

論文の内容の要旨

論文題名 シャペロニン GroEL の反応サイクルに対する再検討
Reexamination of the chaperonin GroEL reaction cycle

氏名 鮫島 知哉

【背景と目的】

シャペロニンは、あらゆる生物において生存に不可欠な分子シャペロンである。シャペロニンは 2 つの樽型のリングが背中合わせになった構造をしており、細胞内では ATP 依存的にタンパク質の折れたたみを介助している。中でも大腸菌のシャペロニン GroEL の反応サイクルは約 20 年に及び詳細に解析されてきており、反応サイクルのモデルが世界中の生化学の教科書に記述されている。そのモデルは「GroEL の 2 つのリングに補因子の GroES が交互に GroEL に相互作用することで機能する」というものである。

すなわち、GroEL はリングを片側ずつ交互に利用しながらタンパク質の折れたたみを介助すると考えられてきた。一方、電子顕微鏡の観察、および化学架橋の実験から GroEL と GroES が 1:1 で結合した弾丸型複合体(図 1B)のほかに、GroEL と GroES が 1:2 で結合したフットボール型複合体の存在が確認されている(図 1C)。この結果から、GroEL は両側のリングを同時

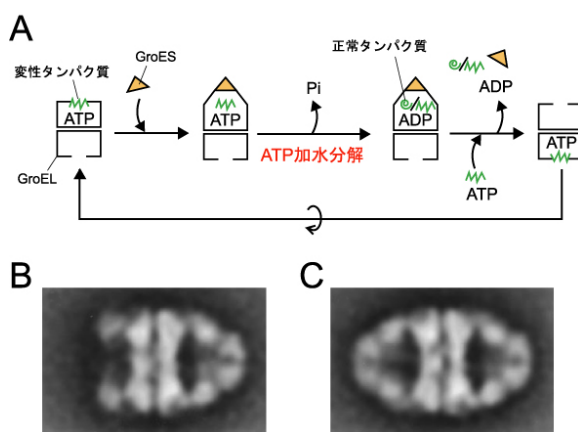


図 1. フットボール型複合体に関する論争

A. 従来の GroEL-GroES の反応モデル

B. 弾丸型複合体の電子顕微鏡像

C. フットボール型複合体の電子顕微鏡像

(B.C.は Beißinger et al., J. Mol. Biol., 1999 より引用)

に利用しながら反応を進行させることもあると考えられる。しかし、これらの実験は GroEL の反応を止めて計測しており、GroEL が反応サイクルを進行させている状態でフットボール型複合体を検出した例は報告されていない。そのため、GroEL の反応サイクル中にフットボール型複合体を経由した反応経路が存在するのかについては未だ不明である。そこで、本研究ではフットボール型複合体が本当に存在しないのかについて GroEL の反応サイクルを停止させずに確認すること、および詳細な GroEL の反応機構を解明することを目的とした。

【実験結果】

1. 蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)を用いたフットボール型複合体の検出

蛍光分光光度計を用いて、特定の amino 酸残基に蛍光色素を導入した GroEL と GroES の分子間 FRET を測定することで、定常状態におけるフットボール型複合体の存在を確認する実験を行った。先行研究により明らかにされているフットボール型複合体形成条件(ATP+BeF_x)と弾丸形複合体形成条件(ADP+BeF_x)、および GroEL の反応サイクル中(ATP)の FRET 効率を比較した。その結果、フットボール型複合体と弾丸形複合体が反応サイクル中で共存していることが確認された(図 2)。さらに ATP 加水分解能が低下した GroEL の変異体(D398A)を用いることで、フットボール型複合体は両側に ATP が結合した状態で形成されることを見出した。

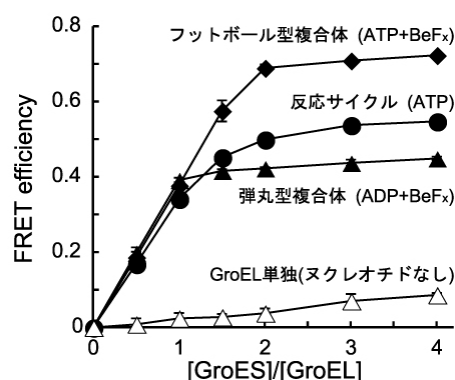


図 2. FRET を用いたフットボール型複合体の検出 (n=3, 平均±標準誤差)

2. ADP がフットボール型複合体形成に与える影響の解析

次に、GroEL の反応サイクルを ATP 添加により開始させてからフットボール型複合体の形成量が時間と共にどのように変化するかを GroEL-GroES の分子間 FRET を利用して調べた。その結果、時間が経過すると、フットボール型複合体の形成量は減少することが分かった。そこで GroEL により ATP が加水分解され、溶液中に ADP が蓄積したことがフットボール型複合体の形成に影響を与えたのではないかと考え、ADP 存在下における GroEL-GroES の分子間 FRET を測定した。その結果、ADP が存在するとフットボール型複合体の形成が阻害されることが明らかとなった(図 3)。この ADP によるフットボール型複合体形成阻害機構を明らかにす

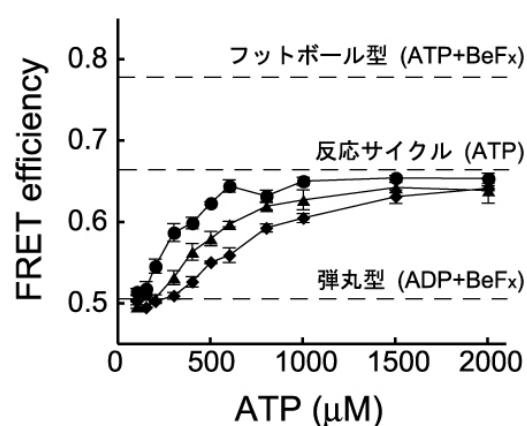


図 3. 一定の ADP 濃度存在下における ATP 濃度と GroEL-GroES 分子間の FRET 効率の関係。丸が 50 μM, 三角が 100 μM, ダイヤモンドが 150 μM ADP を表す。(n=3, 平均±標準誤差)

るため、様々な ADP 濃度において、ATP 加水分解前のアナログである ADP-BeF_x を利用して形成させた弾丸型複合体に2個目の GroES が結合する様子を FRET により解析した。すると、弾丸型複合体に対する GroES の結合速度は ADP 濃度依存的に低下することが分かった。

3. 変性タンパク質がフットボール型複合体形成に与える影響の解析

変性タンパク質は GroEL の ATPase 活性を増加させるなど、GroEL の反応サイクルに影響を与えることが知られている。そこで、変性タンパク質がフットボール型複合体の形成に与える影響を調べるため、変性タンパク質濃度を変化させて、GroEL-GroES の分子間 FRET を測定した。その結果、フットボール型複合体の形成は変性タンパク質濃度依存的に促進され、また、変性タンパク質による GroEL の ATPase 活性化と良好な相関を示した(図 4)。

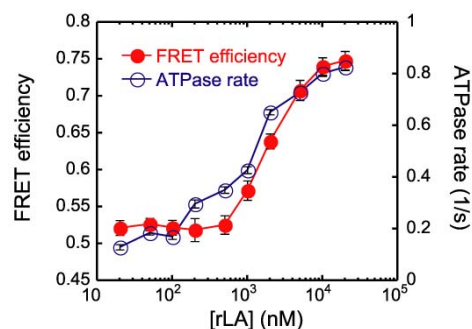


図 4. 変性タンパク質 (rLA) 濃度と GroEL-GroES 分子間の FRET 効率(黒丸)および GroEL の ATPase 活性の関係 (n=3, 平均±標準誤差)

次に、ADP によるフットボール型複合体形成阻害効果に対し、変性タンパク質がどのように影響しているのかについて調べた。20 μM ADP 存在下において変性タンパク質濃度を変化させ、ADP-BeF_x で形成させた弾丸型複合体に対する GroES の結合速度の変化を FRET により測定した。その結果、弾丸型複合体に対する GroES の結合速度が変性タンパク質濃度依存的に加速することが分かった。すなわち、変性タンパク質は ADP による 2 個目の GroES の結合阻害効果を低下させ、その結果、フットボール型複合体の形成を促進する働きがあることが明らかとなった。

4. フットボール型複合体の 1 分子蛍光イメージング

次に、GroEL がどのようにフットボール型複合体を経由した反応サイクルを進行させているのかについて調べることにした。フットボール型複合体を含む反応経路は GroEL1 分子に対し GroES が 2 分子相互作用するという 3 分子が関与した複雑な反応である。このような、複雑な反応を解析する場合、個々の反応の素過程を解析することができる 1 分子蛍光イメージング法の利用が有効である。そこで、フットボール型複合体を経由した GroEL の反応経路を 1 分子蛍光イメージングにより解析した。フットボール型複合体を飽和量形成させるためには、高濃度の蛍光標識 GroES を必要とするため zero-mode waveguides(ZMWs)基板を利用した 1 分子蛍光イメージング法を利用した。ビオチン及び Alexa488 で標識した GroES をビオチン化 BSA とストレプトアビジンを介して ZMWs 基板底面に固定し、50 nM Cy5 標識 GroEL(Cy5-GroEL), 300 nM Cy3 標識 GroES(Cy3-GroES), および変性タンパク質である還元型ラクトアルブミンを溶液中に存在させ、Cy3-GroES 及び Cy5-GroEL の蛍光を同時計測した(図 5A)。その結果、Alexa488-ビオチン化 GroES が存在する位置に Cy3-GroES, Cy5-GroEL の輝点が共局在する様子が確認できた。さらに共局在の様式は Cy3-GroES と Cy5-GroEL が同

時に結合して同時に解離する様式(タイプ 1, 図 5B), Cy3-GroES と Cy5-GroEL が同時に結合して,先に Cy3-GroES が解離する様式(タイプ 2, 図 5C)に分類され,タイプ 1 が 30%, タイプ 2 が 48%, その他の結合様式が 22%であった(図 5D). すなわち,フットボール型複合体の 2 つの GroES は先に結合したものが先に解離する場合 (タイプ 2) が若干多いものの,後から結合した GroES が先に解離すること(タイプ 1)もかなりの割合で起こることが明らかとなった. また, Cy3-GroES と Cy5-GroEL が共局在した時間を解析したところ,フットボール型複合体から弾丸型複合体へ移行する時間は約 3 秒,弾丸型複合体から GroEL 単体へと移行する時間は約 5 秒であった.

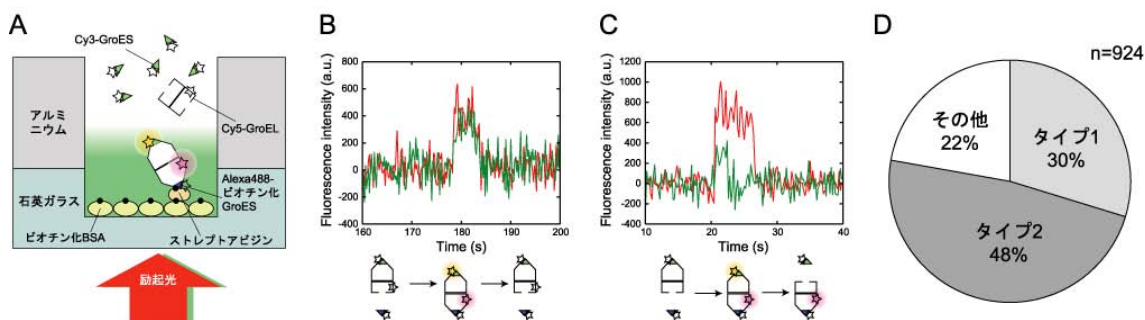


図 5. フットボール型複合体の 1 分子蛍光イメージング

A. 実験の模式図 B. 結合タイプ 1 の例 C. 結合タイプ 2 の例 D. 結合タイプの分類結果

【考察】

本研究の結果から, GroEL の反応機構は図 6 のようにまとめられる. まず, GroEL の反応サイクルにはフットボール型複合体を経由する経路と経由しない経路が存在する. フットボール型複合体は両側のリングが ATP の状態で形成され,そして,先に ATP が加水分解した側のリングから GroES が解離する. 変性タンパク質濃度が低いときは,フットボール型複合体から GroES が解離した後も GroEL のリングに ADP が残存する. その結果,フットボール型複合体の形成が阻害され, GroEL はフットボールを経由しない経路を利用して ATP の消費を抑えながら機能する. 一方,変性タンパク質濃度が高くなると, GroES が解離した後のリングから ADP が解離しやすくなる. その結果,フットボール型複合体が形成されやすくなり,両側のリングを同時並行で利用しながら効率のよい折れたたみ反応を進行させると考えられる. このように, GroEL は変性タンパク質濃度など細胞内の環境を察知しながら 2 つの経路を使い分けることが出来る巧妙に設計された分子機械であることが分かった. 本研究結果は GroEL の反応サイクル中にフットボール型複合体を経由する反応経路が存在し,また,どのような条件で現れるのかについて明確に示した初めての例である.

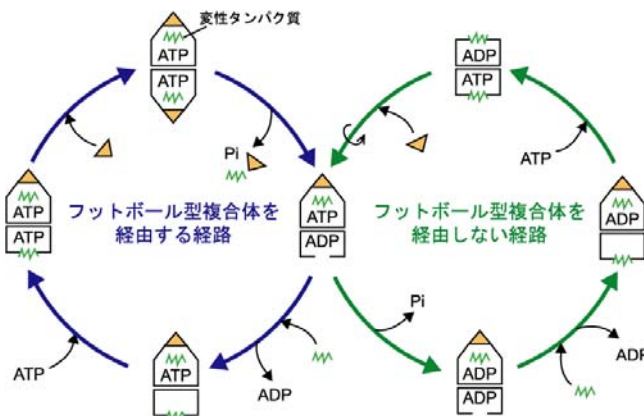


図 6. 本研究により明らかにされた GroEL の反応モデル