwaki, A., Corbin, E., Tomokane, N., Tateishi, J., and Goldman, J. E. (1992) Accumulation of alpha B-crystallin in central nervous system glia and neurons in pathologic conditions. *The American journal of pathology* **140**, 345-356
 47. McLean, P. J., Kawamata, H., Shariff, S., Hewett, J., Sharma, N., Ueda, K., Breakefield, X. O., and Hyman, B. T. (2002) TorsinA and heat shock proteins act as molecular chaperones: suppression of alpha-synuclein aggregation. *J Neurochem* **83**, 846-854

48. A, Iwai. , E, Masliah., M, Yoshimoto., N, Ge., L, Fianagan. , H. A, Rohan de Silva., A Kittei, and and T, Saitoh. (1995) The Precursor Protein of Non-Ap Component of Alzheimer's Disease Amyloid Is a Presynaptic Protein of the Central Nervous System. *Neuron* **14**, 467-475
49. Kessler, J. C., Rochet, J. C., and Lansbury, P. T., Jr. (2003) The N-terminal repeat domain of alpha-synuclein inhibits beta-sheet and amyloid fibril formation. *Biochemistry* **42**, 672-678
50. Ulmer, T. S., Bax, A., Cole, N. B., and Nussbaum, R. L. (2005) Structure and dynamics of micelle-bound human alpha-synuclein. *J Biol Chem* **280**, 9595-9603
51. Waxman, E. A., Mazzulli, J. R., and Giasson, B. I. (2009) Characterization of hydrophobic residue requirements for alpha-synuclein fibrillization. *Biochemistry* **48**, 9427-9436
52. Du, H. N., Tang, L., Luo, X. Y., Li, H. T., Hu, J., Zhou, J. W., and Hu, H. Y. (2003) A peptide motif consisting of glycine, alanine, and valine is required for the fibrillization and cytotoxicity of human alpha-synuclein. *Biochemistry* **42**, 8870-8878
53. El-Agnaf, O. M., Jakes, R., Curran, M. D., Middleton, D., Ingenito, R., Bianchi, E., Pessi, A., Neill, D., and Wallace, A. (1998) Aggregates from mutant and wild-type alpha-synuclein proteins and NAC peptide induce apoptotic cell death in human neuroblastoma cells by formation of beta-sheet and amyloid-like filaments. *FEBS Lett* **440**, 71-75
54. Rodriguez, J. A., Ivanova, M. I., Sawaya, M. R., Cascio, D., Reyes, F. E., Shi, D., Sangwan, S., Guenther, E. L., Johnson, L. M., Zhang, M., Jiang, L., Arbing, M. A., Nannenga, B. L., Hattne, J., Whitelegge, J., Brewster, A. S., Messerschmidt, M., Boutet, S., Sauter, N. K., Gonen, T., and Eisenberg, D. S. (2015) Structure of the toxic core of alpha-synuclein from invisible crystals. *Nature* **525**, 486-490
55. Murray, I. V., Giasson, B. I., Quinn, S. M., Koppaka, V., Axelsen, P. H., Ischiropoulos, H., Trojanowski, J. Q., and Lee, V. M. (2003) Role of alpha-synuclein carboxy-terminus on fibril formation in vitro. *Biochemistry* **42**, 8530-8540
56. Fujiwara, H., Hasegawa, M., Dohmae, N., Kawashima, A., Masliah, E., Goldberg, M. S., Shen, J., Takio, K., and Iwatsubo, T. (2002) alpha-Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions. *Nature cell biology* **4**, 160-164
57. Jie Li, Vladimir N. Uversky, and Anthony L. Fink. (2001) Effect of Familial Parkinson's Disease Point Mutations A30P and A53T on the Structural Properties , Aggregation , and Fibrillation of Human alpha-Synuclein.

- Biochemistry* **40**, 11604-11613
58. Souza, J. M., Giasson, B. I., Lee, V. M., and Ischiropoulos, H. (2000) Chaperone-like activity of synucleins. *FEBS Lett* **474**, 116-119
 59. Nielsen, S. B., Macchi, F., Raccosta, S., Langkilde, A. E., Giehm, L., Kyrsting, A., Svane, A. S., Manno, M., Christiansen, G., Nielsen, N. C., Oddershede, L., Vestergaard, B., and Otzen, D. E. (2013) Wildtype and A30P mutant alpha-synuclein form different fibril structures. *PLoS One* **8**, e67713
 60. Zarranz, J. J., Alegre, J., Gomez-Esteban, J. C., Lezcano, E., Ros, R., Ampuero, I., Vidal, L., Hoenicka, J., Rodriguez, O., Atares, B., Llorens, V., Gomez Tortosa, E., del Ser, T., Munoz, D. G., and de Yebenes, J. G. (2004) The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Ann Neurol* **55**, 164-173
 61. Choi, W., Zibae, S., Jakes, R., Serpell, L. C., Davletov, B., Crowther, R. A., and Goedert, M. (2004) Mutation E46K increases phospholipid binding and assembly into filaments of human alpha-synuclein. *FEBS Lett* **576**, 363-368
 62. Khalaf, O., Fauvet, B., Oueslati, A., Dikiy, I., Mahul-Mellier, A. L., Ruggeri, F. S., Mbefo, M. K., Vercruysse, F., Dietler, G., Lee, S. J., Eliezer, D., and Lashuel, H. A. (2014) The H50Q mutation enhances alpha-synuclein aggregation, secretion, and toxicity. *J Biol Chem* **289**, 21856-21876
 63. Yoritaka, A., Hattori, N., Uchida, K., Tanaka, M., Stadtman, E. R., and Mizuno, Y. (1996) Immunohistochemical detection of 4-hydroxynonenal protein adducts in Parkinson disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 2696-2701
 64. Yamin, G., Glaser, C. B., Uversky, V. N., and Fink, A. L. (2003) Certain metals trigger fibrillation of methionine-oxidized alpha-synuclein. *J Biol Chem* **278**, 27630-27635
 65. Bharathi, Indi, S. S., and Rao, K. S. (2007) Copper- and iron-induced differential fibril formation in alpha-synuclein: TEM study. *Neurosci Lett* **424**, 78-82
 66. Glaser, C. B., Yamin, G., Uversky, V. N., and Fink, A. L. (2005) Methionine oxidation, alpha-synuclein and Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta* **1703**, 157-169
 67. Dell'Acqua, S., Pirota, V., Monzani, E., Camponeschi, F., De Ricco, R., Valensin, D., and Casella, L. (2016) Copper(I) Forms a Redox-Stable 1:2 Complex with alpha-Synuclein N-Terminal Peptide in a Membrane-Like Environment. *Inorg Chem* **55**, 6100-6106
 68. Sharma, M., Burre, J., and Sudhof, T. C. (2011) CSPalpha promotes SNARE-

- complex assembly by chaperoning SNAP-25 during synaptic activity. *Nature cell biology* **13**, 30-39
69. Chandra, S., Gallardo, G., Fernandez-Chacon, R., Schluter, O. M., and Sudhof, T. C. (2005) Alpha-synuclein cooperates with CSPalpha in preventing neurodegeneration. *Cell* **123**, 383-396
 70. Lee, H. J., Choi, C., and Lee, S. J. (2002) Membrane-bound alpha-synuclein has a high aggregation propensity and the ability to seed the aggregation of the cytosolic form. *J Biol Chem* **277**, 671-678
 71. Cole, N. B., Murphy, D. D., Grider, T., Rueter, S., Brasaemle, D., and Nussbaum, R. L. (2002) Lipid droplet binding and oligomerization properties of the Parkinson's disease protein alpha-synuclein. *J Biol Chem* **277**, 6344-6352
 72. Narayanan, V., and Scarlata, S. (2001) Membrane binding and self-association of alpha-synucleins. *Biochemistry* **40**, 9927-9934
 73. Zhu, M., and Fink, A. L. (2003) Lipid binding inhibits alpha-synuclein fibril formation. *J Biol Chem* **278**, 16873-16877
 74. Horwitz, J. (1992) Alpha-crystallin can function as a molecular chaperone. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 10449-10453
 75. Renkawek, K., Voorter, C. E., Bosman, G. J., van Workum, F. P., and de Jong, W. W. (1994) Expression of alpha B-crystallin in Alzheimer's disease. *Acta neuropathologica* **87**, 155-160
 76. Renkawek, K., de Jong, W. W., Merck, K. B., Frenken, C. W., van Workum, F. P., and Bosman, G. J. (1992) alpha B-crystallin is present in reactive glia in Creutzfeldt-Jakob disease. *Acta neuropathologica* **83**, 324-327
 77. Glover, J. R., and Lindquist, S. (1998) Hsp104, Hsp70, and Hsp40: a novel chaperone system that rescues previously aggregated proteins. *Cell* **94**, 73-82
 78. Wegrzyn, R. D., Bapat, K., Newnam, G. P., Zink, A. D., and Chernoff, Y. O. (2001) Mechanism of prion loss after Hsp104 inactivation in yeast. *Mol Cell Biol* **21**, 4656-4669
 79. Evans, C. G., Wisen, S., and Gestwicki, J. E. (2006) Heat shock proteins 70 and 90 inhibit early stages of amyloid beta-(1-42) aggregation in vitro. *J Biol Chem* **281**, 33182-33191
 80. Falsone, S. F., Kungl, A. J., Rek, A., Cappai, R., and Zangger, K. (2009) The molecular chaperone Hsp90 modulates intermediate steps of amyloid assembly of the Parkinson-related protein alpha-synuclein. *J Biol Chem* **284**, 31190-31199
 81. Daturpalli, S., Waudby, C. A., Meehan, S., and Jackson, S. E. (2013) Hsp90

- inhibits alpha-synuclein aggregation by interacting with soluble oligomers. *J Mol Biol* **425**, 4614-4628
82. Klucken, J., Shin, Y., Masliah, E., Hyman, B. T., and McLean, P. J. (2004) Hsp70 Reduces alpha-Synuclein Aggregation and Toxicity. *J Biol Chem* **279**, 25497-25502
 83. Dedmon, M. M., Christodoulou, J., Wilson, M. R., and Dobson, C. M. (2005) Heat shock protein 70 inhibits alpha-synuclein fibril formation via preferential binding to prefibrillar species. *J Biol Chem* **280**, 14733-14740
 84. Huang, C., Cheng, H., Hao, S., Zhou, H., Zhang, X., Gao, J., Sun, Q. H., Hu, H., and Wang, C. C. (2006) Heat shock protein 70 inhibits alpha-synuclein fibril formation via interactions with diverse intermediates. *J Mol Biol* **364**, 323-336
 85. Chatellier, J., Hill, F., Lund, P. A., and Fersht, A. R. (1998) In vivo activities of GroEL minichaperones. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 9861-9866
 86. Noi, Kentaro, Kitamura, Aya, Hirai, Hidenori, Hongo, Kunihiro, Sakurai, Toshihiko, Mizobata, Tomohiro, and Kawata, Yasushi. (2012) Suppression of Sup35 amyloid fibril formation by group II chaperonin from *Thermoplasma acidophilum*. *American Journal of Molecular Biology* **02**, 265-275
 87. Chen, J., Yagi, H., Sormanni, P., Vendruscolo, M., Makabe, K., Nakamura, T., Goto, Y., and Kuwajima, K. (2012) Fibrillogenic propensity of the GroEL apical domain: a Janus-faced minichaperone. *FEBS Lett* **586**, 1120-1127
 88. Sakane, I., Hongo, K., Mizobata, T., and Kawata, Y. (2009) Mechanical unfolding of covalently linked GroES: evidence of structural subunit intermediates. *Protein Sci* **18**, 252-257
 89. Jonathan S.Weissman , Corinne M.Hohl , Oleg Kovalenko , Yechezkel Kashi , Shaoxia Chen , Kerstin Braig , Helen R.Saibil , Wayne A.Fenton , and Arthur L.Horwich (1995) Mechanism of GroEL Action : Productive Release of Polypeptide from a Sequestered Position under GroES *Cell* **83**
 90. Alison L. Smoot, Markandeswar Panda , Bill T.Brazil , M.Buckle , Alan R.Fersht , and Paul M.Horowitz. (2001) The Binding of Bis-ANS to the Isolated GroEL Apical Domain Fragment Induces the Formation of a Folding Intermediate with Increased Hydrophobic Surface Not Observed in Tetradecameric GroEL. *Biochemistry* **40**, 4484-4492
 91. Chen, J., Walter, S., Horwich, A. L., and Smith, D. L. (2001) Folding of malate dehydrogenase inside the GroEL-GroES cavity. *Nat Struct Biol* **8**, 721-728
 92. Smith, K. E., and Fisher, M. T. (1995) Interactions between the GroE

- chaperonins and rhodanese. Multiple intermediates and release and rebinding. *J Biol Chem* **270**, 21517-21523
93. Paul, S., Singh, C., Mishra, S., and Chaudhuri, T. K. (2007) The 69 kDa Escherichia coli maltodextrin glucosidase does not get encapsulated underneath GroES and folds through trans mechanism during GroEL/GroES-assisted folding. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **21**, 2874-2885
 94. Llorca, O., Perez-Perez, J., Carrascosa, J. L., Galan, A., Muga, A., and Valpuesta, J. M. (1997) Effects of the inter-ring communication in GroEL structural and functional asymmetry. *J Biol Chem* **272**, 32925-32932
 95. Sun, Z., Scott, D. J., and Lund, P. A. (2003) Isolation and characterisation of mutants of GroEL that are fully functional as single rings. *Journal of Molecular Biology* **332**, 715-728
 96. Illingworth, M., Salisbury, J., Li, W., Lin, D., and Chen, L. (2015) Effective ATPase activity and moderate chaperonin-cochaperonin interaction are important for the functional single-ring chaperonin system. *Biochem Biophys Res Commun* **466**, 15-20
 97. Mainz, A., Peschek, J., Stavropoulou, M., Back, K. C., Bardiaux, B., Asami, S., Prade, E., Peters, C., Weinkauff, S., Buchner, J., and Reif, B. (2015) The chaperone alphaB-crystallin uses different interfaces to capture an amorphous and an amyloid client. *Nat Struct Mol Biol* **22**, 898-905
 98. Shammass, S. L., Waudby, C. A., Wang, S., Buell, A. K., Knowles, T. P., Ecroyd, H., Welland, M. E., Carver, J. A., Dobson, C. M., and Meehan, S. (2011) Binding of the molecular chaperone alphaB-crystallin to Abeta amyloid fibrils inhibits fibril elongation. *Biophys J* **101**, 1681-1689
 99. Kulig, M., and Ecroyd, H. (2012) The small heat-shock protein alphaB-crystallin uses different mechanisms of chaperone action to prevent the amorphous versus fibrillar aggregation of alpha-lactalbumin. *Biochem J* **448**, 343-352
 100. Hochberg, G. K., Ecroyd, H., Liu, C., Cox, D., Cascio, D., Sawaya, M. R., Collier, M. P., Stroud, J., Carver, J. A., Baldwin, A. J., Robinson, C. V., Eisenberg, D. S., Benesch, J. L., and Laganowsky, A. (2014) The structured core domain of alphaB-crystallin can prevent amyloid fibrillation and associated toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, E1562-1570
 101. Wacker, J. L., Zareie, M. H., Fong, H., Sarikaya, M., and Muchowski, P. J. (2004) Hsp70 and Hsp40 attenuate formation of spherical and annular polyglutamine

- oligomers by partitioning monomer. *Nat Struct Mol Biol* **11**, 1215-1222
102. Shorter, J., and Lindquist, S. (2008) Hsp104, Hsp70 and Hsp40 interplay regulates formation, growth and elimination of Sup35 prions. *EMBO J* **27**, 2712-2724
 103. Kilpatrick, K., Novoa, J. A., Hancock, T., Guerriero, C. J., Wipf, P., Brodsky, J. L., and Segatori, L. (2013) Chemical induction of Hsp70 reduces alpha-synuclein aggregation in neuroglioma cells. *ACS chemical biology* **8**, 1460-1468
 104. Yagi-Utsumi, M., Kuniyama, T., Nakamura, T., Uekusa, Y., Makabe, K., Kuwajima, K., and Kato, K. (2013) NMR characterization of the interaction of GroEL with amyloid beta as a model ligand. *FEBS Lett* **587**, 1605-1609
 105. Nishida, N., Yagi-Utsumi, M., Motojima, F., Yoshida, M., Shimada, I., and Kato, K. (2013) Nuclear magnetic resonance approaches for characterizing interactions between the bacterial chaperonin GroEL and unstructured proteins. *J Biosci Bioeng* **116**, 160-164
 106. Yagi, H., Kusaka, E., Hongo, K., Mizobata, T., and Kawata, Y. (2005) Amyloid fibril formation of alpha-synuclein is accelerated by preformed amyloid seeds of other proteins: implications for the mechanism of transmissible conformational diseases. *J Biol Chem* **280**, 38609-38616
 107. Nisemblat, S., Yaniv, O., Parnas, A., Frolov, F., and Azem, A. (2015) Crystal structure of the human mitochondrial chaperonin symmetrical football complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, 6044-6049
 108. Okamoto, T., Ishida, R., Yamamoto, H., Tanabe-Ishida, M., Haga, A., Takahashi, H., Takahashi, K., Goto, D., Grave, E., and Itoh, H. (2015) Functional structure and physiological functions of mammalian wild-type HSP60. *Arch Biochem Biophys* **586**, 10-19
 109. Mangione, M. R., Vilasi, S., Marino, C., Librizzi, F., Canale, C., Spigolon, D., Bucchieri, F., Fucarino, A., Passantino, R., Cappello, F., Bulone, D., and San Biagio, P. L. (2016) Hsp60, amateur chaperone in amyloid-beta fibrillogenesis. *Biochim Biophys Acta* **1860**, 2474-2483
 110. Higurashi, T., Yagi, H., Mizobata, T., and Kawata, Y. (2005) Amyloid-like fibril formation of co-chaperonin GroES: nucleation and extension prefer different degrees of molecular compactness. *J Mol Biol* **351**, 1057-1069
 111. Sot, B., Rubio-Munoz, A., Leal-Quintero, A., Martinez-Sabando, J., Marcilla, M., Roodveldt, C., and Valpuesta, J. M. (2017) The chaperonin CCT inhibits assembly of alpha-synuclein amyloid fibrils by a specific, conformation-dependent interaction. *Sci Rep* **7**, 40859

112. Kitamura, A., Kubota, H., Pack, C. G., Matsumoto, G., Hirayama, S., Takahashi, Y., Kimura, H., Kinjo, M., Morimoto, R. I., and Nagata, K. (2006) Cytosolic chaperonin prevents polyglutamine toxicity with altering the aggregation state. *Nature cell biology* **8**, 1163-1170
113. Tam, S., Geller, R., Spiess, C., and Frydman, J. (2006) The chaperonin TRiC controls polyglutamine aggregation and toxicity through subunit-specific interactions. *Nature cell biology* **8**, 1155-1162
114. Shahmoradian, S. H., Galaz-Montoya, J. G., Schmid, M. F., Cong, Y., Ma, B., Spiess, C., Frydman, J., Ludtke, S. J., and Chiu, W. (2013) TRiC's tricks inhibit huntingtin aggregation. *eLife* **2**, e00710
115. Liu, H., Ojha, B., Morris, C., Jiang, M., Wojcikiewicz, E. P., Rao, P. P., and Du, D. (2015) Positively Charged Chitosan and N-Trimethyl Chitosan Inhibit Abeta40 Fibrillogenesis. *Biomacromolecules* **16**, 2363-2373
116. Ojha, B., Liu, H., Dutta, S., Rao, P. P., Wojcikiewicz, E. P., and Du, D. (2013) Poly(4-styrenesulfonate) as an inhibitor of Abeta40 amyloid fibril formation. *The journal of physical chemistry. B* **117**, 13975-13984
117. Yang, L. D., Chu, Z. M., Zhang, Y., and Yang, S. L. (2011) Gly-345 plays an essential role in *Pyrococcus furiosus* chaperonin function. *Biotechnology letters* **33**, 1649-1655
118. White, Z. W., Fisher, K. E., and Eisenstein, E. (1995) A monomeric variant of GroEL binds nucleotides but is inactive as a molecular chaperone. *J Biol Chem* **270**, 20404-20409
119. Illingworth, M., Ramsey, A., Zheng, Z., and Chen, L. (2011) Stimulating the substrate folding activity of a single ring GroEL variant by modulating the cochaperonin GroES. *J Biol Chem* **286**, 30401-30408
120. Nojima, T., Murayama, S., Yoshida, M., and Motojima, F. (2008) Determination of the number of active GroES subunits in the fused heptamer GroES required for interactions with GroEL. *J Biol Chem* **283**, 18385-18392
121. Tanaka, N., and Fersht, A. R. (1999) Identification of substrate binding site of GroEL minichaperone in solution. *J Mol Biol* **292**, 173-180
122. Kurouski, D., Washington, J., Ozbil, M., Prabhakar, R., Shekhtman, A., and Lednev, I. K. (2012) Disulfide bridges remain intact while native insulin converts into amyloid fibrils. *PLoS One* **7**, e36989
123. Kurouski, D., Luo, H., Sereda, V., Robb, F. T., and Lednev, I. K. (2012) Rapid degradation kinetics of amyloid fibrils under mild conditions by an archaeal chaperonin. *Biochem Biophys Res Commun* **422**, 97-102

124. Kurouski, D., Luo, H., Sereda, V., Robb, F. T., and Lednev, I. K. (2013) Deconstruction of stable cross-Beta fibrillar structures into toxic and nontoxic products using a mutated archaeal chaperonin. *ACS chemical biology* **8**, 2095-2101
125. Auluck, P. K., Chan, H. Y., Trojanowski, J. Q., Lee, V. M., and Bonini, N. M. (2002) Chaperone suppression of alpha-synuclein toxicity in a Drosophila model for Parkinson's disease. *Science* **295**, 865-868
126. Uryu, K., Richter-Landsberg, C., Welch, W., Sun, E., Goldbaum, O., Norris, E. H., Pham, C. T., Yazawa, I., Hilburger, K., Micsenyi, M., Giasson, B. I., Bonini, N. M., Lee, V. M., and Trojanowski, J. Q. (2006) Convergence of heat shock protein 90 with ubiquitin in filamentous alpha-synuclein inclusions of alpha-synucleinopathies. *The American journal of pathology* **168**, 947-961
127. Outeiro, T. F., Klucken, J., Strathearn, K. E., Liu, F., Nguyen, P., Rochet, J. C., Hyman, B. T., and McLean, P. J. (2006) Small heat shock proteins protect against alpha-synuclein-induced toxicity and aggregation. *Biochem Biophys Res Commun* **351**, 631-638
128. Ecroyd, H., and Carver, J. A. (2009) Crystallin proteins and amyloid fibrils. *Cell Mol Life Sci* **66**, 62-81
129. Bruinsma, I. B., Bruggink, K. A., Kinast, K., Versleijen, A. A., Segers-Nolten, I. M., Subramaniam, V., Kuiperij, H. B., Boelens, W., de Waal, R. M., and Verbeek, M. M. (2011) Inhibition of alpha-synuclein aggregation by small heat shock proteins. *Proteins* **79**, 2956-2967
130. Rekas, A., Jankova, L., Thorn, D. C., Cappai, R., and Carver, J. A. (2007) Monitoring the prevention of amyloid fibril formation by alpha-crystallin. Temperature dependence and the nature of the aggregating species. *FEBS J* **274**, 6290-6304
131. Roodveldt, C., Bertoncini, C. W., Andersson, A., van der Goot, A. T., Hsu, S. T., Fernandez-Montesinos, R., de Jong, J., van Ham, T. J., Nollen, E. A., Pozo, D., Christodoulou, J., and Dobson, C. M. (2009) Chaperone proteostasis in Parkinson's disease: stabilization of the Hsp70/alpha-synuclein complex by Hip. *EMBO J* **28**, 3758-3770

謝辞

本研究を進めるにあたり，6 年間終始熱心なご指導，ご鞭撻下さいました主指導教官の河田康志教授に感謝致します。また，日々の研究室生活においてに関してご助言をいただきました溝端知宏准教授，本郷邦広助教に心より感謝いたします。

論文作成にあたり実験を補助していただいた共同著者の外国人博士研究員の Bimlesh Ojha 博士，同期の荒木 紀帆氏を始めとするタンパク質工学研究室の先輩・同期・後輩の皆様に重ねて御礼申し上げます。

最後に，進学に関しご理解いただき，長年にわたり支えてくださった家族に心より感謝申し上げます。

Modulating the Effects of the Bacterial Chaperonin GroEL on Fibrillogenic Polypeptides through Modification of Domain Hinge Architecture*

Received for publication, August 4, 2016, and in revised form, October 5, 2016 Published, JBC Papers in Press, October 14, 2016, DOI 10.1074/jbc.M116.751925

Naoya Fukui[‡], Kiho Araki[‡], Kunihiro Hongo^{‡§}, Tomohiro Mizobata^{‡§}, and Yasushi Kawata^{‡§1}

From the [‡]Department of Chemistry and Biotechnology, Graduate School of Engineering, and the [§]Department of Biomedical Science, Institute of Regenerative Medicine and Biofunction, Graduate School of Medical Science, Tottori University, Tottori 680-8552, Japan

Edited by Paul Fraser

The isolated apical domain of the *Escherichia coli* GroEL subunit displays the ability to suppress the irreversible fibrillation of numerous amyloid-forming polypeptides. In previous experiments, we have shown that mutating Gly-192 (located at hinge II that connects the apical domain and the intermediate domain) to a tryptophan results in an inactive chaperonin whose apical domain is disoriented. In this study, we have utilized this disruptive effect of Gly-192 mutation to our advantage, by substituting this residue with amino acid residues of varying van der Waals volumes with the intent to modulate the affinity of GroEL toward fibrillogenic peptides. The affinities of GroEL toward fibrillogenic polypeptides such as A β (1–40) (amyloid- β (1–40)) peptide and α -synuclein increased in accordance to the larger van der Waals volume of the substituent amino acid side chain in the G192X mutants. When we compared the effects of wild-type GroEL and selected GroEL G192X mutants on α -synuclein fibril formation, we found that the effects of the chaperonin on α -synuclein fibrillation were different; the wild-type chaperonin caused changes in both the initial lag phase and the rate of fibril extension, whereas the effects of the G192X mutants were more specific toward the nucleus-forming lag phase. The chaperonins also displayed differential effects on α -synuclein fibril morphology, suggesting that through mutation of Gly-192, we may induce changes to the intermolecular affinities between GroEL and α -synuclein, leading to more efficient fibril suppression, and in specific cases, modulation of fibril morphology.

Chaperonins are well preserved complex oligomeric systems whose cellular role is to suppress the irreversible aggregation of various proteins in a typical cell and promote refolding and recovery of biological activity (1). The general mechanism of

chaperonin action, exemplified in the GroE system from *Escherichia coli*, consists of the recognition and binding of denatured, aggregation-prone protein molecules via hydrophobic interactions (mediated by the apical domain of the GroEL subunit), followed by the binding of nucleotide ATP, which triggers the binding of the co-chaperonin GroES and dynamic movements of the GroEL subunit that internalize the bound protein molecule into the characteristic central cavity of the unique, double-ringed quaternary structure of the GroEL tetradecamer (2). Subsequent hydrolysis of ATP acts as a timer that regulates the interval during which the internalized molecule remains within the central cavity. The protein is then released from GroEL, either having modified its original structure autonomously so that the risk of aggregation is lessened, or according to alternative views, having undergone an active rearrangement of its structure through GroEL to “rewind” the molecule for another attempt at correct folding (3, 4). Bacterial chaperonins such as GroE are known to apply this general mechanism of protein folding assistance to proteins regardless of their source or biological activity. The effects of GroE are partially limited, however, by a molecular size criterion that determines whether a given protein is able to be internalized within the central cavity of GroEL (5).

Recent advances in understanding cellular protein homeostasis have indicated that under certain conditions, cellular proteins form fibrillar protein deposits, which are in turn implicated in various molecular diseases (6–12). These protein fibrils typically evolve very slowly over a long interval within certain cells to form insoluble, characteristically fibrous deposits that may be identified pathologically. It has been shown that various molecular chaperones that are normally present in the cell interact with these proteins that are prone to long-term aggregation and deposition, and partially control or prevent this deposition from occurring (13–17). The interactions between fibrillogenic proteins and molecular chaperones may extend toward molecular chaperones from bacterial origins (18–20). In our experiments, we have found that the isolated apical domain of GroEL (spanning residues 191–376 of the original GroEL subunit) is capable of suppressing the fibrillation of polypeptides such as A β (1–42),² α -synuclein (α Syn),

* This work was supported in part by Grant-in-Aid for Scientific Research (C) 25440027 from the Japan Society for the Promotion of Science (JSPS) and Grant-in-Aid for Scientific Research on Innovative Areas 2411376 from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology (MEXT). This research was also partially supported by the Strategic Research Program for Brain Sciences from Japan Agency for Medical Research and Development (AMED). The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

¹ To whom correspondence should be addressed: Dept. of Chemistry and Biotechnology, Graduate School of Engineering, Tottori University, Koyama-Minami, Tottori 680-8552, Japan. Fax: 81-857-31-0881; E-mail: kawata@bio.tottori-u.ac.jp.

² The abbreviations used are: A β , amyloid- β ; ANS, 1-anilinonaphthalene-8-sulfonate; α Syn, α -synuclein; MDH, malate dehydrogenase; QCM, quartz crystal microbalance; Th-T, thioflavin-T; TEM, transmission electron microscopy.

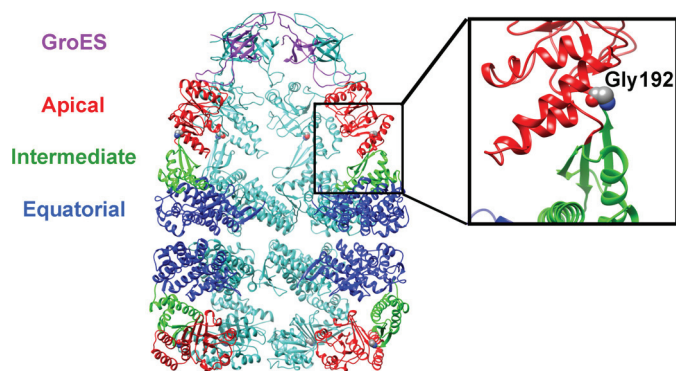


FIGURE 1. **Structural model of GroE, showing the location of Gly-192 in the GroEL subunit.** The figure on the left is a cutaway image of the GroEL₁₄·ADP₇·GroES₇ complex, derived from Protein Data Bank (PDB) file 1AON (36). Selected GroEL and GroES subunits have been removed to showcase the characteristic central cavity of GroEL₁₄. The GroEL subunits shown in the forefront of the figure have been colored to highlight the domain architecture; the apical domain is in red, the intermediate domain is in green, and the equatorial domain is in blue. The panel on the right is an expanded view of the hinge II region of the GroEL subunit, with Gly-192 represented as space-filling forms. Images were drawn using UCSF Chimera (37).

and GroES (21). Through understanding the underlying principles by which various molecular chaperones interact with fibril-forming polypeptides, it may become possible to develop agents that suppress the irreversible fibrillation of proteins that are conducive to numerous diseases.

During the course of our studies on the GroEL subunit, we characterized a point mutation (G192W) with unique characteristics (22). Gly-192 is located within a hinge region that connects the apical domain and the intermediate domains of GroEL, and this hinge region is proposed to facilitate the dynamic movement of the apical domain in response to ATP binding and hydrolysis within the GroEL subunit (Fig. 1). Substituting Gly-192 with a bulky tryptophan residue served to hinder this dynamic movement in an unusual manner; the mutant chaperonin displayed the ability to bind the co-chaperonin GroES and unfolded peptide simultaneously, in the marked absence of added ATP (22). Further characterization determined that the apical domain in this mutant was tilted relative to the original subunit configuration in such a manner that the binding of GroES and unfolded polypeptide to the same GroEL 14-mer was now possible. The altered configuration resulted in the display of binding interfaces that were hidden in the wild-type subunit when ATP was not bound.

Taking the unique characteristics of GroEL G192W together with the interesting ability that the GroEL apical domain had shown with regard to protein fibril suppression, we reasoned that it may be possible to engineer an enhanced suppressor of protein fibrillation using the GroEL quaternary structure as a scaffold. To prove our ideas, in this study, we substituted Gly-192 with a number of amino acid residues that differ in the van der Waals volume of their side chains, and then characterized their abilities toward suppressing the aggregation and fibrillation of proteins. We found that, in agreement with our initial expectations, the relative affinities of various GroEL G192X mutants toward unfolded peptide and GroES in the absence of ATP could be modulated in accordance with the size of the side chain of the X-substituent. This modulation was accompanied by corresponding increases in the surface hydrophobicity of

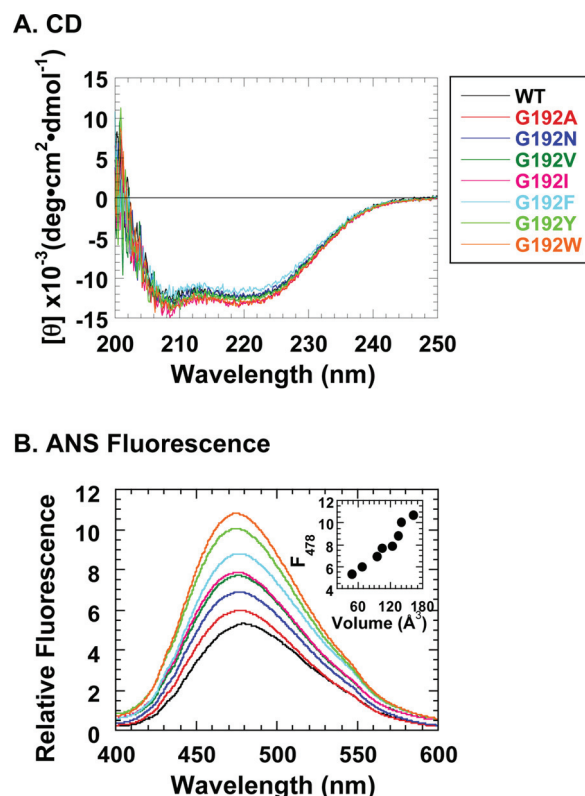


FIGURE 2. **Structural characterization of the seven GroEL G192X mutants.** A, far-UV CD spectra of GroEL mutants. The color legend next to panel A denotes the data corresponding to each mutant, and this legend is valid, when applicable, for the data in each panel shown in Figs. 2–4. B, ANS fluorescence spectra of GroEL mutants to gauge surface hydrophobicity. The inset in B is a plot of the fluorescence intensity at 478 nm (F_{478}) for each trace against the van der Waals volume of the amino acid side chains that replace Gly-192 in each mutant.

each GroEL mutant. A clear correlation could be observed between the van der Waals volume of various amino acid side chains and the relative affinities of the resultant mutants toward proteins and peptides such as α Syn and A β (1–40) peptide. The abilities of the various mutants in suppressing protein fibrillation also showed a strong correlation; the most bulky mutant (G192W) proved to be the most effective suppressor of fibrillation in *in vitro* assays using fluorescence to detect fibril maturation. An unexpected additional finding was that, in addition to this enhanced ability to suppress fibril formation, we could observe changes in the morphology of resultant protein fibrils that formed in the presence of different GroEL variants. Our results suggest that, through adjustment of the orientation of the GroEL apical domain by mutation of Gly-192, it is possible to engineer a series of chaperonins that are capable of modulating the length and shape of protein fibrils. These chaperonins act by interacting with fibrillogenic proteins and their products at multiple points of the fibrillation process.

Results

Fig. 2 shows the results of the initial structural characterization of seven GroEL G192X mutants using circular dichroism (CD, Fig. 2A) and surface hydrophobicity analysis using the fluorescent probe 1-anilinonaphthalene-8-sulfonate (ANS; Fig. 2B). Fig. 3 shows the corresponding functional characteriza-

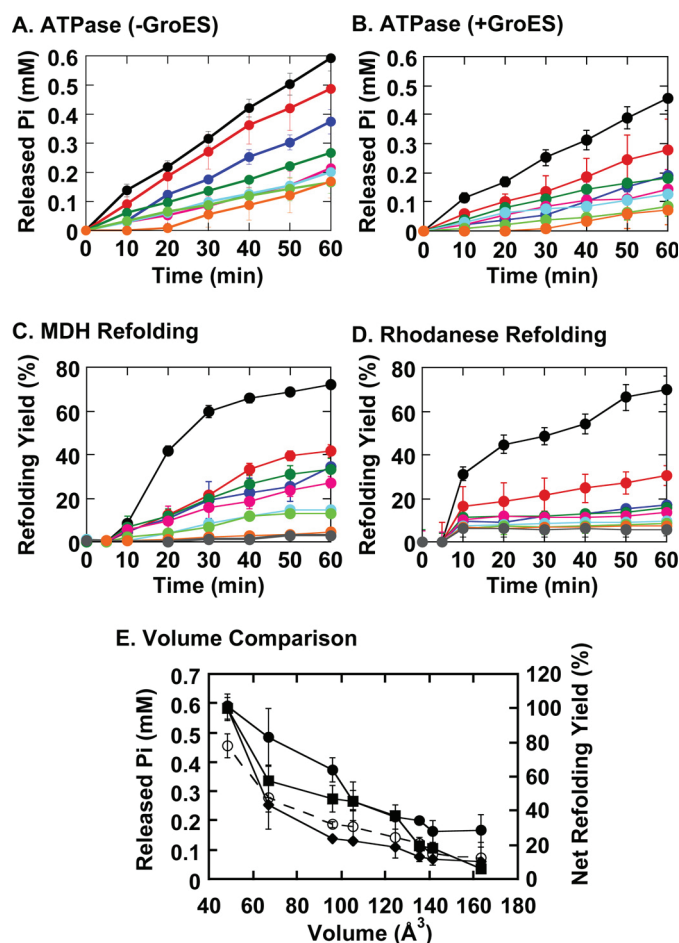


FIGURE 3. Functional characterization of the seven GroEL G192X mutants. A, ATPase activities of the GroEL G192X mutants in the absence of GroES. B, ATPase activities of the GroEL G192X mutants in the presence of GroES. C, refolding assays of porcine MDH. D, refolding assays of bovine rhodanese. The gray traces in panels C and D denote spontaneous refolding reactions of each substrate protein performed in the absence of chaperonin. Refolding reactions in panels C and D were initiated in the absence of ATP, and 2 mM ATP was subsequently added at $t = 5$ min. E, functional characterizations of the G192X mutants summarized by plotting four distinct experimental values: the released inorganic phosphate concentrations detected at $t = 60$ min in panel A (closed circles: solid lines), similar values for panel B (open circles: dashed lines), and the net refolding yields at $t = 60$ min shown in panels C (closed squares) and D (closed diamonds), in a manner analogous to that shown in the inset to Fig. 2B. Error bars represent the S.E. of each data point.

tions of these mutants using ATPase assays (Fig. 3, A and B), as well as refolding assays using malate dehydrogenase (MDH) (Fig. 3C) and rhodanese (Fig. 3D). Fig. 3E summarizes our functional evaluations by plotting the net ATPase activities and refolding yields shown in Fig. 3, A–D, against the van der Waals volumes of the amino acid side chains (23) that replace Gly-192 in each mutant.

The CD spectra of all of the mutants closely resembled the spectra of GroEL WT (Fig. 2A), indicating that substitution of Gly-192 with various amino acids resulted in minimal effects on the overall structural integrity of GroEL at the secondary structural level. In contrast, as shown in Fig. 2B, substitution of Gly-192 with larger amino acids resulted in a gradual and significant increase in the amount of detected ANS fluorescence. This increase correlated roughly with the size of the amino acid residue that occupied position 192, as demonstrated when we plot

the values of the ANS fluorescence intensity at 478 nm (F_{478}) against the side chain van der Waals volumes (23) of each substituting amino acid (Fig. 2B, inset). We note here that during purification of the mutants, each mutant was eluted from a Superdex 200 Increase gel filtration column at elution volumes (8.75–9.50 ml) that were slightly smaller than that of thyroglobulin (M_r 669,000), suggesting that all of the mutants retained the original 14-mer quaternary structure of GroEL.

In Fig. 3, A and B, the ATPase activities of the various Gly-192 substitution mutants are plotted. We note again a rough correlation between the ATPase activities and the size of the side chain of the amino acid substituent. For each mutant, the addition of GroES to the reaction resulted in a marked decrease in ATPase activity (Fig. 3E, compare *closed versus open circles*), indicating that a basic functional relationship between the GroEL ATPase and GroES binding to GroEL (ATPase suppression) was preserved.

With regard to the folding assistance activities of the various mutants (Fig. 3, C and D), this ability was also affected by the Gly-192 to X substitution and also roughly correlated with the size of the side chain that replaced Gly-192. Generally, substituting the glycine at position 192 for amino acids with larger van der Waals volumes resulted in a more severe decrease in folding assistance activity. Some anomalies were apparent: for instance, the strong suppression in MDH refolding assistance abilities in the G192W mutant (Fig. 3C, orange). Also, regarding rhodanese refolding assistance abilities, we observed that the effects of Gly-192 substitution were more severe, with only G192A displaying a significantly improved refolding yield when compared with the spontaneous reaction (Fig. 3D, red). Overall, however, the effects of amino acid substitution in Fig. 3 seem to reflect the consequences of steric effects caused by the size of the amino acid substituent, as summarized in Fig. 3E.

We next probed the effects of Gly-192 substitution on the binding of the co-chaperonin GroES, through direct quartz crystal microbalance (QCM) analysis. In this assay, we used a concatenated form of GroES where individual subunits were linked by a tri-glycine linker (ESC7) (24) as the binding group immobilized to the sensor and the various GroEL mutants as soluble ligands. The results are summarized in Fig. 4. It should be noted here that, with the exception of the wild-type chaperonin, all of the GroEL mutant proteins were tested for ESC7 binding in the absence of ATP; only GroEL WT was analyzed in both the absence and the presence of 2 mM ATP. As seen in Fig. 4, all of the mutants tested were capable of binding to GroES in the absence of ATP. Generally, a larger van der Waals volume for the substituting mutation corresponded to an increase in $|\Delta F|$, roughly reflecting increased affinities between GroEL and GroES. From the results shown in Fig. 4, we believe that the substitution of Gly-192 with bulkier amino acids served to change the orientation of the apical domain relative to the original closed conformation in the apo GroEL 14-mer, causing an increase in surface hydrophobicity (Fig. 2B), an increased affinity toward GroES (Fig. 4), and a decrease in overall “chaperonin competence” (Fig. 3, C and D).

We next measured the affinities of a selected subset of G192X mutants toward two immobilized fibrillogenic polypeptides, A β (1–40) peptide and α Syn bound to the sensor via a C-termi-

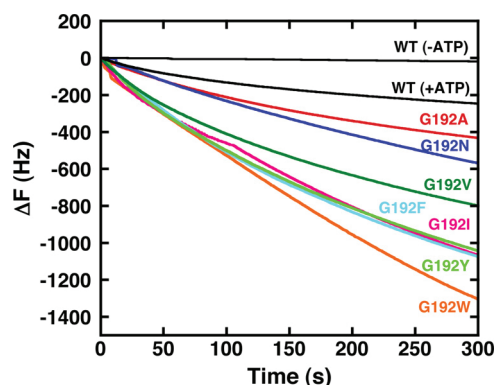


FIGURE 4. QCM binding analyses of GroEL G192X mutants to immobilized GroES ESC7. Preparations of ESC7 were immobilized to the sensor chip using standard methods, and aliquots of GroEL G192X were added to the cell. Signal changes reflect changes to the mass that is bound to the sensor chip, which in this case represents the amount of GroEL G192X that is bound to ESC7. With the exception of GroEL WT, all measurements were performed in the absence of ATP.

nal His₆ tag (α Syn-His₆), using QCM to gauge the effects of the G192X mutation on GroEL- $A\beta$ (1–40) and GroEL- α Syn association. For this assay, we selected the mutants G192N, G192I, and G192W. These three mutants, together with GroEL WT, span the range of different affinities that were observed in the GroES binding experiments shown in Fig. 4. As shown in Fig. 5, the G192X mutation resulted in changes in the affinities toward GroEL for both immobilized $A\beta$ (1–40) (Fig. 5A) and immobilized α Syn-His₆ (Fig. 5B). The relationship between the substituting amino acid and the binding affinities was roughly comparable with the changes in affinity toward GroES: GroEL G192W displayed the strongest affinities toward $A\beta$ (1–40) and α Syn-His₆, and GroEL WT displayed the weakest. The results were in line with our explanation that these amino acid substitutions change the orientation of the GroEL apical domain relative to the ring structure, and as a result, structural interfaces that accommodate protein binding are exposed. The finding that the affinities of the G192N mutant and the G192I mutant also fell between wild type and G192W, for both fibrillogenic polypeptides, supported our notion that the size of the substituting residue at position 192 dictates a sliding scale of affinity toward protein ligands.

The interactions between the four selected chaperonins and α Syn-His₆ were probed further by quantitative QCM analysis, and the results are summarized in Fig. 6 and Table 1. We found that the qualitative relationship that we inferred from Fig. 5 was supported in quantitative analyses. Estimated dissociation constants (K_D) of each chaperonin toward immobilized α Syn-His₆ ranged from 8.4×10^{-9} M for G192W to 3.06×10^{-8} M for GroEL wild type (Table 1), again demonstrating a sliding scale of binding affinities correlating with the size of the amino acid side chain that replaces Gly-192.

To determine whether the changes in α Syn-GroEL binding affinities in particular translated to detectable effects in α Syn fibrillogenesis, we next monitored the effects of GroEL G192X addition on the time course of α Syn fibril formation using thioflavin-T (Th-T) fluorescence (Fig. 7). As shown in Fig. 7, we found that the addition of either GroEL WT or each of the three G192X mutants that we tested indeed caused measurable

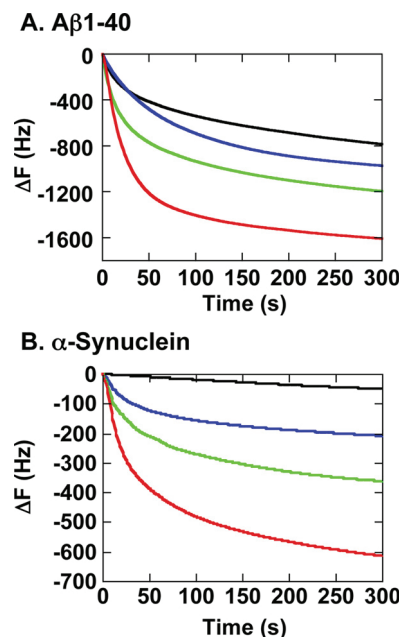


FIGURE 5. QCM binding analyses of GroEL WT and three G192X mutants to immobilized fibrillogenic polypeptides. A, the binding of GroEL to immobilized $A\beta$ (1–40) peptide. B, the binding of GroEL to immobilized α Syn-His₆. In each panel, the black trace indicates the binding of GroEL WT, the blue trace indicates the binding of GroEL G192N, the green trace indicates the binding of GroEL G192I, and the red trace indicates the binding of GroEL G192W.

changes in the time course of α Syn fibrillation. Intriguingly, however, we noted in the experiments a qualitative difference in the effects of GroEL wild-type and the G192X mutant chaperonins on α Syn fibrillogenesis. In the case of GroEL WT, the fibrillation profile was altered in a GroEL concentration-dependent manner, but the changes were mainly confined to the rate of fibril extension, with the lag interval remaining relatively unchanged (Fig. 7A). In the case of the G192W mutant, however, the addition of increasing amounts of the chaperonin to the reaction caused a specific increase in the lag phase of fibrillation, and the rate of extension as monitored by the slope of Th-T fluorescence increase was relatively constant across the samples. This suggested that this mutant affected most strongly the initial formation of fibril nuclei from which mature fibrils extended (Fig. 7D). The effects of the other two mutants lay between these two extremes, and GroEL G192N tended to produce effects that were more pronounced in the fibrillation rate (Fig. 7B), whereas GroEL G192I addition caused more drastic changes to the initial lag times (Fig. 7C).

Do these varied effects on the fibril extension profile translate into changes in the shape of the fibrils that are eventually formed? To answer this question, we performed transmission electron microscopy (TEM) analysis on fibrils that were formed in the assays shown in Fig. 7 using negative staining. Interestingly, we observed a difference in the morphology of fibrils produced in the presence of these chaperonins (Fig. 8). In the presence of GroEL WT, fibrils tended to develop unbraided, strip-like forms where multiple protofibrils were arranged in parallel, especially at higher ratios of α Syn to GroEL (Fig. 8, see + WT, x0.2 panel, bordered in blue). In our TEM images, we could also observe particles of GroEL bound to the periphery of

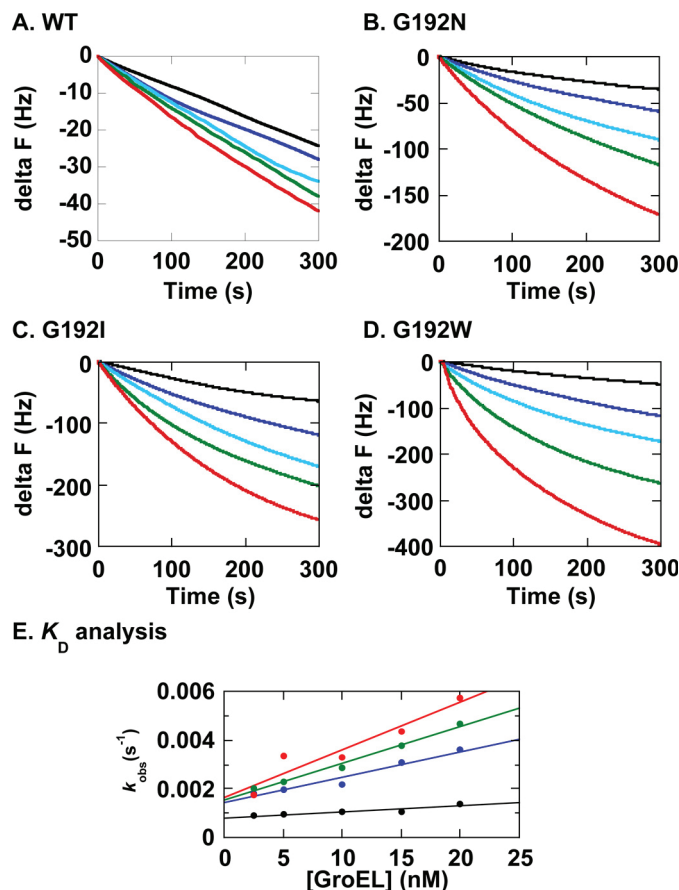


FIGURE 6. Quantitative QCM binding analyses of GroEL WT and three G192X mutants to immobilized α Syn-His₆. A–D, titrations of α Syn-His₆ immobilized to the QCM sensor with increasing concentrations of GroEL WT (A), GroEL G192N (B), G192I (C), or G192W (D). Colors in each panel indicate QCM traces obtained by adding GroEL at the following concentrations: black, 2.5 nM; blue, 5 nM; cyan, 10 nM; green, 15 nM; red, 20 nM. E, estimation of K_D values through linear regression fitting of $[GroEL]$ versus k_{obs} plots. Black, WT; blue, G192N; green, G192I; red, G192W.

TABLE 1

Summary of the values k_{on} , k_{off} , and K_D estimated from linear regression analysis of the data shown in Fig. 6E

Sample	k_{on} $M^{-1} s^{-1}$	k_{off} s^{-1}	K_D M
WT	2.6×10^4	7.98×10^{-4}	3.06×10^{-8}
G192N	10.5×10^4	14.4×10^{-4}	1.37×10^{-8}
G192I	15.0×10^4	15.5×10^{-4}	1.03×10^{-8}
G192W	19.6×10^4	16.4×10^{-4}	8.4×10^{-9}

the fibrils, reflecting perhaps the persistence of the GroEL- α Syn interactions. In contrast, in the presence of GroEL G192W (Fig. 8, see +G192W, $x0.2$ panel, bordered in red), the fibrils observed more closely resembled the braided protofibril forms that are observed when α Syn fibrils are formed in isolation (Fig. 8, topmost panel); instead, the fibrils formed were shorter in overall length and were greatly reduced in number. Fibrils that formed in the presence of GroEL G192N and G192I included both parallel oriented forms and shorter, braided forms, as highlighted in Fig. 8 with the corresponding colored borders.

In Fig. 9, we probed the effects of the delayed addition of these chaperonins to the α Syn fibril-forming reaction. The delayed addition of GroEL during α Syn fibrillation resulted in

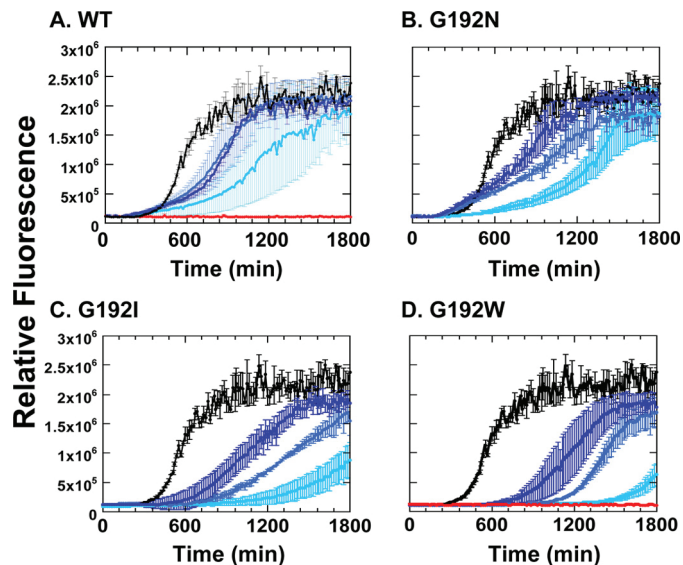


FIGURE 7. Th-T fluorescence assays of α Syn fibrillation in the presence of GroEL WT and G192X mutants. A, GroEL WT. B, GroEL G192N. C, GroEL G192I. D, GroEL G192W. In each panel, lighter shades of blue are used to denote increasing concentrations of GroEL added to the experiment. Specific molar ratios of GroEL_{1,4} added to each sample relative to α Syn monomer are as follows: 0.05:1, 0.1:1, 0.2:1 (from dark blue to light blue). Red traces in panels A and D indicate Th-T fluorescence changes of GroEL WT and G192W incubated under identical conditions, respectively. Error bars represent the S.E. of each data point.

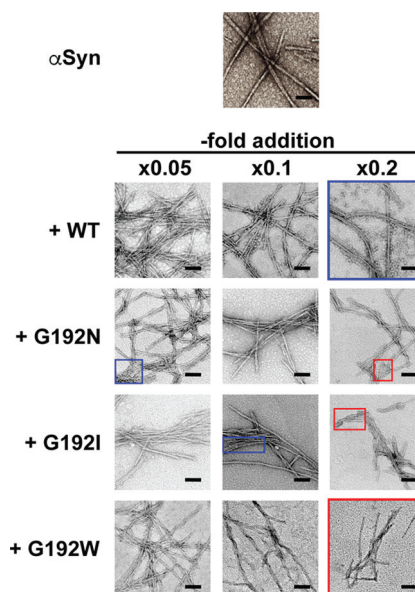


FIGURE 8. Transmission electron micrographs of α Syn fibrils formed in Fig. 7 (at $t = 30$ h). Scale bars in each panel indicate 100 nm. The uppermost panel shows negatively stained samples of typical α Syn fibrils formed in the absence of chaperonin. The lower panels are grouped horizontally according to the type of chaperonin added to the α Syn fibril-forming reaction, and vertically according to the specific ratio of chaperonin oligomer added relative to α Syn monomer. Blue and red borders indicate grouping of panels and regions that show a common fibril morphology, as discussed in detail under "Results."

changes to the time course of fibrillogenesis. The specific changes that each chaperonin brought about, however, were slightly different between GroEL wild type and the other three GroEL Gly-192 mutants. In the case of GroEL WT, the addition of the chaperonin at different time points of the reaction resulted in changes that varied with the delay before GroEL

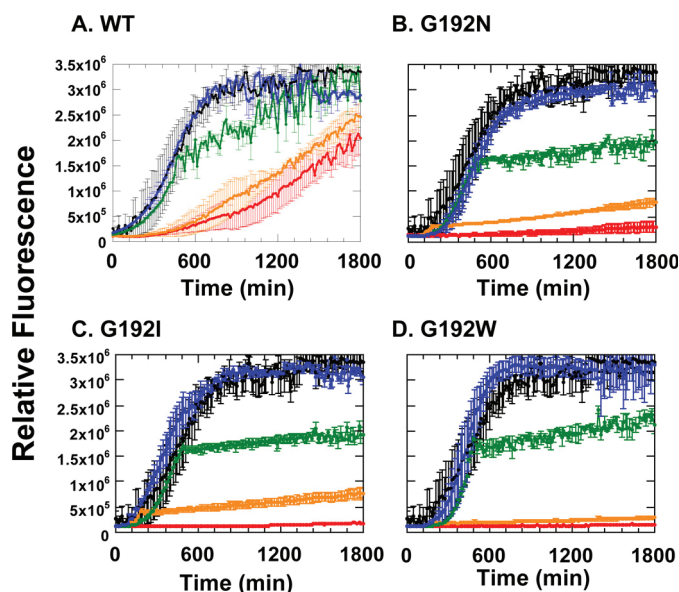


FIGURE 9. Delayed addition of GroEL WT and G192X mutants to fibrillation reactions of α Syn. A–D, after initiating the fibril-forming reaction in the absence of chaperonin, either GroEL WT (A) or GroEL G192N (B), G192I (C), or G192W (D) mutant was added after a fixed delay time. The ratio of GroEL₁₄ to α Syn added to the experiment follows the following convention: *red*, chaperonin added at zero time (no delay); *orange*, chaperonin added after a 3-h (180-min) delay; *green*, chaperonin added after an 8-h (480-min) delay; *blue*, chaperonin added after a 24-h (1440-min) delay. *Black traces* indicate reactions in the absence of chaperonin. Error bars represent the S.E. of each data point.

addition (Fig. 9A). When GroEL WT was added at the early stages of the fibril-forming reaction (Fig. 9A, *red* and *orange*), an elongated lag phase (attributed to fibril nuclei formation) and a decrease in the rate of fluorescence signal increase (attributed to fibril extension) were both observed. Adding GroEL WT to the reaction at later intervals, for example, 8 h after the initiation of the experiment (Fig. 9A, *green*), resulted in a decrease in the fibril-forming rate. However, the fluorescence signal increased eventually to values similar to that of samples without added GroEL (Fig. 9A, *black*). In contrast, when GroEL G192W was added to the reaction at various time points (Fig. 9D), we observed that GroEL G192W was quite effective in immediately halting further fibril formation, even when this chaperonin was added at the midpoint of the extension phase (8 h; Fig. 9D, *green*). The affinity of GroEL G192W toward α Syn is higher than the affinity of GroEL WT (Table 1), and this difference in affinities may be causing these differences in additive effect on the α Syn fibril-generating reaction. Reactions where either G192N or G192I was added mimicked the results of GroEL G192W; in each case, delayed addition served to immediately halt further increases in Th-T fluorescence.

When we observed the shape of the fibrils produced in the delayed addition experiments, we were able to confirm the differential effects of GroEL WT and GroEL G192W on the fibril morphology of α Syn that we noted in Fig. 8. As seen in Fig. 10, α Syn fibrils that were formed in samples where GroEL WT was added in the early stages of the fibrillation reaction (0 and 3 h) tended to produce long straight fibrils without twists, confirming the results shown in Fig. 8 that fibrils that formed in the presence of GroEL WT displayed this characteristic morphol-

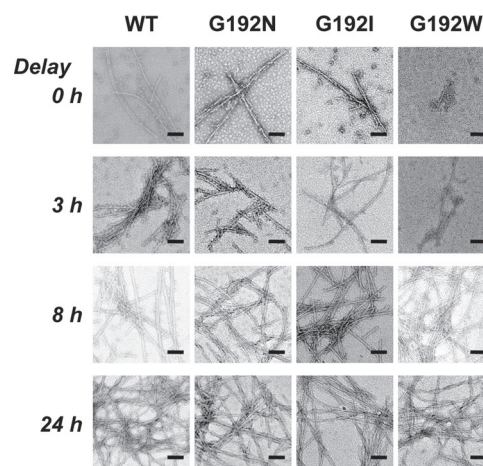


FIGURE 10. TEM images of α Syn fibril samples that were recovered after the experiments shown in Fig. 9. Images are grouped vertically according to the type of GroEL added. The *top row* indicates α Syn fibrils that formed in the presence of GroEL without delay time (0 h), and subsequent *lower rows* show samples from reactions that were initiated in buffer, with GroEL added at progressively later intervals (3, 8, and 24 h). Scale bars indicate 100 nm.

ogy. However, this tendency was altered when GroEL WT was added in the latter stages of the reaction; the fibrils produced were much more similar to the braided protofibrils typical of α Syn fibrils formed in isolation (Fig. 10, compare the *topmost* and *bottommost panels* of the *left-side column* denoted WT). In contrast, fibrils produced in the presence of GroEL G192W (Fig. 10, *right column*) displayed twisted morphologies irrespective of the time that GroEL was added to the reaction, again confirming the morphological differences of the fibrils that formed in the presence of these two chaperonins, as described in Fig. 8. We may deduce two things from the images in Fig. 10 regarding the effects of GroEL on α Syn fibrillogenesis. First, the effects of the chaperonin on fibril morphology are realized in the initial, early stages of the fibril-forming reaction; GroEL is incapable of altering the morphology of fibrils once they have been formed, because delaying the addition of GroEL to the reaction for 24 h results in the disappearance of all morphological differences between the samples (Fig. 10, *24 h panel*). Second, this ability to change the morphology of α Syn fibrils seems to hinge on the relative affinity that GroEL displays toward α Syn, and this affinity may be modulated by replacing a crucial glycine residue localized in the hinge II region of the GroEL subunit with a bulkier amino acid that tilts the orientation of the GroEL apical domain.

Discussion

Molecular chaperones function as shepherds to various cellular proteins under conditions of stress to maintain the structural integrity and functional abilities of these clients, and also act to smoothly process damaged and inactive proteins through the proteolytic pathway. To achieve these functions, molecular chaperones frequently utilize protein-protein interactions to recognize proteins that are qualified for processing.

Recent *in vivo* studies have highlighted the possibility that, through this protein maintenance activity, various molecular chaperones are actively involved in preventing the accumulation of insoluble, fibrillar protein aggregates that are often

implicated in various cellular diseases. Examples such as the involvement of the small heat shock proteins (14, 25–27), members of the Hsp70 and Hsp104 families (15–17, 28, 29), and the chaperonin/Hsp60 families (30–32) have demonstrated that the involvement of molecular chaperones in the control of protein folding diseases may be a general concept applicable to a variety of phenomena that affect the well being and health of eukaryotic cells.

Building upon this concept, we set out to elucidate general principles that may underlie the control of protein fibrillation by molecular chaperones. We elected to use a model system composed of the bacterial chaperonin GroEL and multiple fibrillogenic proteins. In a previous study, we succeeded in demonstrating that the apical domain of GroEL, which acts as a sensor for proteins susceptible to association and insolubility, is capable of interacting with and suppressing the formation of protein fibrils from various sources (21). The present study is aimed at utilizing and extending our original findings regarding the GroEL apical domain, by revisiting the original chaperonin quaternary structure and selectively modifying a crucial hinge region so that the active apical domain may be reoriented toward our purposes.

Our experiments demonstrated rather clearly that it was indeed possible to modify the structure of the GroEL subunit to enhance its affinity toward fibrillogenic polypeptides, with minimal effects to the overall structural characteristics of the chaperonin. Moreover, the modifications are partially customizable; by substituting Gly-192 with amino acid residues of increasing size, it was possible to gradually increase the affinity of GroEL toward polypeptides such as A β (1–40) and α Syn. This increase in affinity was also correlated with an improved ability to suppress the fibrillogenesis of α Syn; the mutant with the bulkiest substitution at position 192 was determined to be the most effective suppressor of α Syn fibrils. The structural basis for this effect seems to be relatively clear-cut; the presence of bulkier amino acid side chains acts to tilt the apical domain to an orientation that exposes more and more of the hydrophobic binding interface for unfolded polypeptide (Fig. 2B). We have observed in Machida *et al.* (22) that this is true in the case of GroEL G192W; direct TEM observation showed that in this mutant, the apical domain was tilted in an open-like configuration in the absence of ATP. The additional, interesting finding of the present study was that this effect was adjustable, based upon a sliding scale of the van der Waals volume of the substituting amino acid side chain. It should be relatively easy to build on our results shown here to enhance this ability to even greater levels. Selected modifications to the GroEL apical domain, for example, may conceivably increase the affinity of this domain toward various polypeptides, or lead even to “customized” affinities, where the domain is modified to accommodate only a specific structural motif over other interactions. The findings shown here form a robust platform on which we may build to probe much further the development of protein-based factors that may be utilized in the detection and, ultimately, control of insoluble protein fibrils that are implicated in various protein misfolding diseases.

An additional unexpected and interesting finding was that, in addition to protein fibril suppression, GroEL was also capable

of altering the morphology of α Syn fibrils specifically, and this ability was also adjustable by mutating Gly-192. We found that the original GroEL WT, when added to the α Syn fibril-forming reaction at a sufficiently early stage, could change the morphology of α Syn fibrils from its original twisted, braided form to a flat form in which the protofibrils of α Syn are arranged parallel to each other. This fibril-modulating ability may be based on a “loose” interaction with α Syn oligomers or protofibrils, because it was the GroEL variant with the weakest affinity toward α Syn that displayed this tendency. However, specific interactions that are responsible for this ability must be elucidated in further experiments to probe the detailed kinetics of the GroEL- α Syn interaction. Fortunately, however, we already have in our hands a mutant GroEL where this ability has been altered to a more general fibril suppression activity, so a comparative analysis between these two chaperonins, and selected other G192X mutants, should provide insights on this interesting effect on fibril morphology.

Experimental Procedures

Preparation of Chaperonins and Client Proteins—Genes encoding the GroEL mutants were constructed by using the QuikChange site-directed mutagenesis kit, using pETEL (pET23a(+)(Novagen)-based plasmid encoding wild-type *groEL*) as the template. The successful construction of each mutant was confirmed by DNA sequence analysis of the entire GroEL coding region. Both wild-type and mutant proteins were expressed in *E. coli* BLR(DE3) and purified at room temperature, using the method described previously (22) involving ammonium sulfate precipitation followed by successive gel filtration (Superdex 200 Increase 10/300 GL) and anion exchange (Resource-Q) chromatography. All chromatography steps were performed on an ÄKTA-FPLC system (GE Healthcare) at room temperature.

MDH from pig heart was obtained commercially from Roche Applied Sciences, and bovine rhodanese was obtained from Sigma-Aldrich and used in refolding studies. A β (1–40) peptide was obtained as synthesized peptide from the Peptide Institute (Osaka, Japan). Human α Syn and α Syn-His₆ were each expressed in *E. coli* cells harboring an overproducing plasmid and purified using protocols published in Yagi *et al.* (33).

Buffers—The following buffers were used in this study. Buffer A, 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.8, containing 20 mM KCl, 10 mM Mg(CH₃COO)₂, and 2 mM DTT. Buffer B, 30 mM Tris-HCl, pH 7.2, containing 50 mM KCl and 10 mM Mg(CH₃COO)₂. Buffer C, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, containing 2 mM EDTA and 2 mM DTT. Buffer D, 20 mM HEPES-NaOH buffer, pH 7.5, containing 150 mM NaCl, 50 mM EDTA, and 10 mM NiSO₄. Buffer E, 20 mM HEPES-NaOH, pH 7.5, containing 150 mM NaCl and 0.4 M imidazole. Buffer F, 25 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5, containing 150 mM NaCl and 20 μ M Th-T (Wako, Osaka, Japan).

Structural Characterization—CD spectra of GroEL mutants (200 μ g/ml) were measured in Buffer A. Measurements were performed on a Jasco J-820 spectropolarimeter at 25 °C. Spectra displayed are averages of 10 scans, and corrected for buffer signals. Raw signals were then converted to mean residue ellipticities in Fig. 2A.

Engineered Chaperonins Modulate Fibrillogenesis

Fluorescence spectroscopy of GroEL mutants (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in the presence of ANS was measured on a Jasco FP-6300 fluorescence spectrophotometer in Buffer A containing 5 μM ANS, at an excitation wavelength of 371 nm. Spectra shown are averages of five scans, and buffer contributions were subtracted.

Functional Characterization—ATPase activities of GroEL protein (0.1 μM) in the presence or absence of GroES (0.1 μM) (7-mer) were measured at 37 °C, using a slightly modified protocol of a colorimetric method described previously (34, 35). Experiments were performed in Buffer A. The initial concentration of ATP added was 2 mM, and samples were removed at 10-min intervals to determine the concentration of inorganic phosphate in the assay mixture.

Refolding assays of MDH were carried out as reported previously (22). Refolding of rhodanese was performed using previous protocols. Briefly, purified rhodanese (46 μM) was unfolded in 40 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, containing 6 M guanidine hydrochloride and 1.5 mM DTT at 25 °C for 1 h. The refolding reaction was started by a 100-fold dilution into Buffer B. The temperature and protein concentration of rhodanese during the refolding reaction were 25 °C and 0.46 μM , respectively; a 1.5-fold molar excess of GroEL and GroES oligomer relative to rhodanese was present in the refolding reaction, and 2 mM ATP was added to each reaction at 5 min. The assay was performed at 25 °C.

In both ATPase and refolding assays, the data shown represent averages from three experiments using two independent chaperonin preparations of each variant. Error bars represent the S.E. of each data point. Values for the van der Waals volume of each amino acid side chain that replaced Gly-192 in the mutants were obtained from Darby and Creighton (23) and used to plot the Fig. 2B inset as well as Fig. 3E.

QCM Assay—An Affinix QN μ (Initium Inc., Japan) QCM instrument was used to directly detect GroEL-protein interactions. The instrument contains one 550- μl cell equipped with a 27-MHz QCM plate (8.7-mm diameter quartz plate and 5.7-mm² area gold electrode) at the bottom of the cell and is coupled to a temperature control system. Immobilization of ESC7 and A β (1–40) peptide to the sensor cell and subsequent measurements were accomplished utilizing amine coupling as follows. The gold surface of the quartz resonator was first cleaned successively with 1% SDS and piranha solution ($\text{H}_2\text{SO}_4\text{:H}_2\text{O}_2 = 3\text{:}1$) prior to immobilization. Carboxyl group-containing self-assembled monolayer (COOH-SAM) reagent was then added to the cleaned gold electrode of the QCM and incubated for 1 h at room temperature. The sensor was washed with Milli-Q water, and the resultant carboxylic groups introduced to the sensor surface were next activated by adding 50 μl of a freshly prepared 1:1 mixture of *N*-hydroxysuccinimide and 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (50 mg/ml each).

After washing the sensor, 0.5 ml of ESC7 samples (50 μM) in reaction buffer (10 mM citrate buffer, pH 5.0) was added to initiate the binding reaction. This lower pH buffer was necessary to improve the binding of ESC7. For A β (1–40), a solution of 5 μM A β (1–40) in Buffer B was added to the cell, and binding was allowed to proceed in a similar manner. After monitoring the changes in resonance frequency (ΔF) for a designated interval sufficient for binding, the sample was removed and ethanol-

amine solution was added to rinse the sensor. The cell was then equilibrated with experimental buffer (Buffer A for ESC7, Buffer B for A β (1–40)), followed by the addition of ligand protein solution (containing GroEL mutants) to initiate the assay.

In contrast, immobilization of αSyn -His₆ samples to the sensor was performed using an alternative method involving nickel affinity binding of the C-terminal His₆ tag, to minimize nonspecific interactions between αSyn and the sensor surface. After initializing the sensor chamber by washing the cells with SDS and piranha solution as described above, 100 μl of a solution containing 0.5 mM 3,3'-dithiobis[*N*-(5-amino-5-carboxypentyl)propionamide-*N'*, *N'*-diacetic acid] dihydrochloride (C₂-NTS, Dojindo) was added to the cell and incubated for 10 min at room temperature. This solution was washed away with Milli-Q water, and 500 μl of Buffer D was added and allowed to sit for 10 min at room temperature. Afterward, the cell was again washed with Milli-Q, and then 0.1 μM of αSyn -His₆ in Buffer B was added to the cell. The binding of αSyn -His₆ to the activated sensor was allowed to proceed under observation for 10 min at 25 °C under mixing. Afterward, the cells were washed with Buffer B before adding the respective GroEL samples for the actual measurements in Buffer B. Regeneration of the initial experimental conditions was accomplished after each measurement by washing the sensor cell with Milli-Q, adding 500 μl of Buffer E for 30 min to remove αSyn -His₆, and reapplying Buffer D and fresh αSyn -His₆ solutions, as described above.

In quantitative analyses (Fig. 6E), data were analyzed using the software package provided by the manufacturer of the instrument (AQUA 2.0) by linear regression analysis of the observed rate constant (k_{obs}) relative to the concentration of added GroEL G192W mutant, according to the following equation

$$k_{\text{obs}} = k_{\text{off}} + k_{\text{on}}[\text{GroEL}] \quad (\text{Eq. 1})$$

to estimate k_{off} and k_{on} values, which were subsequently used to estimate the K_D .

Fluorescence Detection of Fibril Maturation using Th-T—Fibril formation of αSyn was monitored using Th-T fluorescence as described in previous studies (21). One milligram per milliliter of αSyn was incubated either alone or in the presence of 2.76 mg/ml GroEL WT or G192X mutants at 37 °C in Buffer F. Samples (150 μl) were prepared in triplicate in 96-well plates (8 \times 12-well plate; Greiner, Kremsmuenster, Austria) and placed into an ARVO X4 (Perkin Elmer) plate reader that was capable of sustained sample agitation. Increases in Th-T fluorescence were monitored intermittently through the bottom of the plate (read times, 0.1 s; excitation, 440 nm; emission, 486 nm). Data were averaged across the three samples to obtain time-dependent fibrillogenesis traces with TEM.

TEM Analysis—In this study, samples for TEM analysis were obtained from samples measured in Th-T fluorescence assays (Figs. 7 and 9), as described under "Fluorescence Detection of Fibril Maturation using Th-T," with the exception of the control sample of αSyn depicted in Fig. 8. After each fluorescence assay, representative aliquots (10 μl) of each sample were randomly sampled from the wells and applied to carbon-coated 400-mesh copper grids (Nisshin-EM, Tokyo, Japan), and sam-

ple preparation was performed according to the protocol described in Ojha *et al.* (21) using EM Stainer (Nissin-EM, Tokyo). TEM images were obtained using a JEOL JEM-1400Plus transmission electron microscope at 80 kV. For the control α Syn sample in Fig. 8, TEM images were obtained from 2% uranyl acetate-stained samples observed at $\times 27,000$ magnification, with images obtained using a film camera mounted on a JEOL-100CX transmission electron microscope operating at 80 kV. Film negatives were scanned using a commercial flatbed scanner (Canon) at resolutions and sizes that match the resolution and sizes of the digital images obtained for the other samples.

Author Contributions—N. F., T. M., and Y. K. designed the research, and N. F., K. A., and K. H. performed the research. N. F., T. M., and Y. K. wrote the main manuscript text and prepared the figures. All authors reviewed the manuscript.

References

- Hayer-Hartl, M., Bracher, A., and Hartl, F. U. (2016) The GroEL-GroES chaperonin machine: a nano-cage for protein folding. *Trends Biochem. Sci.* **41**, 62–76
- Saibil, H. R., Fenton, W. A., Clare, D. K., and Horwich, A. L. (2013) Structure and allostery of the chaperonin GroEL. *J. Mol. Biol.* **425**, 1476–1487
- Sharma, S., Chakraborty, K., Müller, B. K., Astola, N., Tang, Y. C., Lamb, D. C., Hayer-Hartl, M., and Hartl, F. U. (2008) Monitoring protein conformation along the pathway of chaperonin-assisted folding. *Cell* **133**, 142–153
- Lin, Z., Madan, D., and Rye, H. S. (2008) GroEL stimulates protein folding through forced unfolding. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **15**, 303–311
- Chaudhuri, T. K., Verma, V. K., and Maheshwari, A. (2009) GroEL assisted folding of large polypeptide substrates in *Escherichia coli*: present scenario and assignments for the future. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **99**, 42–50
- Wood, S. J., Wypych, J., Stevenson, S., Louis, J. C., Citron, M., and Biere, A. L. (1999) α -Synuclein fibrillogenesis is nucleation-dependent. Implications for the pathogenesis of Parkinson's disease. *J. Biol. Chem.* **274**, 19509–19512
- Selkoe, D. J. (1997) Alzheimer's disease: genotypes, phenotypes, and treatments. *Science* **275**, 630–631
- Jacobson, D. R., and Buxbaum, J. N. (1991) Genetic aspects of amyloidosis. *Adv. Hum. Genet.* **20**, 69–123
- Lu, J. X., Qiang, W., Yau, W. M., Schwieters, C. D., Meredith, S. C., and Tycko, R. (2013) Molecular structure of β -amyloid fibrils in Alzheimer's disease brain tissue. *Cell* **154**, 1257–1268
- Ohi, T., Nabeshima, K., Kato, S., Yazawa, S., and Takechi, S. (2004) Familial amyotrophic lateral sclerosis with His46Arg mutation in Cu/Zn superoxide dismutase presenting characteristic clinical features and Lewy body-like hyaline inclusions. *J. Neurol. Sci.* **225**, 19–25
- Uversky, V. N. (2008) Amyloidogenesis of natively unfolded proteins. *Curr. Alzheimer. Res.* **5**, 260–287
- Uversky, V. N., Oldfield, C. J., Midic, U., Xie, H., Xue, B., Vucetic, S., Iakoucheva, L. M., Obradovic, Z., and Dunker, A. K. (2009) Unfoldomics of human diseases: linking protein intrinsic disorder with diseases. *BMC Genomics* **10**, Suppl. 1, S7
- Knight, S. D., Presto, J., Linse, S., and Johansson, J. (2013) The BRICHOS domain, amyloid fibril formation, and their relationship. *Biochemistry* **52**, 7523–7531
- Mainz, A., Peschek, J., Stavropoulou, M., Back, K. C., Bardiaux, B., Asami, S., Prade, E., Peters, C., Weinkauff, S., Buchner, J., and Reif, B. (2015) The chaperone α B-crystallin uses different interfaces to capture an amorphous and an amyloid client. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **22**, 898–905
- Wacker, J. L., Zareie, M. H., Fong, H., Sarikaya, M., and Muchowski, P. J. (2004) Hsp70 and Hsp40 attenuate formation of spherical and annular polyglutamine oligomers by partitioning monomer. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**, 1215–1222
- Shorter, J., and Lindquist, S. (2008) Hsp104, Hsp70 and Hsp40 interplay regulates formation, growth and elimination of Sup35 prions. *EMBO J.* **27**, 2712–2724
- Glucken, J., Shin, Y., Masliah, E., Hyman, B. T., and McLean, P. J. (2004) Hsp70 reduces α -synuclein aggregation and toxicity. *J. Biol. Chem.* **279**, 25497–25502
- Nishida, N., Yagi-Utsumi, M., Motojima, F., Yoshida, M., Shimada, I., and Kato, K. (2013) Nuclear magnetic resonance approaches for characterizing interactions between the bacterial chaperonin GroEL and unstructured proteins. *J. Biosci. Bioeng.* **116**, 160–164
- Yagi-Utsumi, M., Kuniyama, T., Nakamura, T., Uekusa, Y., Makabe, K., Kuwajima, K., and Kato, K. (2013) NMR characterization of the interaction of GroEL with amyloid β as a model ligand. *FEBS Lett.* **587**, 1605–1609
- Noi, K., Kitamura, A., Hirai, H., Hongo, K., Sakurai, T., Mizobata, T., and Kawata, Y. (2012) Suppression of Sup35 amyloid fibril formation by group II chaperonin from *Thermoplasma acidophilum*. *Am. J. Mol. Biol.* **2**, 265–275
- Ojha, B., Fukui, N., Hongo, K., Mizobata, T., and Kawata, Y. (2016) Suppression of amyloid fibrils using the GroEL apical domain. *Sci. Rep.* **6**, 31041
- Machida, K., Fujiwara, R., Tanaka, T., Sakane, I., Hongo, K., Mizobata, T., and Kawata, Y. (2009) Gly192 at hinge 2 site in the chaperonin GroEL plays a pivotal role in the dynamic apical domain movement that leads to GroES binding and efficient encapsulation of substrate proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1794**, 1344–1354
- Darby, N. J., and Creighton, T. E. (1993) *Protein Structure: In Focus*, IRL Press at Oxford University Press, Oxford, UK
- Sakane, I., Hongo, K., Motojima, F., Murayama, S., Mizobata, T., and Kawata, Y. (2007) Structural stability of covalently linked GroES heptamer: advantages in the formation of oligomeric structure. *J. Mol. Biol.* **367**, 1171–1185
- Shammas, S. L., Waudby, C. A., Wang, S., Buell, A. K., Knowles, T. P., Ecroyd, H., Welland, M. E., Carver, J. A., Dobson, C. M., and Meehan, S. (2011) Binding of the molecular chaperone α B-crystallin to A β amyloid fibrils inhibits fibril elongation. *Biophys. J.* **101**, 1681–1689
- Kulig, M., and Ecroyd, H. (2012) The small heat-shock protein α B-crystallin uses different mechanisms of chaperone action to prevent the amorphous versus fibrillar aggregation of α -lactalbumin. *Biochem. J.* **448**, 343–352
- Hochberg, G. K., Ecroyd, H., Liu, C., Cox, D., Cascio, D., Sawaya, M. R., Collier, M. P., Stroud, J., Carver, J. A., Baldwin, A. J., Robinson, C. V., Eisenberg, D. S., Benesch, J. L., and Laganowsky, A. (2014) The structured core domain of α B-crystallin can prevent amyloid fibrillation and associated toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **111**, E1562–E1570
- Glover, J. R., and Lindquist, S. (1998) Hsp104, Hsp70, and Hsp40: a novel chaperone system that rescues previously aggregated proteins. *Cell* **94**, 73–82
- Dedmon, M. M., Christodoulou, J., Wilson, M. R., and Dobson, C. M. (2005) Heat shock protein 70 inhibits α -synuclein fibril formation via preferential binding to prefibrillar species. *J. Biol. Chem.* **280**, 14733–14740
- Kitamura, A., Kubota, H., Pack, C. G., Matsumoto, G., Hirayama, S., Takahashi, Y., Kimura, H., Kinjo, M., Morimoto, R. I., and Nagata, K. (2006) Cytosolic chaperonin prevents polyglutamine toxicity with altering the aggregation state. *Nat. Cell Biol.* **8**, 1163–1170
- Tam, S., Geller, R., Spiess, C., and Frydman, J. (2006) The chaperonin TRiC controls polyglutamine aggregation and toxicity through subunit-specific interactions. *Nat. Cell Biol.* **8**, 1155–1162
- Shahmoradian, S. H., Galaz-Montoya, J. G., Schmid, M. F., Cong, Y., Ma, B., Spiess, C., Frydman, J., Ludtke, S. J., and Chiu, W. (2013) TRiC's tricks inhibit huntingtin aggregation. *Elife* **2**, e00710
- Yagi, H., Kusaka, E., Hongo, K., Mizobata, T., and Kawata, Y. (2005) Amyloid fibril formation of α -synuclein is accelerated by preformed amyloid seeds of other proteins: implications for the mechanism of transmissible conformational diseases. *J. Biol. Chem.* **280**, 38609–38616

Engineered Chaperonins Modulate Fibrillogenesis

34. Lanzetta, P. A., Alvarez, L. J., Reinach, P. S., and Candia, O. A. (1979) An improved assay for nanomole amounts of inorganic phosphate. *Anal. Biochem.* **100**, 95–97
35. Kubo, T., Mizobata, T., and 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
36. Xu, Z., Horwich, A. L., and Sigler, P. B. (1997) The crystal structure of the asymmetric GroEL-GroES-(ADP)₇ chaperonin complex. *Nature* **388**, 741–750
37. Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., and Ferrin, T. E. (2004) UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* **25**, 1605–1612

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Suppression of amyloid fibrils using the GroEL apical domain

Bimlesh Ojha¹, Naoya Fukui¹, Kunihiro Hongo^{1,2}, Tomohiro Mizobata^{1,2} & Yasushi Kawata^{1,2}

Received: 22 March 2016

Accepted: 12 July 2016

Published: 04 August 2016

In *E. coli* cells, rescue of non-native proteins and promotion of native state structure is assisted by the chaperonin GroEL. An important key to this activity lies in the structure of the apical domain of GroEL (GroEL-AD) (residue 191–376), which recognizes and binds non-native protein molecules through hydrophobic interactions. In this study, we investigated the effects of GroEL-AD on the aggregation of various client proteins (α -Synuclein, A β 42, and GroES) that lead to the formation of distinct protein fibrils *in vitro*. We found that GroEL-AD effectively inhibited the fibril formation of these three proteins when added at concentrations above a critical threshold; the specific ratio differed for each client protein, reflecting the relative affinities. The effect of GroEL-AD in all three cases was to decrease the concentration of aggregate-forming unfolded client protein or its early intermediates in solution, thereby preventing aggregation and fibrillation. Binding affinity assays revealed some differences in the binding mechanisms of GroEL-AD toward each client. Our findings suggest a possible applicability of this minimal functioning derivative of the chaperonins (the “minichaperones”) as protein fibrillation modulators and detectors.

Cellular misfolding of proteins and their progression to stable, ordered fibrillar aggregates is closely related to a number of pathological events collectively referred to as amyloid diseases or amyloidoses. Amyloid diseases represent a family of over 25 diverse pathological conditions in humans, including neurodegenerative disorders such as Alzheimer’s disease (AD) and Parkinson’s disease (PD), as well as various metabolic and genetic syndromes such as Type II diabetes and hereditary systemic amyloidosis^{1–3}. More than 20 different types of amyloid forming proteins or peptides have been identified so far, including α -Synuclein, amyloid beta (A β), and superoxide dismutase^{2–5}. Recent studies also argue that many proteins not normally associated with disease are capable of forming amyloid fibrils under suitable experimental conditions *in vitro*^{6,7}, and it has been suggested that almost all proteins generally have at least one structural segment that is susceptible to aggregation⁸. In spite of differences in the sequences of different amyloid forming proteins, all amyloids share a common structural motif: an ordered cross- β -sheet elongated fibrillar structure with a diameter ranging from 5 to 15 nm, formed by multiple layers of β -sheet lying in a direction parallel to the fibril axis^{9,10}. The formation of amyloid fibrils is a multistep process involving an initial nucleation event followed by transformations through different intermediate molecular forms such as oligomers, protofibrils and fibrils^{11–14}. Each of these intermediate species seem to display their own molecular characteristics and differences in their relative toxicity toward living cells.

Extensive studies to probe the underlying mechanism of amyloid fibril formation have been performed with a view to achieving an eventual methodology to prevent the production of cytotoxic molecular species^{14–18}. In line with this objective, many instances have been reported where various molecular chaperones, an endogenous group of proteins known to interact specifically with proteins and prevent their aggregation, have interacted to suppress or modulate the formation of amyloids. Examples of such interactions include the Hsp104-Hsp70-Hsp40 system^{19–23}, small heat shock proteins such as α B-crystallin^{24–26}, and members of the chaperonin family (TricC)^{27–30}. In each of the cases above, the respective molecular chaperone was capable of specifically recognizing, mainly through hydrophobic interactions, aggregation-prone target molecules and either suppress interactions that lead to aggregation entirely or shunt these molecules toward an alternate non-toxic form. We became curious as to whether there were any underlying common principles that ran common to all of these molecular interactions.

The bacterial chaperonin GroEL from *E. coli* is a quintessential molecular chaperonin involved in the maintenance of protein integrity in this organism^{31–33}. Detection of aggregation-prone molecules is accomplished through the apical domain of GroEL, which spans residues 191–376 of the 548-residue GroEL monomer (Fig. 1).

¹Department of Chemistry and Biotechnology, Graduate School of Engineering Tottori University, Tottori 680-8552, Japan. ²Department of Biomedical Science, Institute of Regenerative Medicine and Biofunction, Graduate School of Medical Science, Tottori University, Tottori 680-8552, Japan. Correspondence and requests for materials should be addressed to Y.K. (email: kawata@bio.tottori-u.ac.jp)

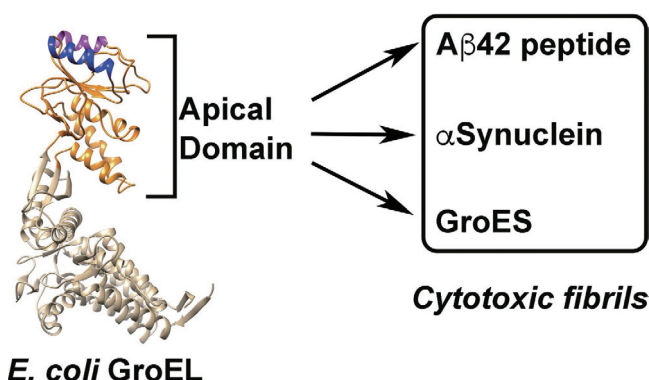


Figure 1. Overall concept of the present study. *Left*, structure of *E. coli* GroEL subunit derived from PDB 1SVT⁶⁹. The two helical regions (Helix H, residues Leu234–Ala243 in *magenta*, and Helix I, residues Gly256–Arg268 in *blue*⁷⁰) that form the binding interface for unfolded protein and the co-chaperonin GroES are highlighted. Models were drawn using UCSF Chimera⁷¹. The isolated apical domain was used to modulate the fibrillogenesis of three target peptides (A β 42, α -Synuclein, and GroES). All three polypeptides have either been implicated in the pathogenesis of various diseases, or displayed cytotoxic tendencies in previous experiments⁵⁰.

Bound molecules are then moved into the central cavity of the GroEL 14-mer^{34–37}, and are segregated for a predetermined interval from other similar molecules in solution. The molecular mechanism of GroEL-facilitated folding is characterized foremost by its versatility, and previous studies have shown that GroEL is capable of assisting the folding of various proteins regardless of its original source. Recent studies have shown, in fact, that GroEL is capable of recognizing and binding to various polypeptides implicated in amyloid-related diseases; NMR studies have shown explicitly that A β peptide³⁸ and α -Synuclein³⁹ are both recognized by the apical domain of GroEL and are bound at specific sites.

A notable characteristic of *E. coli* GroEL lies in the finding that the isolated apical domain of GroEL (GroEL-AD, Fig. 1) is known to retain its structural integrity and functionality in solution. Previous studies have shown that GroEL-AD possesses a high chaperone (aggregation suppressing) activity, and that GroEL-AD must have an intrinsic chaperone activity that is not dependent on structural and functional characteristics displayed by the original GroEL oligomer. This novel chaperone activity has inspired the name “minichaperone” for this domain⁴⁰.

By utilizing the minichaperone architecture of GroEL, it becomes possible to directly analyze the numerous interactions and dynamics that are involved in the recognition and binding of fibril-forming protein molecules to GroEL. Therefore, in this study, we first establish the effects of GroEL-AD on the aggregation of various proteins that form fibril structures, including α -Synuclein, A β 42 and GroES, using a combination of biophysical and biochemical methods (Fig. 1). Our results confirm that GroEL-AD is capable of recognizing and binding to these unfolded client proteins and suppress fibril formation of each. Curiously, further experiments revealed various differences in the modes of binding between these three proteins and GroEL-AD. These findings are discussed in context of the myriad molecular interactions that are involved in this phenomenon.

Results

GroEL-AD interacts with and suppresses fibrillation of multiple proteins. We have investigated the effect of GroEL-AD on the aggregation of three client proteins (α -Synuclein, A β 42 and GroES) using the ThT binding assay⁴¹. Each client protein has been confirmed to form amyloid fibrils. α -Synuclein has been implicated in the pathogenesis of PD^{42–45} and A β 42 deposits are correlated with the onset of AD^{46–48}. GroES has not been implicated in the pathogenesis of any specific diseases to date; however, preparations of GroES have been shown to form characteristic amyloid fibrils under denaturing conditions such as moderate concentrations of Gdn-HCl⁴⁹. Interestingly, intermediate oligomeric forms of GroES that are formed during fibrillogenesis display cytotoxicity toward cultured mouse neuron cells⁵⁰. As shown in Fig. 2a–c, all three clients, α -Synuclein, A β 42 and GroES, formed ThT-detectable molecular species after an initial incubation period ranging from 0–6 hrs. The ThT signal in each case displayed a characteristic sigmoidal curve typical to amyloid fibril formation, involving initial formation of fibril seeds followed by fibril extension^{51,52}. The addition of GroEL-AD to each experiment dramatically affected the aggregation profile of these client proteins in a dose-dependent manner. At sub-stoichiometric molar ratios (1:0.5 for α -Synuclein, 1:1 for A β 42 and 1:0.5 for GroES; Fig. 2a–c) the effects of GroEL-AD addition were reflected in an increase in the initial lag phase of the transition, and a decrease in the cumulative ThT fluorescence intensity after prolonged incubation. At higher ratios of client protein to GroEL-AD (1:1 and 1:2 for α -Synuclein, 1:5 and 1:10 for A β 42, 1:1 and 1:2 for GroES), these two effects were both strengthened. For each client protein, adding a high molar excess of GroEL-AD resulted in the almost complete suppression of fibril formation, demonstrating the strong inhibitory activity of GroEL-AD on the amyloid formation of these client proteins. In control experiments, GroEL-AD by itself showed no tendency to form ThT-responsive aggregates in any of the experimental conditions that we used (Fig. 2a–d, *black traces*). The concentration of GroEL-AD required to completely suppress ThT fluorescence increase differed for each client (α -Synuclein:GroEL-AD = 1:3, A β 42:GroEL-AD = 1:20 and GroES:GroEL-AD = 1:4), reflecting differences in efficiency on the part of GroEL-AD toward stopping the fibril formation of these three client proteins.

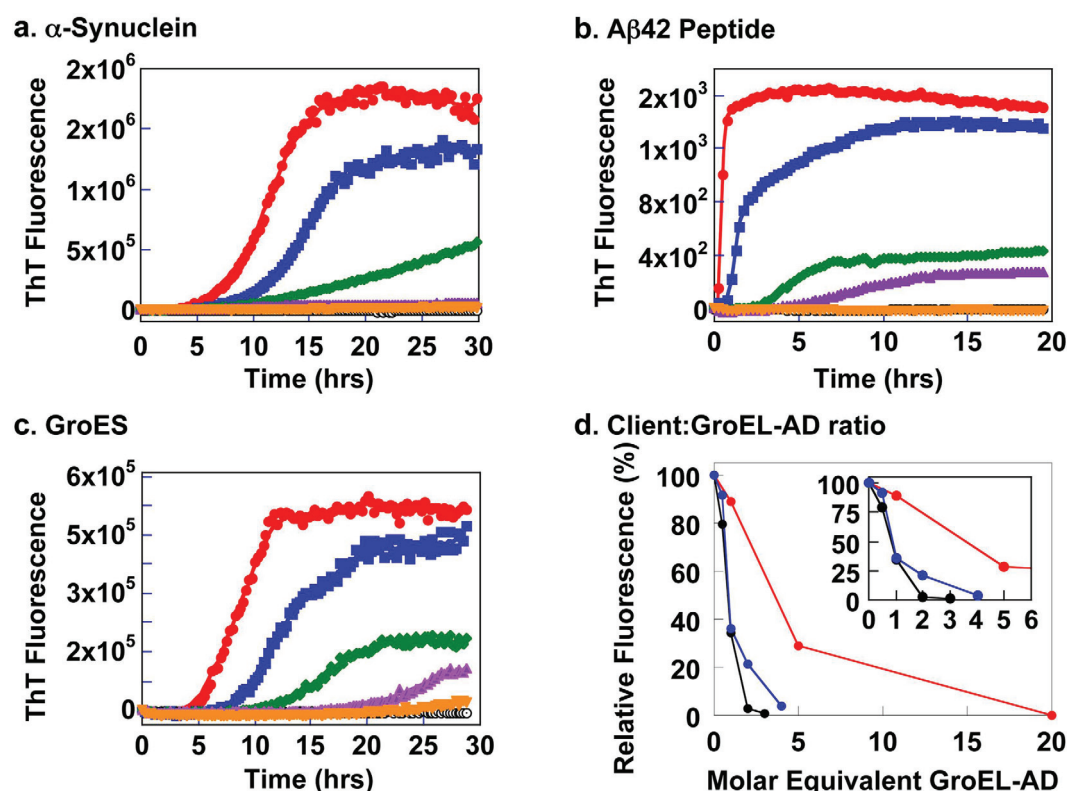


Figure 2. Aggregation kinetics of client proteins in the absence and presence of increasing concentrations of GroEL-AD, as accessed by ThT binding assay. (a) α -Synuclein; (b) A β 42 peptide; (c) GroES. For panels (a–c), the red filled circles denote fluorescence values in the absence of GroEL-AD, and the black open symbols denote changes in ThT fluorescence caused by incubation of GroEL-AD alone under identical conditions. The concentration of GroEL-AD added to each experiment was increased according to the following progression of symbols: blue filled squares, green filled diamonds, magenta filled triangles, and orange filled inverted triangles. The specific value of client:GroEL-AD used in each sample (calculated relative to the monomeric molar concentration of client) are as follows in increasing order: (a) 1:0.5, 1:1, 1:2, 1:3; (b) 1:1, 1:5, 1:10, 1:20; (c) 1:0.5, 1:1, 1:2, 1:4. (d) Comparison of the relative effects of GroEL-AD addition on the cumulative fluorescence signal of each client protein. The values are normalized according to the fluorescence values observed for each client protein at the end of the experiment performed in the absence of additional GroEL-AD. The inset to panel (d) is an expansion of the main figure that shows the dependencies at low ratios of GroEL-AD to client.

Morphology of protein fibrils formed in the presence of GroEL-AD. We next assessed the effects of GroEL-AD on the structure of resultant protein fibrils using AFM (Fig. 3). As shown in the leftmost block in Fig. 3, each client protein could form typical amyloid fibrils after prolonged incubation. Incubation of GroEL-AD under similar conditions did not lead to significant aggregation, nor to amyloid fibril formation (Fig. 3, “GroEL-AD-only”). The addition of GroEL-AD to each client protein in substoichiometric to stoichiometric molar ratios (Fig. 3, center block) interestingly failed to produce any clearly apparent changes in the morphology of these amyloid fibrils, except for a slight variation in their total observable numbers and the absence of fibrillar clusters. At higher ratios of GroEL-AD to client proteins fibrillar structures were still observable. However, shorter fibrils were more apparent in each case, and a slight decrease was seen in the total amount of fibrils visible in the experiment. Under these conditions, some small, amorphous aggregates were also observed alongside the fibrils. Finally, in the presence of excess concentrations of GroEL-AD (1:3 for α -Synuclein, 1:20 for A β 42 and 1:4 for GroES) relative to each client protein, we observed no mature fibrils, and some small spherical aggregated structures were seen instead, which may either be amorphous aggregate forms of target protein or excess GroEL-AD (Fig. 3, rightmost block; compare with images of GroEL-AD only, lowest block). Our results seem to suggest that the participation of GroEL-AD in the fibrillation reaction generally does not cause any overt changes in the fibril morphology of the fibril-forming client protein, and rather acts to suppress the amount of fibrils that are ultimately formed by each client.

In order to characterize the effects of GroEL-AD on the morphology of protein fibrils formed by the three targets of our study in more detail, we next performed transmission electron microscopy (TEM) experiments on fibrils formed by each protein in the presence of GroEL-AD (Fig. 4). In these experiments, we also performed control experiments in which bovine serum albumin was added in place of GroEL-AD at an equivalent molar concentration (Fig. 4, blue traces). For each experiment, the molar concentration of GroEL-AD and BSA that was

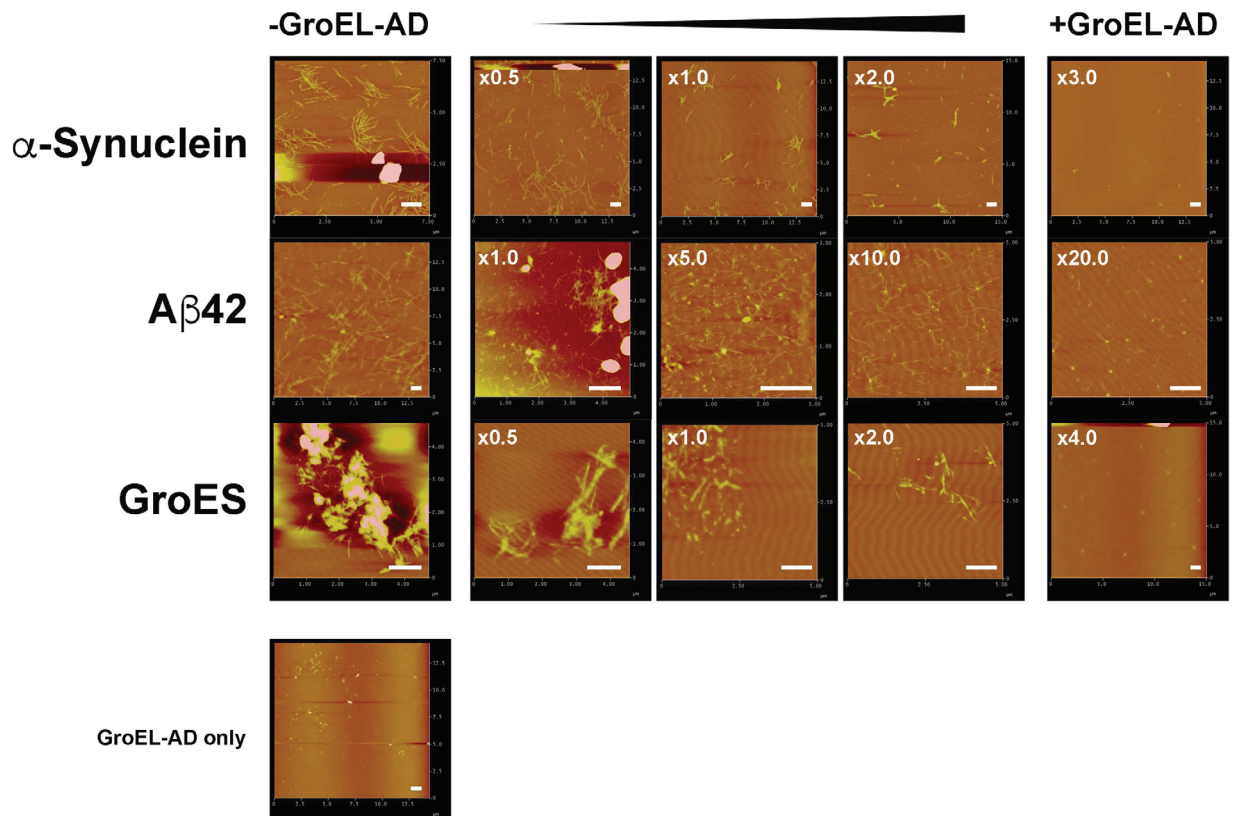


Figure 3. AFM images of various fibril-forming client proteins and GroEL-AD samples. Each image is a 512×512 pixel AFM scan of a given square area of the mica-bound sample. The *leftmost* column shows fibril samples formed in the absence of additional GroEL-AD, the three *center* columns display images of fibrils formed in the presence of increasing concentrations of additional GroEL-AD, and the *rightmost* column shows images of fibrils formed in the presence of GroEL-AD at concentrations sufficient to completely suppress the ThT fluorescence signal in assays shown in Fig. 2. *Top* (first) row, α -Synuclein, *middle* (second) row, A β 42, *lower* (third) row, GroES. The *bottommost* image (fourth row) shows an image of GroEL-AD incubated under conditions identical to those used for fibril formation of α -Synuclein. Where apparent, the values at the *upper lefthand corner* of each panel denotes the actual molar equivalent of GroEL-AD that was added to samples, relative to the monomeric concentration of client protein, and at the *lower right hand corner* of each panel, a white scale bar denotes a length of $1 \mu\text{m}$.

added was set to the molar concentrations used in the *green traces* shown in Fig. 2 (corresponding to molar ratios of 1:1 for α -Synuclein; 1:5 for A β 42; and 1:1 for GroES). We note here that GroEL-AD alone, and BSA alone, failed to produce ThT-positive fluorescence signals in control experiments performed in parallel (Fig. 4, *gray and green traces*).

As shown in Fig. 4, an unexpected and interesting result was observed in each of the control experiments that we performed, which showed that addition of BSA was effective in modulating the fibril formation reaction of all three target proteins to a certain extent. However, for each target protein, GroEL-AD was more effective in fibril suppression at equivalent molar concentrations, demonstrating an effect that went beyond the presumed “non-specific” effects of BSA on fibril formation. Curiously, the effects of “non-specific” BSA addition differed for each target. In the case of A β 42, BSA addition served to slightly decrease the overall amount of ThT-positive signal with no effects in lag time or fibrillation rate (Fig. 4a, *leftmost panel*). In contrast, for GroES, BSA served to lengthen significantly the lag time, *e. g.*, the interval required to form the initial seeds from which GroES fibrils form, with minimal effect on the rate of fibrillation (Fig. 4c, *leftmost panel*). And finally, for α -Synuclein, the effect of BSA addition acted on both the lag time and the rate of fibril formation (Fig. 4b, *leftmost panel*). This differential effect of BSA addition on the fibril forming reactions of these three target proteins may reflect differences in the specific molecular interactions that propel the fibrillation reaction of each target protein.

To probe for differences in the morphologies of fibrils formed under the various conditions shown in Fig. 4, we took samples from the end of each assay that displayed positive ThT signals and subjected them to TEM analysis. The panels displayed on the *right* of Fig. 4 summarize our results. For each target protein, we were unable to detect overt differences in the fibril morphologies between each experimental condition, save for two exceptions. The first was seen in the fibril samples of A β formed in the presence of BSA, where we observed that the fibrils tended to be much shorter in length than the fibrils formed by A β alone or A β in the presence of GroEL-AD. The second was seen in fibril samples formed by α -Synuclein in the presence of GroEL-AD, where the width of the fibrils seemed to be markedly thinner in the TEM images, compared to the other two conditions. Apart from these two

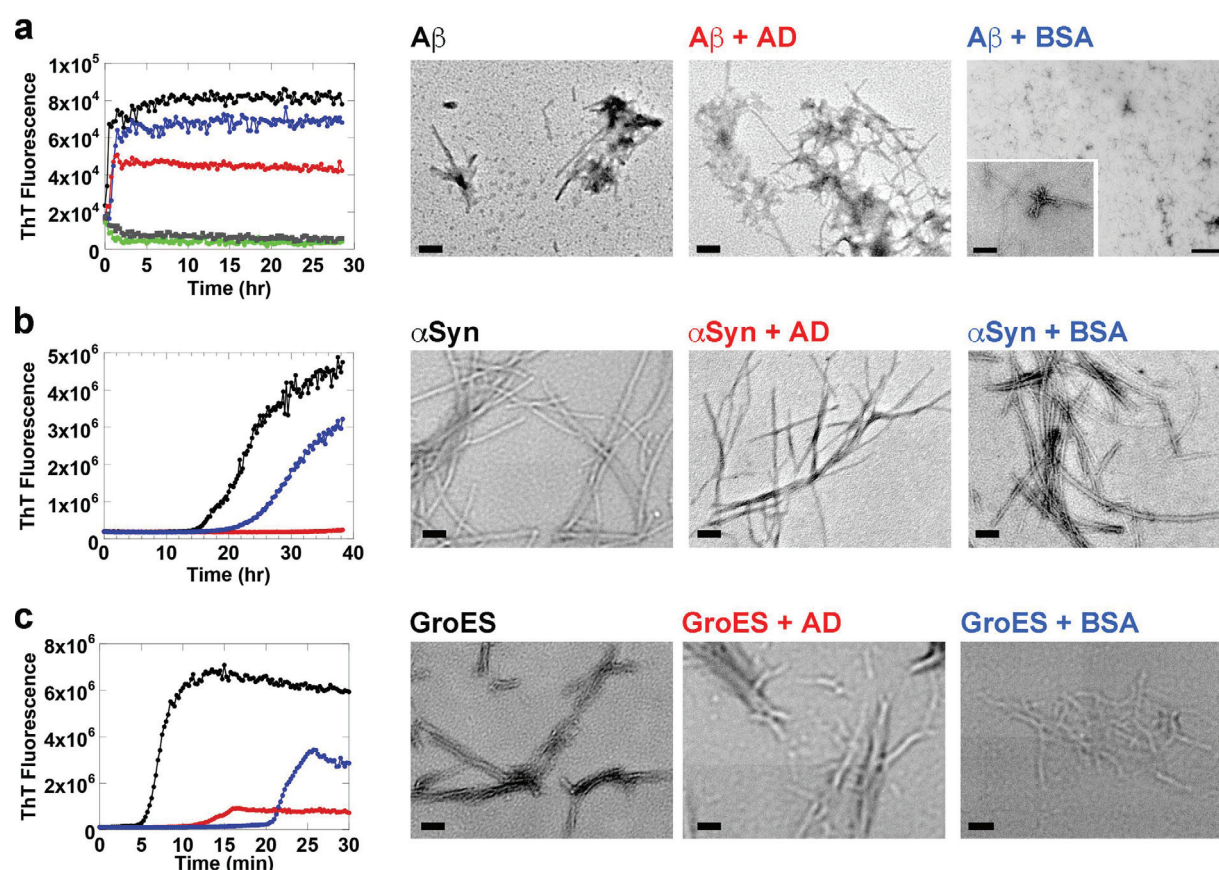


Figure 4. Analyses of fibril morphology using TEM. Samples of target proteins were incubated according to the conditions used in Fig. 2 and monitored with agitation in an ARVO X4 plate reader. Block a (*upper panels*) represents experiments performed on A β 42, block b (*center panels*) represents experiments performed on α -Synuclein, and block c (*lower panels*) represents experiments involving GroES. *Gray traces and light green traces* in the time trace of block a (*uppermost left*) denote changes in ThT fluorescence for BSA and GroEL-AD, respectively, at a molar concentration of 50 μ M. Target proteins were either incubated alone (denoted in *black*) or in the presence of either GroEL-AD (denoted in *red*) or BSA (denoted in *blue*). The concentrations of GroEL-AD and BSA added were set to the following molar ratios relative to target monomer: A β 42, 1:5; α -Synuclein, 1:1; and GroES, 1:1. After each experimental session, aliquots from each sample that displayed a positive ThT fluorescence signal were subject to TEM analysis. The images shown to the *right* of each time course display the results of TEM analysis. The magnification used in each panel was set to 30,000 magnification, with the exception of the “A β + BSA” sample panel shown in the *uppermost right corner* of the figure. In this panel the magnification is set to 4,000x magnification, and the *lower left inset* depicts an image taken at 100,000x magnification that was adjusted digitally to correspond to 30,000x magnification using image manipulation tools.

instances, the overall shape of the fibrils seemed to be unchanged, supporting overall the results observed in AFM experiments (Fig. 3).

We next probed the effects of delayed addition of GroEL-AD during the fibril formation reaction of each client protein (Fig. 5) to probe the abilities of GroEL-AD to affect the process at various stages of the reaction. Each client protein was allowed to proceed with the fibrillation reaction for a predetermined interval (α -Synuclein; for 0, 3, 8 and 24 hr (Fig. 5a), A β 42; for 0, 0.5, 1.5 and 8 hr (Fig. 5b), and GroES; for 0, 6, 10 and 24 hr (Fig. 5c)) before adding GroEL-AD at concentrations that were sufficient to completely suppress fibril formation as determined in Fig. 2 (3-fold molar excess for α -Synuclein, 20-fold molar excess for A β 42, and 4-fold molar excess for GroES, respectively). In each experiment, our results indicated that the delayed addition of GroEL-AD could not reverse the process of fibril formation, but was quite successful in preventing further fibril extension. The effects of GroEL-AD addition were immediate in each data trace. Complete inhibition of fibrils could be achieved only when GroEL-AD was added at the very beginning of fibril formation, irrespective of the client protein monitored. Also, in the time frame of these experiments we could not observe a state where the client proteins were able to “escape” from the effects of GroEL-AD addition; *i.e.*, the suppressive effects of GroEL-AD addition were detected throughout the course of the fibril forming reaction. From these observations, as well as the data obtained by AFM shown in Fig. 3 and the TEM images shown in Fig. 4, we concluded that GroEL-AD acts mainly by binding to soluble monomeric unfolded client protein or the various intermediates to decrease the concentration of fibril-forming molecular species in the reaction, and does not have the ability to modify the structure of protein

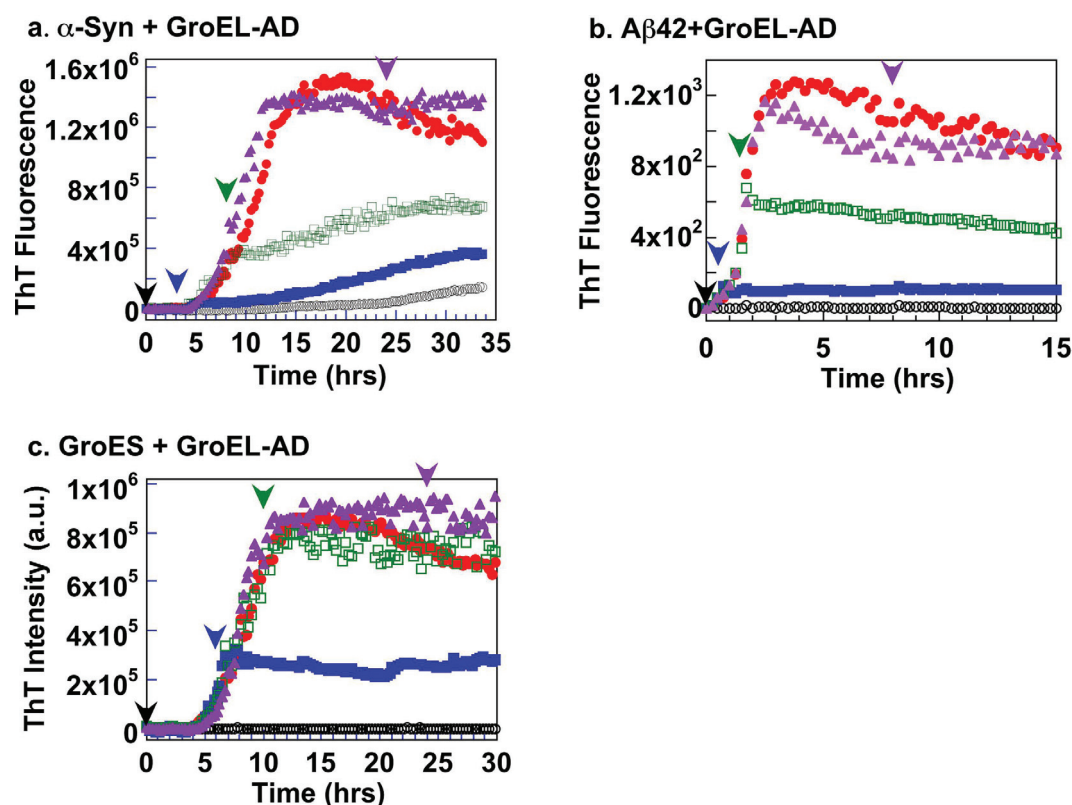


Figure 5. Delayed addition of GroEL-AD to the fibril forming reactions of each client protein. In each panel, colored arrowheads denote the instant at which excess GroEL-AD was added to each corresponding color-coded trace of the experiment. (a) α -Synuclein. GroEL-AD (3-fold molar excess) was added at 0 (black), 3 (blue), 8 (green) and 24 (magenta) hours after initiating the experiment. (b) A β 42 peptide. GroEL-AD (20-fold molar excess) was added at 0 (black), 0.5 (blue), 1.5 (green) and 8 (magenta) hours after initiating the experiment. (c) GroES in 0.4 M Gdn-HCl. GroEL-AD (4-fold molar excess) was added at 0 (black), 6 (blue), 10 (green) and 24 (magenta) hours after initiating the experiment.

fibrils in a detectable manner. A similar partitioning mechanism that modulates the concentration of free protein has been reported for the effects of Hsp70 and Hsp40 on the formation of oligomeric huntingtin⁵³. We note, however, that in the case of α -Synuclein, GroEL-AD may be interacting additionally to slightly alter the morphology of resultant fibrils (Fig. 4, " α Syn + AD").

Binding mechanisms of client proteins to GroEL-AD. In order to probe the nature of the binding interactions between GroEL-AD and various client proteins in more detail, we measured the binding affinities of GroEL-AD toward each client directly using QCM-based mass measuring as shown in Figs 6 and 7. QCM is a sensitive tool to determine intermolecular binding interactions with high precision by detecting small changes in the intrinsic frequency of a quartz crystal sensor, which is caused by changes in the mass of ligands bound to host proteins immobilized onto the sensor surface^{54,55}. Figure 6a shows representative sensorgrams of interactions between GroEL-AD and various client proteins (concentration of injected soluble protein: 100 ng/ μ l). We note that the resonance frequency of the sensor decreased rapidly upon injection of each client protein, and that no significant change in resonance frequency was detected when only buffer was added to sensor with immobilized GroEL-AD (Fig. 6a, *Baseline*). A closer look at the individual sensorgrams revealed more subtle differences between the binding behavior of the three client proteins. In the case of GroES and α -Synuclein, the sensorgrams more or less displayed an exponential decrease that could be analyzed further (see below). In contrast, the sensorgrams for A β 42 were characterized by an initial rapid change in frequency followed by a pronounced and gradual drift in the ΔF signal, which might be reflective of multivalent or non-specific binding. Upon further experimentation, the ΔF values between each session were also rather erratic in experiments involving A β 42, compared to the other two clients. This observation, taken together with the relatively small molecular size of A β 42 and the relatively high concentrations of GroEL-AD needed to suppress fibril formation of A β 42 (Fig. 2), suggested that the binding interactions between these two proteins were highly dynamic and transient in nature, and not suitable (too complex) for QCM analysis.

In contrast to the experiments involving A β 42, the binding interactions for GroEL-AD:GroES and GroEL-AD: α -Synuclein were more specific and allowed us to probe the interactions between GroEL-AD and client in more detail. Figure 6b–d summarizes the results of experiments performed on immobilized GroES titrated with various concentrations of GroEL-AD in the presence of 0.4 M Gdn-HCl. As shown in Fig. 6b, binding of GroEL-AD to immobilized GroES was dependent on the concentration of GroEL-AD added, resulting in increases in the

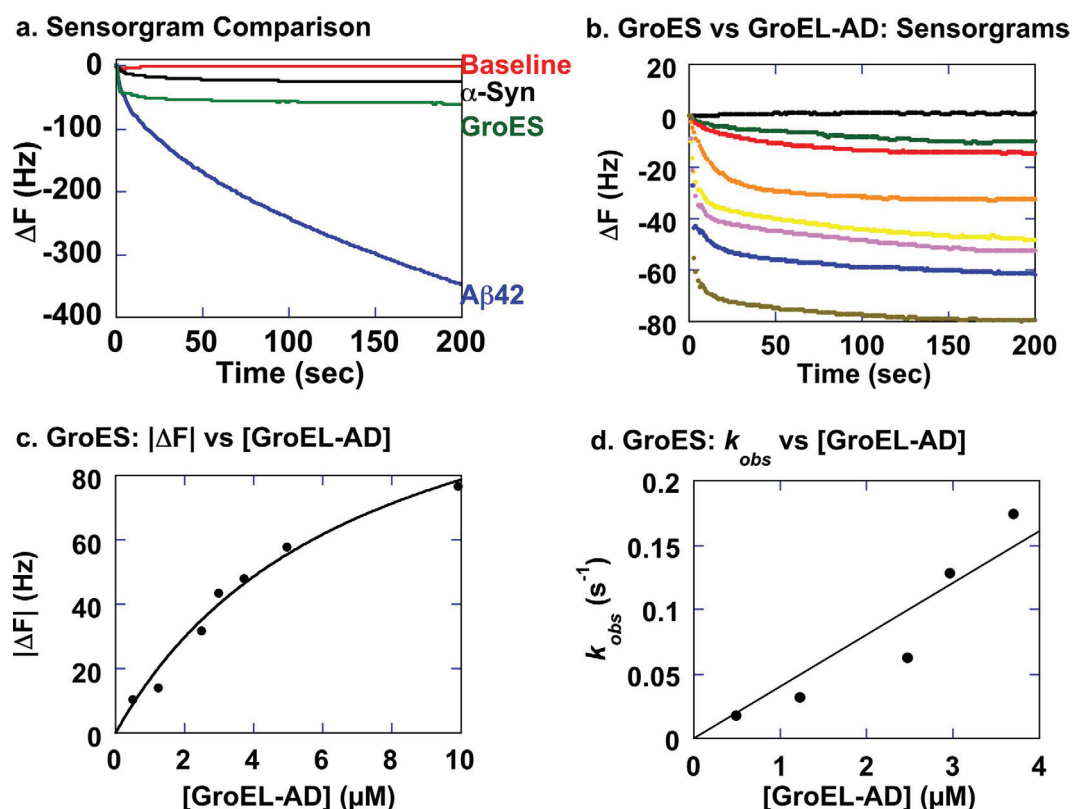


Figure 6. Binding interactions between GroEL-AD and various client proteins (α -Synuclein, A β 42, and GroES) assessed by AffinixQNμ at 25 °C. **(a)** The concentration of protein used during immobilization to the quartz microbalance and the concentration of soluble protein added during subsequent measurements were both set to 100 ng/ μL . The “Baseline” (red) denotes signal changes detected when buffer containing no protein is added to GroEL-AD immobilized sensors. The “ α -Syn” (black) and “A β 42” (blue) signals were measured by adding soluble aliquots of α -Synuclein or A β 42, respectively, to the reaction chamber containing immobilized GroEL-AD. The “GroES” signal (green), however, was measured by adding soluble GroEL-AD to a reaction chamber containing immobilized GroES protein, in the presence of 0.4 M Gdn-HCl. See the Materials and Methods section for more details. **(b)** Sensorgrams measured using a quartz microbalance with immobilized GroES and varying concentrations of soluble GroEL-AD in the presence of 0.4 M Gdn-HCl. The concentration of GroEL-AD during each experiment was as follows (from top to bottom): 0 μM , 0.495 μM , 1.23 μM , 2.48 μM , 2.97 μM , 3.71 μM , 4.95 μM , 9.90 μM . Each trace was analyzed using the analysis function of Aqua 2.0 to obtain k_{obs} and ΔF values. **(c)** Plot of the estimated $|\Delta F|$ values to the concentration of soluble GroEL-AD added. Data points were fitted non-linearly to the isothermal adsorption equation outlined in Materials and Methods to obtain the fitted curve shown in the figure. **(d)** Linear regression plots of k_{obs} to the concentration of soluble [GroEL-AD]. We used only the k_{obs} values for the lower [GroEL-AD] concentrations in this analysis since the data sampling rate, which was fixed for the instrument, precluded the detailed sampling of raw sensorgrams with large k_{obs} values. This leads to more errors to be incorporated into the k_{obs} estimates at higher [GroEL-AD] concentrations, and subsequently a notable tendency in the linear regression analysis to yield negative values of k_{off} (the y-intercept).

frequency change ΔF that could be analyzed to estimate K_d (Fig. 6c). As seen in Fig. 6c, the derived $|\Delta F|$ could be fitted well to the isothermal adsorption equation to obtain K_d values of $(7.0 \pm 1.6) \times 10^{-6}$ (M). Fitting the raw traces in Fig. 6b to a single exponential decay function with drift also revealed the k_{obs} at various [GroEL-AD], and these data were also plotted to estimate k_{on} , k_{off} values. It should be noted here that we selected to omit from the analysis the k_{obs} values from traces obtained at the highest two GroEL-AD concentrations; due to constraints in the sampling rates of the quartz balance (1 data point/sec), these two raw traces contained relatively little information of the initial exponential decay phase, and estimates of the k_{obs} were correspondingly inaccurate.

The interactions between GroES and GroEL-AD in the presence of 0.4 M Gdn-HCl were most consistent with a specific 1:1 binding mechanism that was essentially irreversible. Initial analysis of the k_{obs} vs [GroEL-AD] plots (Fig. 6d) indicated that fitting of the data would result in a negative value estimation for k_{off} , and so the data in Fig. 6d were analyzed by setting this value to zero. Estimation of the k_{on} under this restriction resulted in a value of $k_{\text{on}} = 4.1 \times 10^4$ ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Due to this constraint in the data analyses, we were unable to estimate the K_d values through estimation of the reversible kinetic rate constants as initially planned. The results from Fig. 6c however are consistent with a strong and essentially irreversible binding reaction between GroES and GroEL-AD.

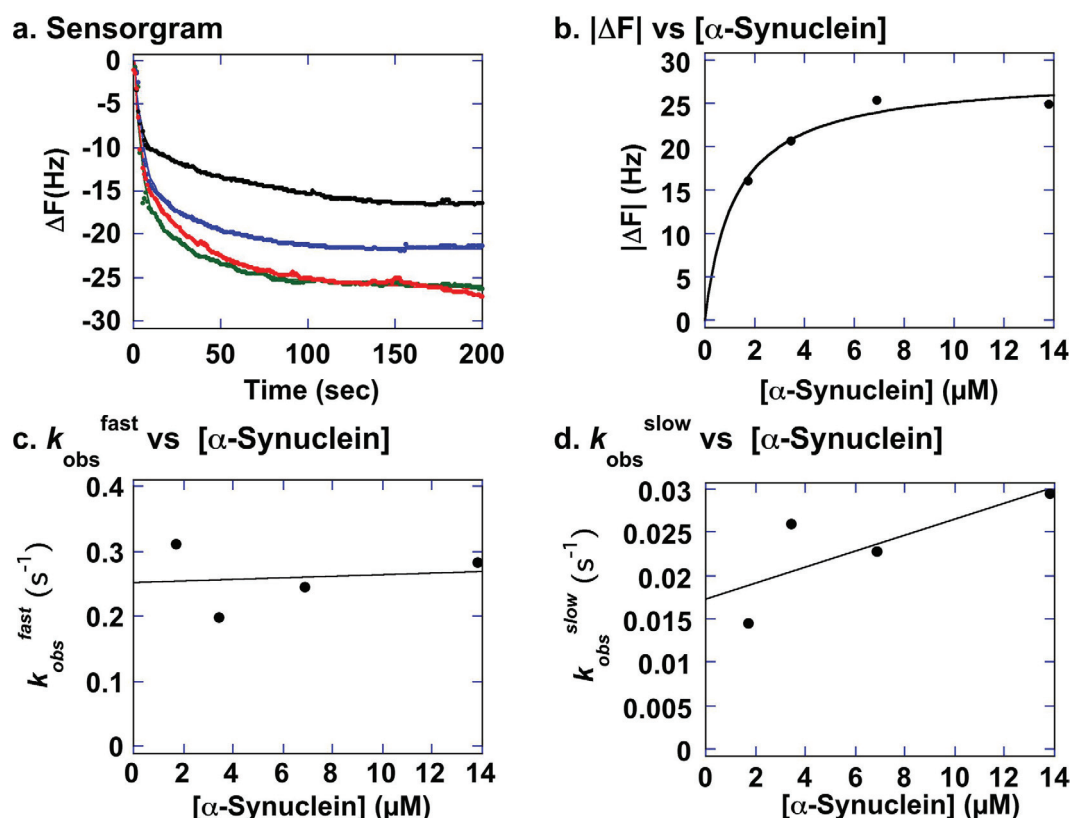


Figure 7. Analysis of α -Synuclein binding to immobilized GroEL-AD molecules using QCM. (a) Sensorgrams measured using a quartz microbalance with immobilized GroEL-AD and varying concentrations of soluble α -synuclein. The molar concentration of α -Synuclein used for each sensorgram was as follows from top to bottom: 1.72 μ M, 3.45 μ M, 6.90 μ M (green trace), 13.8 μ M (red trace). Raw data of each trace were fitted non-linearly to a two phase exponential decay equation to obtain two apparent amplitude values and two rate constants, k_{obs}^{fast} and k_{obs}^{slow} . The net change in frequency, $|\Delta F|$, was estimated by adding the two derived amplitudes of the analysis. (b) Non-linear fitting of $|\Delta F|$ values to the molar concentration of soluble GroEL-AD. See the Materials and Methods section for details on the analysis and the main text for derived K_d values. (c) Linear regression analysis of k_{obs}^{fast} against $[\alpha\text{-Synuclein}]$. (d) Linear regression analysis of k_{obs}^{slow} against $[\alpha\text{-Synuclein}]$. See main text for details and derived K_d values.

In contrast, the binding reaction of α -Synuclein to immobilized GroEL-AD differed in many important aspects to the binding interactions between GroEL-AD and immobilized GroES (Fig. 7). First of all, the raw binding curves obtained from the Affinix instrument could not be fitted well to the single exponential decay reaction as recommended by the manufacturer. Upon further analysis, we found that the traces obtained at each α -Synuclein concentration were best fitted to a double exponential decay equation (Fig. 7a), which suggested that the binding of α -Synuclein to GroEL-AD was best represented by two distinct binding reactions with differing apparent rate constants. Using the sum of the amplitudes derived from analyses of the traces, we were able to estimate the K_d in Fig. 7b. As a result, we estimated the K_d to be $(1.23 \pm 0.31) \times 10^{-6}$ (M). Next, we estimated the k_{on}/k_{off} values for this binding reaction using both the faster apparent rate constant (k_{obs}^{fast}) and the slower rate constant (k_{obs}^{slow}) individually (Fig. 7c,d). Using k_{obs}^{fast} , the estimated values were $k_{on} = 1.20 \times 10^3$ ($M^{-1}s^{-1}$) and $k_{off} = 0.25$ (s^{-1}) (Fig. 6c). The derived K_d from these two rates equaled $K_d = 2.1 \times 10^{-4}$ (M). Next, from the k_{obs}^{slow} data we estimated the respective kinetic rate constants to be $k_{on} = 9.2 \times 10^2$ ($M^{-1}s^{-1}$), and $k_{off} = 0.017$ (s^{-1}) (Fig. 7d), for a derived dissociation constant of $K_d = 1.8 \times 10^{-5}$ (M).

A notable characteristic of α -Synuclein binding to GroEL-AD revealed in these analyses was that the binding mechanism involved a significant k_{off} rate. In contrast to GroEL-AD:GroES binding, which was essentially a 1:1 irreversible binding reaction, the data in Fig. 7 was most consistent with a dynamic binding equilibrium of α -Synuclein to GroEL-AD, with more than one, possibly two modes of binding between these two coexisting proteins. When taken together with the results for GroES and A β 42, our results suggest that GroEL-AD is inherently capable of utilizing multiple modes of intermolecular recognition and binding to suppress the formation of various amyloid particles *in vitro*.

Discussion

Chaperonins protect cells by maintaining the integrity of cellular proteins from stress^{56–59}, but their role in protecting cells from various long-term amyloidogenic disorders is not apparent. Previous studies have shown that interactions between various amyloidogenic proteins and various molecular chaperones such as Hsp104, Hsp70,

and Hsp40 are possible and lead to effective suppression of amyloids^{19–21}. In order to determine the existence of a similar role for chaperonins, we have examined the effects of GroEL-AD, the apical domain fragment of the group I chaperonin GroEL from *E. coli*, on the aggregation of multiple client proteins which form amyloid fibrils. We have shown that the presence of GroEL-AD significantly inhibits the formation of amyloid fibrils of three client proteins (α -Synuclein, A β 42, and GroES). Experimental examples that demonstrate that a specific domain fragment from a molecular chaperone is able to control protein amyloid fibril formation are relatively scarce. However, in an earlier study performed by our group, we highlighted the effects of adding the apical domain fragment from the *Thermoplasma acidophilum* group II chaperonin (Api-Ta-cpn) on the fibril formation reaction of yeast Sup35NM⁶⁰. In this prior study, we also found that a synthetic peptide derived from the helical protrusion region of this domain could also suppress fibril formation of Sup35NM, suggesting that the ability of Api-Ta-cpn to suppress the formation of Sup35NM fibrils involved specific structural motifs localized in a specific region of the chaperonin apical domain⁶⁰.

In the present study, we have demonstrated that a critical concentration of GroEL-AD is required for complete inhibition of amyloid fibrils in each case. The concentration of GroEL-AD required for complete inhibition varied according to the protein monitored; relatively moderate concentrations of GroEL-AD was sufficient to suppress α -Synuclein aggregation (3-fold) and GroES aggregation (4-fold) effectively; however, much higher concentrations (20-fold molar excess) was required to achieve similar effects for A β 42 (Fig. 2d). Below these critical concentrations, the general effect of GroEL-AD was to decrease the amount of fibril that was finally formed, most likely by limiting the concentration of free aggregation-prone protein molecules in solution. When we probed the morphology of the fibrils formed in the presence of GroEL-AD, we could not detect many overt differences in fibril morphology, and this finding seems to support this basic mechanism (Figs 3 and 4). However, there was a notable exception in the case of α -Synuclein, where we observed in TEM images fibrils that seemed to be notably thinner than the fibrils that were produced in isolation, or in the presence of an unrelated protein, BSA (Fig. 4). It may be conceivable that in the case of α -Synuclein, GroEL-AD is capable of modulating fibril morphology in addition to limiting fibril growth, and this notion agreed well with the multiple modes of binding interaction that we observed between GroEL-AD and α -Synuclein, detected through QCM experiments (Fig. 7). Perhaps the different modes of GroEL-AD binding to α -Synuclein may be responsible respectively to limit fibril elongation and modulate fibril forms. Further experiments, perhaps involving mutational analysis, will be necessary to probe this interesting facet of GroEL-AD: α -Synuclein interaction.

A notable characteristic of GroEL-AD that we uncovered in the present experiments was its rather robust ability to suppress the fibril formation of various diverse polypeptide clients, under rather diverse experimental conditions. First of all, GroEL-AD was able to bind to both relatively short (42 amino acids: A β 42) and moderate (97 amino acids: GroES, 140 amino acids: α -Synuclein) sized polypeptide clients indiscriminately. Additionally, the structures of these clients were also slightly varied, ranging from short polypeptides (A β 42), intrinsically disordered proteins (α -Synuclein), and natively structured oligomers that were partially denatured (GroES). Although bound by a common structural characteristic (the ability to form fibrillar aggregates under prolonged incubation), the differences in structure and chemical identity between these three clients were reflected in the specific conditions under fibrillation occurs for each client, and it is very interesting that GroEL-AD was able to bind to and control the aggregation of these clients under each individual condition. Although the analysis of these binding reactions using QCM revealed a spectrum of possible mechanisms that are responsible for this promiscuous binding of GroEL-AD to proteins, we believe that the underlying binding mechanism of GroEL-AD to these three clients might reflect a common physical principle.

It is well known that GroEL senses the hydrophobicity of transiently unfolded protein molecules as they accumulate in the cell as a response to stress. It is also well established that the apical domain of GroEL is the domain which acts as the hydrophobic sensor that distinguishes and binds to these molecules (Fig. 1, helices H and I). Our experiments therefore highlight the contribution of the hydrophobic effect on the fibrillation of the three target proteins that we studied here. In a fortuitous discovery, the role of hydrophobicity in protein fibrillation was also highlighted in control experiments that we performed using BSA (Fig. 4). BSA, an unrelated serum protein that adsorbs lipids and various nutrient molecules for transport through the bloodstream, was found to affect significantly the course of fibril formation of all three polypeptides that we tested, A β 42, α -Synuclein, and GroES, albeit in each case to a lesser extent than GroEL-AD in equivalent concentrations (Fig. 4). The interesting finding that we observed in these “control” experiments was that BSA affected the fibrillation process in a different manner for each target polypeptide, ranging from specifically lengthening the initial nucleation lag time (GroES) to altering significantly the morphology of resulting fibrils (A β 42). The results shown here regarding the effects of BSA addition to protein fibrillation served serendipitously to highlight the many facets in which hydrophobic interactions are involved in the nucleation and extension of protein fibrils. Also, it should be mentioned here that protein fibrillation is by no means modulated exclusively by hydrophobic interactions, as previous studies have highlighted the contribution of electrostatic interactions on protein fibrillation, using various positively and negatively charged compounds on A β 40 fibrillogenesis^{61,62}. Protein fibrillation most likely involves numerous diverse interactions that interact spatially along the polypeptide chain, as well as through various molecular interactions that are sensitive to environmental stimuli. This idea is all the more relevant in analyses of the modulation of fibrillation through protein-protein interactions, as we are attempting here. In the present study, we believe that we have been successful in establishing a baseline from which we may probe further the numerous molecular interactions and events that underlie protein fibrillation, and intend to extend our efforts to probe common principles that underlie this important phenomenon.

Methods

Materials. All chemical reagents were obtained from commercial suppliers and used without further purification unless otherwise stated.

Expression and Purification of Proteins. The gene fragment corresponding to GroEL-AD was prepared by polymerase chain reaction (PCR) amplification using pUCESL (plasmid containing the wild-type *groESL* gene) as template, and two primers that flank the apical domain sequence (5'-AGGAGATATACA TATGGAAGGTATGCAGTTCGACCGT-3' (forward) and 5'-GAATTCGGATCCGCGTTAAACG CCGCCTGCCAGT-3' (reverse)). The PCR product was ligated into pET23a(+) vector (Novagen) and the resultant plasmid (pET-AD) was used to transform *E. coli* BLR(DE3) (Novagen). BLR(DE3)/pET-AD cells were suspended in purification buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5 containing 2 mM EDTA, 2 mM DTT and 0.1 mM PMSF) followed by disruption using sonication and centrifuged. To the supernatant, streptomycin sulfate (2.5% final concentration) was added to precipitate the nucleic acids. After removal of nucleic acids by centrifugation, the supernatant was heated at 70–75 °C for 10 min, rapidly cooled on ice, and centrifuged to remove precipitated proteins. GroEL-AD protein was precipitated from this supernatant by adding fine solid ammonium sulfate to 65% saturation, centrifugation, and re-solubilization of the protein pellet in buffer. This concentrated protein solution was then loaded to a column (660 cm³) filled with Sephacryl S-300 (GE Healthcare) size-exclusion chromatography resin equilibrated with buffer (50 mM Tris-HCl containing 0.1 mM EDTA, 0.1 mM DTT and 100 mM NaCl; pH 7.5) and the column was developed at a flow rate of ~0.5 mL/min. Eluted samples were analyzed by SDS-PAGE and fractions containing GroEL-AD were desalted by dialysis against 5 mM sodium bicarbonate overnight, followed by dialysis against 1 mM sodium bicarbonate for 2 hr at 4 °C. The desalted protein solution was then lyophilized and stored at 4 °C. Concentrations were estimated by using a molar extinction coefficient of 4470 M⁻¹cm⁻¹⁶³ at 280 nm for GroEL-AD.

α -Synuclein was purified as described previously from BLR(DE3) cells containing an overexpressing plasmid⁶⁴. The concentration of α -Synuclein was estimated using a relative absorption coefficient of $\epsilon_{280}^{0.1\%} = 0.354$ ⁶⁴.

Synthetic A β 42 peptide was purchased from Peptide Institute Inc., Japan. A working solution of 500 μ M A β 42 was prepared by dissolving ~0.42 mg of lyophilized peptide in 200 μ L of 0.02% ammonium solution in a 1.5 mL eppendorf tube and kept on ice before use.

GroES was purified as described previously^{65,66}. Purified samples were subjected to dialysis in Milli-Q water, lyophilized, and stored at 4 °C. The purity of the protein sample was checked by SDS-PAGE. The concentration of GroES solutions was determined by protein dye assay (Bio-Rad Laboratories) using bovine serum albumin (Sigma) as a standard reference.

Aggregation Kinetics of Client Proteins Monitored by Thioflavin T (ThT) Binding Assay. The aggregation kinetics of α -Synuclein were measured as described previously using ThT⁶⁷, an environmentally sensitive fluorophore for selective binding of amyloid fibrils⁴¹. Briefly, the concentrated α -Synuclein sample solution was diluted to a final concentration of 1 mg/mL in 25 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5, containing 20 μ M ThT and 150 mM NaCl. The solution was then transferred into 96-well microplate wells (Costar black, clear bottom; Greiner, Kremsmuenster, Austria), sealed using 3 inch crystal clear sealing tape (Hampton Research) and plates were loaded onto a Perkin Elmer multilabel fluorescence plate reader (ARVO X4 (VICTOR™ X), Waltham, MA, USA), where it was incubated under orbital shaking at 37 °C. The fluorescence (excitation at 450 nm, emission detected through a 486 nm/10 nm bandpass filter) was measured from the bottom of the plate at 15 min intervals, with 12 min of orbital shaking applied before each reading. Three independent experiments were performed for each set.

For monitoring the formation of GroES fibrils, concentrated sample solutions of GroES were diluted to a concentration of 1 mg/mL with 50 mM phosphate buffer, pH 7.4, containing 0.4 M guanidine hydrochloride (Gdn-HCl) and 20 μ M ThT. Gdn-HCl is necessary to partially unfold GroES and promote fibril formation⁴⁹. The concentration of Gdn-HCl used here, however, is lower than the concentration used in the previous study to characterize GroES fibril formation (0.9–1.6 M Gdn-HCl⁴⁹); this change in denaturant concentration was necessary to prevent denaturation of the GroEL-AD fragment during experiments. The sample solution was then transferred to 96-well microplate wells that were sealed and loaded onto the ARVO X4 fluorescence plate reader at 37 °C. The fluorescence was measured in a same manner as described in the previous section for α -Synuclein.

The monomeric A β 42 peptide solution was diluted to a final concentration of 10 μ M with 50 mM phosphate buffer, pH 7.4, containing 150 mM NaCl and 20 μ M ThT. One hundred fifty microliters of sample was transferred into wells of a 96-well microplate (Costar black, clear bottom), sealed and loaded onto a Gemini SpectraMax EM fluorescence plate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA), and incubated at 37 °C. The fluorescence (excitation at 440 nm, emission at 485 nm) was measured from the bottom of the plate at 15 min intervals, with 5 sec of agitation before each reading. Three independent experiments were performed for each set.

Working solutions of GroEL-AD were either prepared in 25 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) for experiments using α -Synuclein, or in 50 mM phosphate buffer (pH 7.4) for experiments with A β 42 and GroES. Lyophilized protein stocks were dissolved in their respective buffers and a designated concentration of GroEL-AD was added to α -Synuclein (1 mg/mL) in 25 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5), containing 150 mM NaCl and 20 μ M ThT, A β 42 (10 μ M) in 50 mM phosphate buffer (pH 7.4), containing 150 mM NaCl and 20 μ M ThT, and GroES (1 mg/mL) solution in 50 mM phosphate buffer (pH 7.4), containing 0.4 M Gdn-HCl and 20 μ M ThT. Each solution was then mixed briefly for 5 sec and pipetted into microplates (150 μ L/well) for assays to quantitate ThT fluorescence.

Raw data from fluorescence assays were visualized using KaleidaGraph version 4.5.1 (Synergy Software, PA, USA).

Atomic Force Microscopy (AFM). AFM measurements were performed on a Digital Instruments Nanoscope IV scanning microscope (MMAFM-2) at room temperature using tapping mode in air. Incubated samples (α -Synuclein after 40 hr, A β 42 after 30 hr and GroES after 40 hr respectively with and without added GroEL-AD) were diluted 10-fold and were placed on freshly cleaved mica for 30 min, washed with 100 μ L of water and dried overnight at room temperature prior to imaging.

Probing Fibril Morphology Using Transmission Electron Microscopy (TEM). Reaction mixtures of A β 42, α -Synuclein, and GroES were prepared as outlined above in the presence or absence of GroEL-AD or BSA and fibrillation was allowed to proceed in an ARVO X4 plate reader with agitation. The molar concentrations of GroEL-AD or BSA added corresponded to the following molar ratios relative to target monomer: A β 42, 1:5; α -Synuclein, 1:1; and GroES, 1:1. The ThT fluorescence of each sample was monitored at regular intervals to obtain the *leftmost* traces shown in Fig. 4. After the assay was completed, aliquots were taken from each sample that displayed a positive ThT signal and used to prepare samples for TEM analysis. Ten microliters of sample were applied to carbon-coated 400-mesh copper grids (Nisshin-EM, Tokyo) and incubated for 1 min at room temperature. Sample solutions were then blotted off the grids and 5 μ L Milli-Q water was added to rinse the surface. Immediately after blotting off the water rinse, 5 μ L of EM-Stainer solution (a gadolinium triacetate based electron microscopy stain, Nisshin-EM, Tokyo⁶⁸) was applied for 1 min, after which the carbon grid was again rinsed with 5 μ L Milli-Q water. Grids were dried for 1 hr at room temperature before TEM analysis on a JEOL JEM-1400plus transmission electron microscope at 80 kV (Fig. 4, *right traces*).

When preparing samples of GroES fibrils formed in the presence of 0.4 M Gdn-HCl, we found that the denaturant was preventing the efficient adsorption of sample to the carbon-coated grids. Therefore, to remove denaturant prior to sample preparation, aliquots containing Gdn-HCl were first diluted tenfold with 50 mM phosphate buffer (pH 7.4), centrifuged at $15,000 \times g$ for 10 min at 4 °C, and the precipitate was resuspended in 30 μ L phosphate buffer for use in the above preparations.

Binding Interactions Between GroEL-AD and Client Proteins. The binding interactions between GroEL-AD and fibril forming client proteins were directly monitored by quartz crystal microbalance (QCM) binding analysis using a Ulvac AffinixQN μ device equipped with a 27 MHz AT-cut gold coated QCM⁵⁴ onto which various proteins could be affixed for affinity analysis. Prior to immobilization of protein (either GroEL-AD, or GroES) to the sensor, the gold surface was cleaned with 1% SDS, followed by incubation with piranha solution (H₂SO₄:H₂O₂ = 3:1) for 5 min, and a final thorough wash with double-distilled water. In binding experiments involving α -Synuclein and A β 42, GroEL-AD (100 ng/ μ L) was immobilized onto the cleaned sensor cell using protocols recommended by the manufacturer, followed by the immersion of the sensor in 0.5 mL reaction buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, containing 2 mM EDTA and 2 mM DTT). After stabilization of the basal quartz oscillation, a 5 μ L aliquot of guest protein solution (α -Synuclein or A β 42) was injected into the buffer filled cuvette to analyze the interaction between host and guest on the gold electrode.

For analysis of the interactions between GroEL-AD and GroES, in order to simulate the conditions under which GroES fibrils are formed in our experiments, we added 0.4 M Gdn-HCl to all of our QCM binding experiments involving these two proteins. Perhaps due to this change, when we initially performed experiments with GroEL-AD bound to the sensor chip and GroES as ligand, we could not detect any meaningful traces for analysis. Reversing the relationship (GroES bound to the sensor, GroEL-AD added as ligand) allowed us to obtain reliable data for analysis in the presence of 0.4 M Gdn-HCl.

For each experiment, interactions were detected by the frequency changes (oscillation unit, OU: $-\Delta F$ in Hz) caused by changes in mass bound to the electrode surface at the sub-nanogram level, attributed to specific ligand protein binding⁵⁵. All experiments were carried out at 25 ± 1 °C with constant stirring at 1000 rpm. Between each session, the sensor with immobilized protein was incubated for 30 min with reaction buffer containing 1.6 M Gdn-HCl to remove bound guest protein, then incubated for 30 min with reaction buffer without denaturant to allow regeneration (refolding) of the immobilized protein, and finally adjusted to the conditions of each experiment. We found that this regeneration protocol, instead of using an alternative protocol involving the thorough removal and subsequent fresh immobilization of protein, tended to yield more consistent and reproducible data. In experiments involving GroES, an additional pre-incubation interval of 30 min in buffer containing 0.4 M Gdn-HCl was incorporated prior to measurements. Raw sensorgrams were either fitted to a single exponential decay equation corrected for drift to elucidate apparent rate constants (k_{obs}) and the net change in oscillation frequency (ΔF), or alternatively, fitted to a double exponential decay equation to obtain ΔF and two apparent rate constants, fast ($k_{\text{obs}}^{\text{fast}}$) and slow ($k_{\text{obs}}^{\text{slow}}$). Estimation of the dissociation constant (K_d) between GroEL-AD and each client were estimated using two different methods; in the kinetic estimation method, the rates of ligand binding (k_{on}) and ligand dissociation (k_{off}) were estimated from linear regression analysis of the k_{obs} against [Client], according to the following equation:

$$k_{\text{obs}} = k_{\text{off}} + k_{\text{on}}[\text{Client}]$$

Alternatively, the K_d was estimated directly from non-linear fitting of plots of the $|\Delta F|$ against [Client] according to the Langmuir equation for isothermal adsorption:

$$|\Delta F| = \frac{B_{\text{max}}[\text{Client}]}{K_d + [\text{Client}]}$$

Analyses were performed using either the software package supplied by the manufacturer (Aqua 2.0; for single exponential decay w/drift; Fig. 6b), or KaleidaGraph 4.5.1 (all other analyses; Figs 6 and 7).

References

- Ohi, T., Nabeshima, K., Kato, S., Yazawa, S. & Takechi, S. Familial amyotrophic lateral sclerosis with His46Arg mutation in Cu/Zn superoxide dismutase presenting characteristic clinical features and Lewy body-like hyaline inclusions. *J. Neurol. Sci.* **225**, 19–25, doi: 10.1016/j.jns.2004.06.008 (2004).
- Uversky, V. N. Amyloidogenesis of natively unfolded proteins. *Curr Alzheimer Res* **5**, 260–287 (2008).
- Uversky, V. N. *et al.* Unfoldomics of human diseases: linking protein intrinsic disorder with diseases. *BMC Genomics* **10** Suppl 1, S7, doi: 10.1186/1471-2164-10-S1-S7 (2009).

4. Oztug Durer, Z. A. *et al.* Loss of metal ions, disulfide reduction and mutations related to familial ALS promote formation of amyloid-like aggregates from superoxide dismutase. *PLoS One* **4**, e5004, doi: 10.1371/journal.pone.0005004 (2009).
5. Forsberg, K. *et al.* Novel antibodies reveal inclusions containing non-native SOD1 in sporadic ALS patients. *PLoS One* **5**, e11552, doi: 10.1371/journal.pone.0011552 (2010).
6. Fandrich, M., Fletcher, M. A. & Dobson, C. M. Amyloid fibrils from muscle myoglobin. *Nature* **410**, 165–166, doi: 10.1038/35065514 (2001).
7. Pertinhez, T. A. *et al.* Amyloid fibril formation by a helical cytochrome. *FEBS Lett* **495**, 184–186 (2001).
8. Goldschmidt, L., Teng, P. K., Riek, R. & Eisenberg, D. Identifying the amyloids, proteins capable of forming amyloid-like fibrils. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**, 3487–3492, doi: 10.1073/pnas.0915166107 (2010).
9. Luhrs, T. *et al.* 3D structure of Alzheimer's amyloid-beta(1–42) fibrils. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 17342–17347, doi: 10.1073/pnas.0506723102 (2005).
10. Lu, J. X. *et al.* Molecular structure of beta-amyloid fibrils in Alzheimer's disease brain tissue. *Cell* **154**, 1257–1268, doi: 10.1016/j.cell.2013.08.035 (2013).
11. Powers, E. T. & Powers, D. L. Mechanisms of protein fibril formation: nucleated polymerization with competing off-pathway aggregation. *Biophys. J.* **94**, 379–391, doi: 10.1529/biophysj.107.117168 (2008).
12. Ferrone, F. A. Nucleation: the connections between equilibrium and kinetic behavior. *Methods Enzymol.* **412**, 285–299, doi: 10.1016/S0076-6879(06)12017-0 (2006).
13. Harper, J. D. & Lansbury, P. T. Jr. Models of amyloid seeding in Alzheimer's disease and scrapie: mechanistic truths and physiological consequences of the time-dependent solubility of amyloid proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **66**, 385–407, doi: 10.1146/annurev.biochem.66.1.385 (1997).
14. Teplow, D. B. Structural and kinetic features of amyloid beta-protein fibrillogenesis. *Amyloid* **5**, 121–142 (1998).
15. Dunkelberger, E. B. *et al.* Deamidation accelerates amyloid formation and alters amylin fiber structure. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 12658–12667, doi: 10.1021/ja3039486 (2012).
16. O'Nuallain, B., Williams, A. D., Westermarck, P. & Wetzel, R. Seeding specificity in amyloid growth induced by heterologous fibrils. *J. Biol. Chem.* **279**, 17490–17499, doi: 10.1074/jbc.M311300200 (2004).
17. Shim, S. H. *et al.* Two-dimensional IR spectroscopy and isotope labeling defines the pathway of amyloid formation with residue-specific resolution. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**, 6614–6619, doi: 10.1073/pnas.0805957106 (2009).
18. Lee, J., Culyba, E. K., Powers, E. T. & Kelly, J. W. Amyloid-beta forms fibrils by nucleated conformational conversion of oligomers. *Nat Chem Biol* **7**, 602–609, doi: 10.1038/nchembio.624 (2011).
19. Shorter, J. & Lindquist, S. Hsp104, Hsp70 and Hsp40 interplay regulates formation, growth and elimination of Sup35 prions. *EMBO J.* **27**, 2712–2724, doi: 10.1038/emboj.2008.194 (2008).
20. Tipton, K. A., Verges, K. J. & Weissman, J. S. *In vivo* monitoring of the prion replication cycle reveals a critical role for Sis1 in delivering substrates to Hsp104. *Mol Cell* **32**, 584–591, doi: 10.1016/j.molcel.2008.11.003 (2008).
21. Glover, J. R. & Lindquist, S. Hsp104, Hsp70, and Hsp40: a novel chaperone system that rescues previously aggregated proteins. *Cell* **94**, 73–82 (1998).
22. Klucken, J., Shin, Y., Masliah, E., Hyman, B. T. & McLean, P. J. Hsp70 Reduces alpha-Synuclein Aggregation and Toxicity. *J. Biol. Chem.* **279**, 25497–25502, doi: 10.1074/jbc.M400255200 (2004).
23. Dedmon, M. M., Christodoulou, J., Wilson, M. R. & Dobson, C. M. Heat shock protein 70 inhibits alpha-synuclein fibril formation via preferential binding to prefibrillar species. *J. Biol. Chem.* **280**, 14733–14740, doi: 10.1074/jbc.M413024200 (2005).
24. Kulig, M. & Ecroyd, H. The small heat-shock protein alphaB-crystallin uses different mechanisms of chaperone action to prevent the amorphous versus fibrillar aggregation of alpha-lactalbumin. *Biochem J* **448**, 343–352, doi: 10.1042/BJ20121187 (2012).
25. Hochberg, G. K. *et al.* The structured core domain of alphaB-crystallin can prevent amyloid fibrillation and associated toxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* **111**, E1562–1570, doi: 10.1073/pnas.1322673111 (2014).
26. Mainz, A. *et al.* The chaperone alphaB-crystallin uses different interfaces to capture an amorphous and an amyloid client. *Nat Struct Mol Biol* **22**, 898–905, doi: 10.1038/nsmb.3108 (2015).
27. Kitamura, A. *et al.* Cytosolic chaperonin prevents polyglutamine toxicity with altering the aggregation state. *Nat Cell Biol* **8**, 1163–1170, doi: 10.1038/ncb1478 (2006).
28. Tam, S., Geller, R., Spiess, C. & Frydman, J. The chaperonin TRiC controls polyglutamine aggregation and toxicity through subunit-specific interactions. *Nat Cell Biol* **8**, 1155–1162, doi: 10.1038/ncb1477 (2006).
29. Behrends, C. *et al.* Chaperonin TRiC promotes the assembly of polyQ expansion proteins into nontoxic oligomers. *Mol Cell* **23**, 887–897, doi: 10.1016/j.molcel.2006.08.017 (2006).
30. Shahmoradian, S. H. *et al.* TRiC's tricks inhibit huntingtin aggregation. *Elife* **2**, e00710, doi: 10.7554/eLife.00710 (2013).
31. Buchner, J. *et al.* GroE facilitates refolding of citrate synthase by suppressing aggregation. *Biochemistry* **30**, 1586–1591 (1991).
32. Goloubinoff, P., Gatenby, A. A. & Lorimer, G. H. GroE heat-shock proteins promote assembly of foreign prokaryotic ribulose biphosphate carboxylase oligomers in Escherichia coli. *Nature* **337**, 44–47, doi: 10.1038/337044a0 (1989).
33. Martin, J. *et al.* Chaperonin-mediated protein folding at the surface of groEL through a 'molten globule'-like intermediate. *Nature* **352**, 36–42 (1991).
34. Boisvert, D. C., Wang, J., Otwinowski, Z., Horwich, A. L. & Sigler, P. B. The 2.4 Å crystal structure of the bacterial chaperonin GroEL complexed with ATP gamma S. *Nat. Struct. Biol.* **3**, 170–177 (1996).
35. Braig, K., Adams, P. D. & Brunger, A. T. Conformational variability in the refined structure of the chaperonin GroEL at 2.8 Å resolution. *Nat. Struct. Biol.* **2**, 1083–1094 (1995).
36. Braig, K. *et al.* The crystal structure of the bacterial chaperonin GroEL at 2.8 Å. *Nature* **371**, 578–586 (1994).
37. Fenton, W. A. & Horwich, A. L. GroEL-mediated protein folding. *Protein Sci.* **6**, 743–760 (1997).
38. Yagi-Utsumi, M. *et al.* NMR characterization of the interaction of GroEL with amyloid beta as a model ligand. *FEBS Lett* **587**, 1605–1609, doi: 10.1016/j.febslet.2013.04.007 (2013).
39. Nishida, N. *et al.* Nuclear magnetic resonance approaches for characterizing interactions between the bacterial chaperonin GroEL and unstructured proteins. *J Biosci Bioeng* **116**, 160–164, doi: 10.1016/j.jbiosc.2013.02.012 (2013).
40. Zahn, R. *et al.* Chaperone activity and structure of monomeric polypeptide binding domains of GroEL. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 15024–15029 (1996).
41. LeVine, H. 3rd. Quantification of beta-sheet amyloid fibril structures with thioflavin T. *Methods Enzymol.* **309**, 274–284 (1999).
42. Weinreb, P. H., Zhen, W., Poon, A. W., Conway, K. A. & Lansbury, P. T. Jr. NACP, a protein implicated in Alzheimer's disease and learning, is natively unfolded. *Biochemistry* **35**, 13709–13715, doi: 10.1021/bi961799n (1996).
43. Polymeropoulos, M. H. *et al.* Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* **276**, 2045–2047 (1997).
44. Kruger, R. *et al.* Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nat Genet* **18**, 106–108, doi: 10.1038/ng0298-106 (1998).
45. Zarranz, J. J. *et al.* The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Ann. Neurol.* **55**, 164–173, doi: 10.1002/ana.10795 (2004).
46. Jacobson, D. R. & Buxbaum, J. N. Genetic aspects of amyloidosis. *Adv. Hum. Genet.* **20**, 69–123, 309–111 (1991).
47. Selkoe, D. J. Alzheimer's disease: genotypes, phenotypes, and treatments. *Science* **275**, 630–631 (1997).

48. Glenner, G. G. & Wong, C. W. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun* **120**, 885–890 (1984).
49. Higurashi, T., Yagi, H., Mizobata, T. & Kawata, Y. Amyloid-like fibril formation of co-chaperonin GroES: nucleation and extension prefer different degrees of molecular compactness. *J. Mol. Biol.* **351**, 1057–1069, doi: 10.1016/j.jmb.2005.07.006 (2005).
50. Iwasa, H. *et al.* Bilberry anthocyanins neutralize the cytotoxicity of co-chaperonin GroES fibrillation intermediates. *Biochemistry* **52**, 9202–9211, doi: 10.1021/bi401135j (2013).
51. Wood, S. J. *et al.* alpha-synuclein fibrillogenesis is nucleation-dependent. Implications for the pathogenesis of Parkinson's disease. *J. Biol. Chem.* **274**, 19509–19512 (1999).
52. Naiki, H. & Gejyo, F. Kinetic analysis of amyloid fibril formation. *Methods Enzymol.* **309**, 305–318 (1999).
53. Wacker, J. L., Zareie, M. H., Fong, H., Sarikaya, M. & Muchowski, P. J. Hsp70 and Hsp40 attenuate formation of spherical and annular polyglutamine oligomers by partitioning monomer. *Nat Struct Mol Biol* **11**, 1215–1222, doi: 10.1038/nsmb860 (2004).
54. Matsuno, H., Furusawa, H. & Okahata, Y. Kinetic study of phosphorylation-dependent complex formation between the kinase-inducible domain (KID) of CREB and the KIX domain of CBP on a quartz crystal microbalance. *Chemistry* **10**, 6172–6178, doi: 10.1002/chem.200400030 (2004).
55. Matsunaga, H. & Ueda, H. Synergistic Ca²⁺ and Cu²⁺ requirements of the FGF1-S100A13 interaction measured by quartz crystal microbalance: an initial step in amlexanox-reversible non-classical release of FGF1. *Neurochem. Int.* **52**, 1076–1085, doi: 10.1016/j.neuint.2007.11.002 (2008).
56. Bukau, B. & Horwich, A. L. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* **92**, 351–366 (1998).
57. Grallert, H. & Buchner, J. Review: a structural view of the GroE chaperone cycle. *J. Struct. Biol.* **135**, 95–103, doi: 10.1006/jsbi.2001.4387 (2001).
58. Grantcharova, V., Alm, E. J., Baker, D. & Horwich, A. L. Mechanisms of protein folding. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **11**, 70–82 (2001).
59. Thirumalai, D. & Lorimer, G. H. Chaperonin-mediated protein folding. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **30**, 245–269 (2001).
60. Noi, K. *et al.* Suppression of Sup35 amyloid fibril formation by group II chaperonin from *Thermoplasma acidophilum*. *Am. J. Mol. Biol.* **2**, 265–275, doi: 10.4236/ajmb.2012.23028 (2012).
61. Liu, H. *et al.* Positively Charged Chitosan and N-Trimethyl Chitosan Inhibit Abeta40 Fibrillogenesis. *Biomacromolecules* **16**, 2363–2373, doi: 10.1021/acs.biomac.5b00603 (2015).
62. Ojha, B. *et al.* Poly(4-styrenesulfonate) as an inhibitor of Abeta40 amyloid fibril formation. *J Phys Chem B* **117**, 13975–13984, doi: 10.1021/jp4065467 (2013).
63. Pace, C. N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G. & Gray, T. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci.* **4**, 2411–2423, doi: 10.1002/pro.5560041120 (1995).
64. Yagi, H., Kusaka, E., Hongo, K., Mizobata, T. & Kawata, Y. Amyloid fibril formation of alpha-synuclein is accelerated by preformed amyloid seeds of other proteins: implications for the mechanism of transmissible conformational diseases. *J. Biol. Chem.* **280**, 38609–38616, doi: 10.1074/jbc.M508623200 (2005).
65. Higurashi, T. *et al.* Structural stability and solution structure of chaperonin GroES heptamer studied by synchrotron small-angle X-ray scattering. *J. Mol. Biol.* **333**, 605–620 (2003).
66. Iwasa, H., Meshitsuka, S., Hongo, K., Mizobata, T. & Kawata, Y. Covalent structural changes in unfolded GroES that lead to amyloid fibril formation detected by NMR: insight into intrinsically disordered proteins. *J. Biol. Chem.* **286**, 21796–21805, doi: 10.1074/jbc.M111.228445 (2011).
67. Izawa, Y. *et al.* Role of C-terminal negative charges and tyrosine residues in fibril formation of alpha-synuclein. *Brain and behavior* **2**, 595–605, doi: 10.1002/brb3.86 (2012).
68. Nakakoshi, M., Nishioka, H. & Katayama, E. New versatile staining reagents for biological transmission electron microscopy that substitute for uranyl acetate. *J. Electron Microsc. (Tokyo)*. **60**, 401–407, doi: 10.1093/jmicro/dfr084 (2011).
69. Chaudhry, C., Horwich, A. L., Brunger, A. T. & Adams, P. D. Exploring the structural dynamics of the E.coli chaperonin GroEL using translation-libration-screw crystallographic refinement of intermediate states. *J. Mol. Biol.* **342**, 229–245 (2004).
70. Xu, Z., Horwich, A. L. & Sigler, P. B. The crystal structure of the asymmetric GroEL-GroES-(ADP)7 chaperonin complex. *Nature* **388**, 741–750 (1997).
71. Pettersen, E. F. *et al.* UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of computational chemistry* **25**, 1605–1612, doi: 10.1002/jcc.20084 (2004).

Acknowledgements

B.O. is thankful to the Japan Society for the Promotion of Science (JSPS) for the postdoctoral fellowship (25-03383). This work was supported in part by Grant-in-Aid for Scientific Research (C) (No. 25330027 to Y.K.) from the JSPS, Grant-in-Aid for Scientific Research on Innovative Areas (No. 24113716 to Y.K.), and the X-Ray Free Electron Laser Priority Strategy Program from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology of Japan (MEXT).

Author Contributions

B.O., T.M. and Y.K. designed research and B.O., N.F. and K.H. performed research. B.O., T.M. and Y.K. wrote the main manuscript text and B.O., N.F. and T.M. prepared figures. All authors reviewed the manuscript.

Additional Information

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

How to cite this article: Ojha, B. *et al.* Suppression of amyloid fibrils using the GroEL apical domain. *Sci. Rep.* **6**, 31041; doi: 10.1038/srep31041 (2016).



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

© The Author(s) 2016