

博士学位論文

哺乳類分子シャペロン HSP60 の生理機能
および機能的構造に関する研究

Studies on the physiological function and
functional structure of the mammalian
molecular chaperon HSP60

秋田大学大学院 工学資源学研究科
博士後期過程 生命科学専攻

岡本 知也

2017

目次

第1章 序論	
1) 分子シャペロンとは	1
2) シャペロニン	3
第2章 哺乳類分子シャペロン HSP60 の生理機能及び構造変化	6
1) 緒言	6
1-1) 哺乳類分子シャペロン HSP60 と補因子 (コシャペロン) HSP10	6
1-2) 遺伝組み換え体を用いた HSP60/HSP10 の分子レベル研究	7
1-3) 研究目的	9
2) 実験材料及び実験方法	10
2-1) 哺乳類野生型分子シャペロン HSP60 の精製	10
2-2) 哺乳類野生型分子シャペロン HSP10 の精製	11
2-3) 基質タンパク質ローダネーゼ及びクエン酸合成酵素	12
2-3-1) ローダネーゼの発現と精製	12
2-3-2) クエン酸合成酵素の準備	13
2-4) サイズ排除クロマトグラフィーによる分子量測定	13
2-5) 透過型電子顕微鏡 (TEM) による分子観察	13
2-6) グルタルアルデヒド (GA) クロスリンク	14
2-7) ATP 加水分解測定	14
2-8) トリプシン消化耐性実験による HSP60/HSP10 の相互作用の確認	15
2-9) 化学変性基質タンパク質のリフォールディング実験	15
2-9-1) 化学変性ローダネーゼのリフォールディング実験	15
2-9-2) 化学変性クエン酸合成酵素のリフォールディング実験	16
2-10) 熱変性ローダネーゼのリフォールディング実験	17
2-10-1) CD スペクトルによるローダネーゼの熱変性の確認	17
2-10-2) リフォールディング実験	17
2-10-3) トリプシン消化耐性実験を用いた基質封入化の確認	17
3) 実験結果	19
3-1) ブタ肝臓由来の野生型 HSP60 は ATP 非存在下において 7 量体シグナルリング構造で存在する	19
3-2) ATP 存在下における HSP60 の構造変化	21
3-3) ATP 及び HSP10 両存在下における HSP60 の構造変化	23
3-4) HSP6 と HSP10 の相互作用は ATP 加水分解によって制御される	25
3-5) HSP60 による化学変性基質タンパク質のリフォールディング	28

3-6) 熱変性タンパク質のリフォールディングとフォールディングチャンバ ーへの封入	31
4) 考察	34
第3章 HSP60のヌクレオチド選択性とGTP加水分解活性	37
1) 緒言 シャペロニンとGTP加水分解活性	37
2) 実験材料及び実験方法	38
2-1) タンパク質の準備	38
2-2) 変性タンパク質のリフォールディング実験	39
2-3) NTP加水分解解析	39
2-4) SEC-MALSを用いた分子量解析	40
2-5) TEMによる分子観察	42
2-6) トリプシン消化耐性実験	42
2-7) NTPプルダウン実験	42
3) 実験結果	43
3-1) HSP60はGTP加水分解能を有し、シャペロン活性を発揮する	43
3-2) 二つのヌクレオチドによって誘導されるタンパク質間相互作用の差異	46
3-3) GTP加水分解によるHSP60/HSP10の複合体形成	48
3-4) 加水分解制御による複合体への影響	51
3-5) GTP加水分解によって発揮されるHSP60のシャペロン活性	53
3-6) ATP依存的なシャペロン活性に対するGTPの影響	55
4) 考察	58
第4章 総括	60
参考文献	62
研究業績	68
謝辞	71

第1章 序論

1) 分子シャペロンとは

生物が健康を維持して生きていくためには、生体内の恒常性（ホメオスタシス、*homeostasis*）の維持が重要となる。ホメオスタシスの維持に重要な役割を担っている因子として、タンパク質の恒常性維持がある[1]。哺乳類細胞において典型的に発現しているタンパク質は 1 万種を超えており、これらのタンパク質はアミノ酸配列によって定められた正しい構造（Native 構造）に折りたたまれ（フォールディング、*fold*ing）、単一もしくは他の折りたたまれたタンパク質と共に固有の立体構造を形成し（アッセンブリ、*assembly*）、活性状態を維持することで、生体にとって重要な多くの生理機能を提供し、ホメオスタシスを維持する。タンパク質の立体構造は生体内外のストレスによって容易に崩壊し、タンパク質の恒常性が崩壊する。タンパク質の立体構造は生体内の pH 変化や熱変化などのストレスによって容易に崩れ（変性）、タンパク質の活性を失う（失活）。タンパク質恒常性の崩壊はホメオスタシスに悪影響を及ぼし、その崩壊と共にがんや神経変性疾患といった各種疾患を引き起こす。

タンパク質の恒常性維持に深くかかわっているタンパク質の一群を分子シャペロン（*molecular chaperone*）と呼ぶ。分子シャペロンは原核生物から真核生物まで広く保存されたタンパク質群であり、その局在箇所や大きさ（分子量）などによって非常に多くの種類に分類される（Fig. 1）。分子シャペロンの機能は非常に多岐に渡っており、リボソームで合成された新規合成ポリペプチドの *fold*ing、Native 構造の維持、ストレス等によって変性したタンパク質（損傷タンパク質）の *refold*ing、*assembly* 補助、各種細胞小器官への輸送補助など、多くの細胞内反応過程に関わっている（Fig. 2）。

特に有名な分子シャペロンとしては熱によって誘導されるものがあり、そのため HSP（熱ショックタンパク質：Heat Shock Protein）とも呼ばれている。HSP はその分子量によって種類分けされており、よく知られているものとして HSP60、HSP70、HSP90 などがある。この中で、HSP60 は大腸菌の GroEL や真核生物の CCT と共に、分子シャペロンのシャペロニンファミリーに属しており、タンパク質の *fold*ing に対する重要な分子として知られている。

	シャペロニンシステム		Hsp70システム			Hsp104	Hsp90	sHsp
	補助因子		補助因子	補助因子	補助因子			
大腸菌 (真正細菌)	GroEL	GroES	DnaK	DnaJ CbpA	GrpE	CipB	Htp6	IbpA IbpB
出芽酵母								
サイトゾル	CCT/TRIC (Prefoldin)		Ssa1-4 Ssb1-2	Ydj1 Sis1	Snlp Fes1p	Hsp104	Hsp82 Hsc82	Hsp26 Hsp42
小胞体	-	-	Kar2/Bip	Sec63 Scj1	-	-	-	-
ミトコンドリア	Hsp60	Hsp10	Ssc1	Mdj1-2	Mge1	Hsp78	-	-
動物細胞								
サイトゾル	CCT/TRIC (Prefoldin)		Hsp72 Hsc73	Hdj1	Bag-1 HspBP1	-	Hsp90α Hsp90β Grp94	αA-crystallin αB-crystallin
小胞体	-	-	Bip/Grp78	MtJ1	-	-	-	-
ミトコンドリア	Hsp60	Hsp10	Grp75	hTid1	mt-GrpE	hHsp78	Trap1	-

Fig. 1 生物種を渡る分子シャペロンとその種類

代表的な分子シャペロンのファミリーを示す。これら典型的なシャペロンは原核生物から真核生物まで生物種を超えて広く保存されていることがわかる。図の表は「分子シャペロンによる細胞制御 永田和宏、森正敬、吉田賢右」より一部改変したのを使用している。

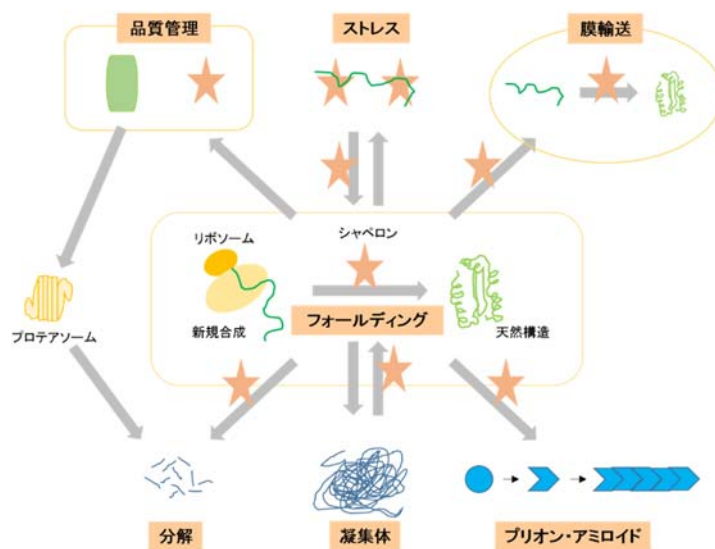


Fig. 2 生体内における分子シャペロンの機能

分子シャペロンの機能は「ゆりかごから墓場まで」とも称されるように、タンパク質が合成されてから分解・再利用されるまでのすべての生体反応に関わっている。図は「タンパク質の一生 集中マスター (羊土社)」より一部改変したのを使用している。

2) シャペロニン

分子シャペロンの中でも、特にタンパク質のフォールディングに重要である分子がシャペロニンである。シャペロニンはそのアミノ酸配列や構造的な特性を基に大きく二つのグループ（グループ I およびグループ II シャペロニン）に分けられる。グループ I シャペロニンには原核生物の GroEL や真核生物のミトコンドリア HSP60、グループ II シャペロニンには真核生物の細胞質シャペロニン CCT や古細菌グループ II シャペロニンなどが存在する。

シャペロニンファミリータンパク質の中でも、大腸菌のグループ I シャペロニン GroEL は、補因子（コシャペロン） GroES と共に、その生理機能・構造的な特長において特に詳細に解析されている（Fig. 3）。GroEL は約 57 kDa からなる単量体分子が 7 つ集まりリングを形成し、二つの 7 量体リングが背面同士で結合した 14 量体の巨大なダブルリング構造を形成する（Fig. 3A） [2]。さらに、GroEL 単量体は、GroES と相互作用部位及び基質結合のための疎水性に富んだアピカルドメイン（頂点ドメイン）、リング間の刺激伝達及び ATP 結合部位を提供するエクアトリアルドメイン（赤道ドメイン）、ATP 結合の刺激を分子内に伝えるインターメディアイトドメイン（中間ドメイン）という 3 つの重要なドメインから形成される。また、コシャペロン GroES は約 10 kDa からなる単量体分子が 7 つ集まったリング状分子である。GroEL はエネルギー通貨である ATP と結合することによって大きな結合変化を起こし、GroES と結合することで、GroEL と結合した新規合成もしくは変性ポリペプチドに対する適切なフォールディングチャンバーを形成する（Fig. 3B） [2, 3]。GroEL/GroES 複合体の ATP 依存的なタンパク質フォールディングサイクルはよく研究されている（Fig. 3C）[4]。1 : GroEL の片側のリングにポリペプチド及び ATP が結合し、2~3 : GroES が結合することによって基質をポリペプチド内に封入し、4 : ATP の加水分解の間に基質が正しい構造に折りたたまれ、5~6 : フォールディングが行われていないもう片方のリングへの基質、ATP 及び GroES の結合による刺激によって、折りたたまれたタンパク質を放出し、新たなフォールディングサイクルに入る。このように、GroEL/GroES はフォールディング活性化リング（シスリング）とフォールディング不活性リング（トランスリング）を ATP 結合・加水分解依存的に交互に入れ替えるカノニカルサイクルが一般的に提案されている。

GroEL/GroES 複合体によって形成されるフォールディングチャンバーは一般的に約 60 kDa までの分子を閉じ込めることができる（ケージ内フォールディング; in-cage-folding） [5]。最近の研究で、フォールディングチャンバーに入りきらない巨大分子に対する、GroEL の GroES 非依存的なフォールディングサイクルが報告された（ゲージ外フォールディング; out-of-cage folding） [6]。上記のようなタンパク質フォールディングに関する知見に加え、アピカルドメイ

ン上の疎水性部位を用いた神経変性疾患の原因のひとつとしてあげられる 40～42 アミノ酸残基のアミロイド β の繊維凝集化の抑制[7, 8]、アルファシヌクレインの凝集を抑制することによる毒性の減少や、 β 2 マイクログロブリンのような繊維形成タンパク質の凝集を抑制するといった[9]、単純なタンパク質フォールディングマシーンとは異なる機能が示唆されている。これらの報告は、シャペロニンが非常に多くの生体反応に関わりを持っていることを示唆しており、ホメオスタシスの維持になくてはならないものであることを強く示唆する。

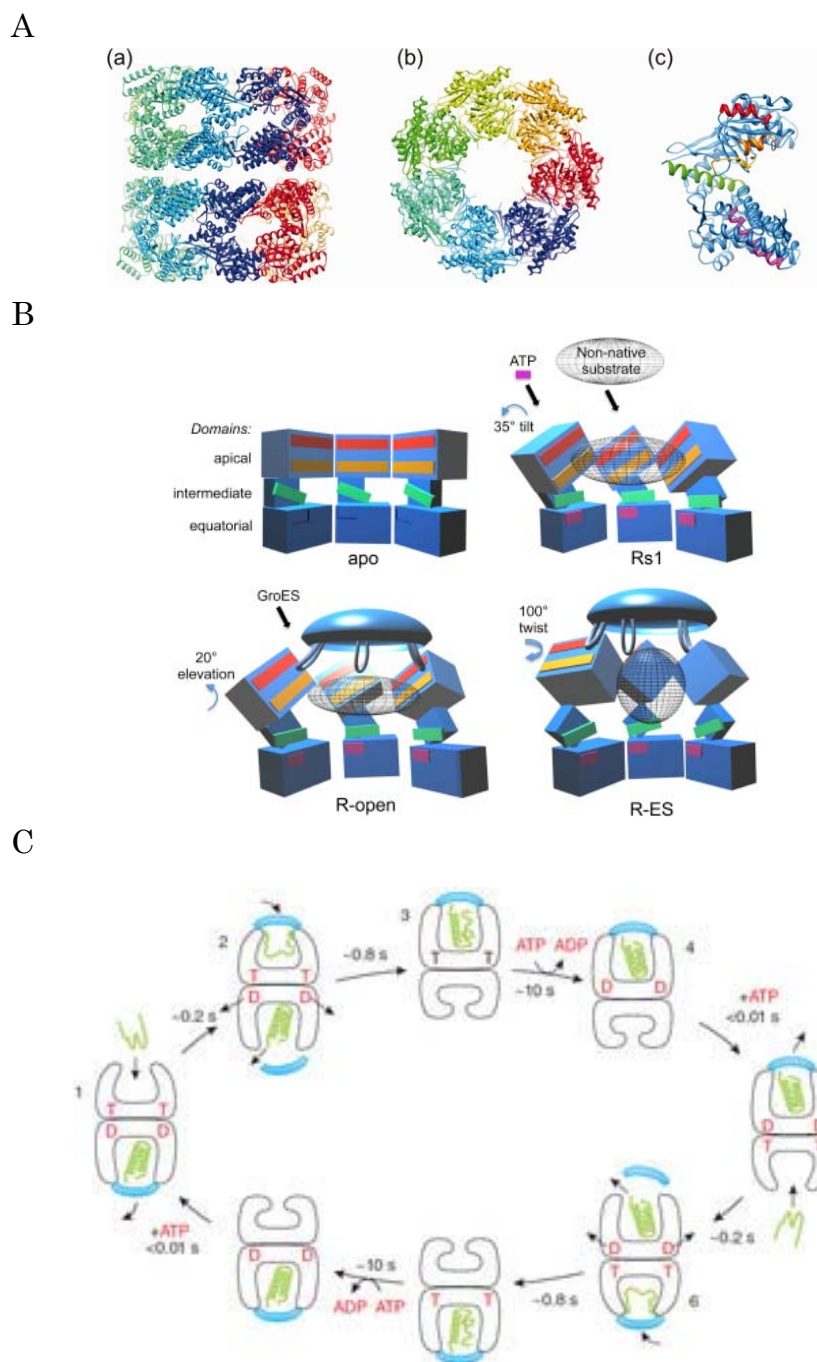


Fig. 3 大腸菌 GroEL の構造とシャペロニンサイクル

A は GroEL の結晶構造を示しており、(a)は真横から、(b)は真上から、(c)は単量体の GroEL を示している (文献[2]より一部抜粋)。

B は ATP 及び GroES 依存的なフォールディングチャンバーの形成を示している (文献[3]より)。

C はヌクレオチド依存的な GroEL/GroES のシャペロニンサイクルの模式図を示している (文献[4]より)。

第2章 哺乳類分子シャペロン HSP60 の生理機能及び構造変化

1) 緒言

1-1) 哺乳類分子シャペロン HSP60 と補因子（コシャペロン） HSP10

大腸菌の GroEL/GroES の分子レベルでの研究が詳細に進んできた一方で、哺乳類相同体である HSP60、特に、遺伝子組み換えを用いない野生型の HSP60 の研究はほとんど行われてこなかった。HSP60 と GroEL のアミノ酸配列はとても類似しており（相同性は約 50%）、基質タンパク質及びコシャペロン結合部やヌクレオチド結合部位などはとても良く保存されている。細胞生理学知見より、HSP60 は一般的に細胞小器官のミトコンドリアに局在しているといわれ、ミトコンドリアタンパク質のフォールディング、アッセンブリ、輸送及び安定化など、ミトコンドリア内のタンパク質恒常性の維持に重要な役割を果たしていると考えられる (Fig. 4) [10]。最近の病理学的な知見は、これら一般的な分子シャペロンとしての機能に加え、細胞質への HSP60 の集積によるアポトーシスの制御、細胞の免疫制御機構への関与やがんといった腫瘍細胞等における増加制御など、各種疾患や生体の重要な反応への HSP60 の関与を示唆している [11-14]。これらの報告は疾患治療のための分子標的としての HSP60 の潜在的可能性を強く示唆しており、これまでにいくつかの HSP60 を標的とした免疫抑制剤や抗癌試薬を用いた研究が報告されている [15-18]。

HSP60 の生体内における機能、特にタンパク質フォールディング機能を補助する分子として重要な役割を担っているのがコシャペロン HSP10 である [19]。HSP10 は大腸菌 GroES の相同体であり、相同性は約 40%、GroES のような約 10 kDa の単量体が 7 つ集まりリングを形成したドーム状分子であると考えられている。HSP10 の発見は当初、早期妊娠因子 (Early Pregnancy Factor; EPF) として認識され、免疫抑制に関与すると考えられていたが、後に EPF が HSP10 と同一であると同定され、その後も数多くの免疫反応の抑制や生体反応に関する知見が報告されてきた [13]。

このように、コシャペロン HSP10 を含む哺乳類におけるシャペロニン機能は、単純なフォールディングマシーン以外の多くの側面を持っている。これらの報告は哺乳類シャペロニンシステムの疾患治療に対する潜在的可能性を示唆しており、分子レベルでの研究が急務になっており、重要な研究テーマのひとつとなっている。

1-2) 遺伝組み換え体を用いた HSP60/HSP10 の分子レベル研究

HSP60 の分子レベルにおける研究は、大腸菌発現形を用いた遺伝子組み換え体で行われてきた。通常 14 量体のダブルリング構造で存在している大腸菌の GroEL と異なり、7 量体のシングルリング構造で存在していることが判明した。加えて、ATP の存在下において HSP60 は単量体、7 量体、14 量体間の動的平衡を行き来することが報告されている [20]。

GroEL と比較して最も興味深いのが、コシャペロンとの相互作用と、それによって引き起こされるシャペロニンサイクルの違いである。GroEL は一般的に、ATP の結合によってダブルリングの片方のリングにのみ GroES が結合する弾丸状構造 (bullet-shape complex) を形成し、二つのリングで交互に反応を進める弾丸型サイクルを行う (Fig. 3) [2~4]。一方 HSP60 はより複雑な複合体遷移をたどることが示唆されている。最も大きな違いが、HSP60 複合体の動的平衡は ATP 及び HSP10 の両存在下において 14 量体ダブルリング構造へ大きく傾き、さらに、両方のリングへ HSP10 が結合したフットボール状複合体 (football like complex) を形成し、反応サイクルを進める (ここではフットボールサイクルと呼ぶ) ことである [21]。また、シングルリング HSP60 に HSP10 が結合したシングルリング複合体においてもフォールディング機能を発揮するには十分であるという報告もある [22]。

最近の研究より、HSP60 のオープン構造を安定化させ、HSP10 との相互作用を強くし、安定な複合体を形成させる E321K HSP60 変異体 [23] を用いた HSP60/HSP10 複合体の結晶構造が明らかにされた (Fig. 5) [24]。その結果、興味深いことに、エクアトリアルドメインのわずかな数残基の変化によってリング間相互作用が変化し、GroEL と比較してより複雑な反応サイクルを形成することが示唆された。しかしながら、遺伝子組み換え体を用いたこれらの研究には落とし穴も考えられる。特に、結晶構造学解析で用いられた変異体は、変異に加えて、決まった構造を持っていない C 末端 GGM モチーフの除去も行われている。このモチーフは GroEL にも存在しており、これらの除去はシャペロニンの ATP 加水分解やシャペロン活性に影響を与えることが示唆されている [25, 26]。このことから、変異体を用いない野生型タンパク質で研究を行い、これらの現象を確かめることはとても重要な研究であるといえる。

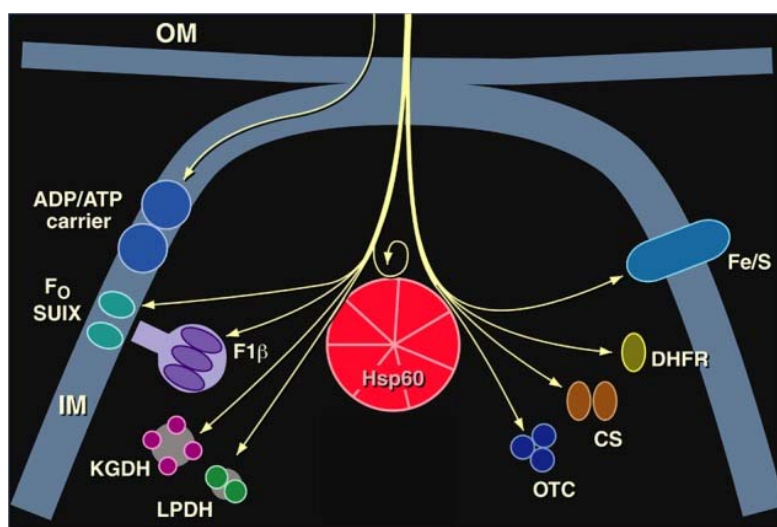


Fig. 4 ミトコンドリアの哺乳類分子シャペロン HSP60 の生理機能

図はミトコンドリアマトリックスにおける HSP60 の生理機能の模式図を表している。HSP60 を対象とした細胞生物学的研究は、可溶性分画のタンパク質から膜に存在するタンパク質まで、HSP60 が幅広くミトコンドリアタンパク質の安定性・機能発現に寄与していることを示してきた (文献[10]より)。

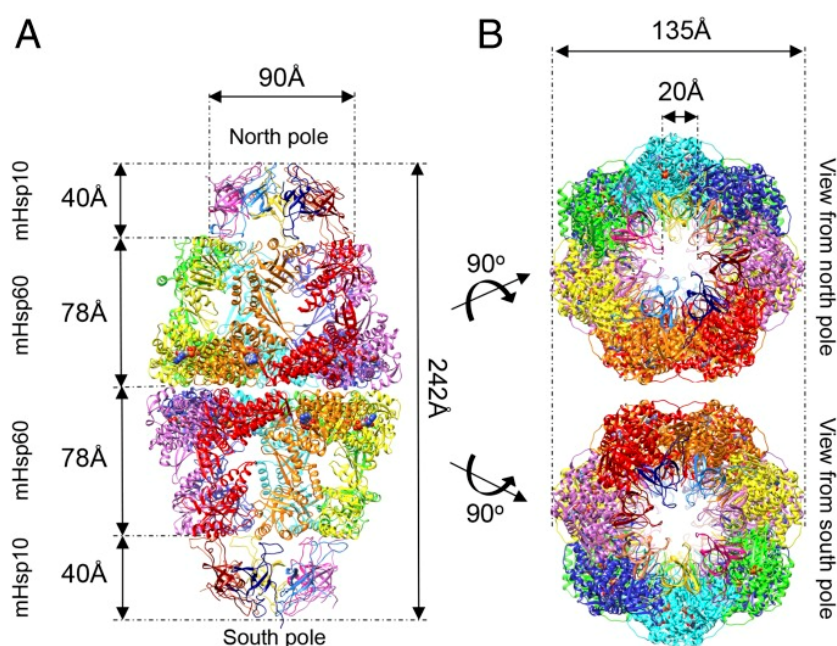


Fig. 5 哺乳類 HSP60/HSP10 複合体の結晶構造

HSP10 と安定な複合体を形成する HSP60 変異体 (E321K HSP60) を用いた ATP 依存的に形成されるフットボール型複合体の結晶構造。A は結晶を真横から、B は真上 (上部の図) 及び真下 (下部の図) から観察している。

1-3) 研究目的

ここまで述べてきたように、遺伝子組み換え技術を用いた哺乳類分子シャペロン HSP60 の発現・精製から分子レベルでの機能解析は最近になって非常に良く進んできている。しかしながら、野生型 HSP60 を用いた解析は、過去にいくつかの報告はなされているが[27, 28]、分子レベルでの詳細な解析にはいたっておらず、これまでほとんど進んでいない。本研究では、哺乳類野生型分子シャペロン HSP60 の安定な精製方法を確立すると共に、透過型電子顕微鏡や酵素活性測定法から得られた生理機能・構造変化・複合体遷移に関する分子レベルの基礎的情報を基に、生体内における野生型 HSP60 の反応モデルを予測することを目的とする。

2) 実験材料及び実験方法

2-1) 哺乳類野生型分子シャペロン HSP60 の精製

ブタ肝臓は、秋田県食肉流通センターから購入したものを使用した

1. ブタ肝臓 50 g に 3 倍量 (150 ml) の 0.25 M Sucrose, 1 mM PMSE, Buffer A (10 mM HEPES-KOH pH7.4, 5% Glycerol, 1 mM EDTA, 1 mM DTT) を添加し、ホモジェナイザーで破砕する
2. 破砕後、遠心分離機遠心分離機 BECKMAN J2-HS centrifuge を用いて遠心分離 (13,000 rpm、4°C、30 min) を行う
3. 遠心分離後、上清を回収し、Buffer A で平衡化した Q-Sepharose column (強陰イオン交換樹脂、Bed Volume 60 ml) に添加する。非吸着成分は別に回収し、野生型 HSP10 の精製に用いる
4. 300 ml の wash buffer (0.15 M NaCl, Buffer A) で樹脂を洗浄する
5. 0.15 ~0.6 M NaCl, Buffer A で、合計 240 ml になるように勾配溶出を行う。3 ml/tube となるように分種したフラクションを 9% SDS-PAGE, CBB 染色にて確認後、HSP60 含有フラクションを回収する
6. 回収したフラクションに、40%になるように硫酸アンモニウムを加え、4°C、30 分間マグネットスターラーで攪拌後、遠心分離 (13,000 rpm、4°C、15 min) を行う
7. 遠心分離後、上清を回収し、60%になるように硫酸アンモニウムを加え、4°C、30 分間マグネットスターラーで攪拌後、遠心分離 (13,000 rpm、4°C、15 min) を行う
8. 遠心分離後、沈殿を Buffer A で再懸濁し、Buffer A 8 l で一晩透析する
9. 透析後、Buffer A で平衡化した Heparin column (Bed Volume 20 ml) に添加する
10. 100 ml の Buffer A で樹脂を洗浄する
11. 0 ~0.15 M NaCl, Buffer A で、合計 100 ml になるように勾配溶出を行う。2 ml/tube となるように分種したフラクションを 9% SDS-PAGE, CBB 染色にて確認後、HSP60 含有フラクションを回収する
12. 回収したフラクションは Amicon Ultra (Ultracel-50k) を使用し、限外ろ過にて濃縮後、10 ml になるように回収し、0.2 μ m のフィルターに通す
13. 0.1 M NaCl, Buffer A で平衡化した Sephacryl™ S-300HR column (Bed Volum 120 mL) にサンプルを添加し、0.1 M NaCl, Buffer A で分離溶出する。
14. 21 ~80 ml の溶出範囲を、1 ml/tube になるように分取し、そのフラクションを 9% SDS-PAGE, CBB 染色にて確認後、HSP60 含有フラクションを回収する

15. 回収したフラクションに、20%になるように硫酸アンモニウムを加え、4℃、30分間攪拌する
16. 攪拌後のサンプルを20%硫酸アンモニウム、Buffer Aで平衡化したButyl FF column (Bed Volume 5 ml) に添加する
17. 30 ml の wash buffer (20%硫酸アンモニウム、20% methanol, Buffer A) で樹脂を洗浄後、Buffer Aで合計60 mlになるように勾配溶出する
18. 1 ml/tubeになるように分取したフラクションを、9% SDS-PAGE, CBB染色で確認後、HSP60含有フラクションを回収する
19. 回収したフラクションはAmicon Ultra (Ultracel-50k) を使用し、限外ろ過にて濃縮、preservation buffer (50 mM HEPES-KOH pH7.4, 10% Glycerol) に置換後、4℃で保存する

2-2) 哺乳類野生型分子シャペロン HSP10 の精製

1. 実験手法2-1の工程3で得られた陰イオン交換カラムの非吸着成分を40-60%の硫酸分画にかける。
2. 得られた沈殿をBuffer S (10 mM sodium acetate pH5.2, 1 mM EDTA) で回収し、Buffer Sで一晩透析する
3. 透析後、遠心分離 (13000 rpm, 4℃, 20 min) を行い、上清を回収する
4. 上清をBuffer Sで平衡化した陽イオン交換カラム (Bed Volume 30 ml) に添加する
5. 200 ml の Buffer S でカラムを洗浄した後、合計120 mlとなるように、0~0.7 M NaClの濃度勾配、2.5 ml/tubeの容量で回収する
6. 回収した分画を12% SDS-PAGE 及び CBB 染色で確認し、HSP10を含む分画を回収する
7. 回収した分画に20%の硫酸を加え、20%硫酸アンモニウム、Buffer Sで平衡化したButyl FF column (Bed Volume 5 ml) に添加する
8. 30 ml の wash buffer (20%硫酸アンモニウム、Buffer S) で樹脂を洗浄後、Buffer Sで合計60 mlになるように勾配溶出する
9. 1 ml/tubeになるように分取したフラクションを、12% SDS-PAGE, CBB染色で確認後、HSP10含有フラクションを回収する
10. 回収した分画を、Buffer Sで一晩透析する
11. 透析後の溶液を、Buffer Sで平衡化したHeparin Sepharose column (Bed Volume 30 ml) に添加する
12. 100 ml の 0.2 M NaCl, Buffer S でカラムを洗浄した後、0.2~0.8 M NaClの濃度勾配で溶出する

13. 溶出した分画に対して 12% SDS-PAGE 及び CBB 染色を行い、HSP10 含有分画を確認する
14. HSP10 含有分画を Amicon Ultra (Ultracel-10k) を使用し、限外ろ過にて濃縮、preservation buffer (50 mM HEPES-KOH pH7.4, 10% Glycerol) に置換後、4°Cで保存する

2-3) 基質タンパク質ローダナーゼ及びクエン酸合成酵素

2-3-1) ローダナーゼの発現と精製

遺伝子組み換え Rhodanese の発現は、Rhodanese の N-末端に 6 残基のヒスチジンが付加 (ヒスタグ) するように、以前当研究室で構築した発現ベクター pCold I His-Rhodanese を、発現用大腸菌 shuffle competent cell に形質転換し、グリセロールストックとして -80°C で保存したものを使用した。His-Rhodanese の精製には、樹脂に金属イオンを吸着させる固定化金属イオンアフィニティークロマトグラフィーの一種である Ni-NTA (Nickel-nitriloacetic acid) 担体を充填した Ni-NTA アフィニティークロマトグラフィーを用いた。

1. 少量のグリセロールストックを、抗生物質アンピシリン (終濃度 50 µg/ml) を添加した LB 培地で 37°C、250 rpm で一晩培養する
2. 培養した大腸菌を、100 倍量の新しく用意した LB 培地 (50 µg/ml アンピシリンを含む) に添加し、分光光度計を用いて 600 nm における吸光度が 0.5 になるまで 250 rpm、37°C で培養する
3. 吸光度が 0.5 にまで達した後、20 °C で 30 分間培養する。その後、終濃度 0.1 mM となるように IPTG を添加し、250 rpm、20°C で 24 時間培養する。
4. 培養後、遠心分離機 BECKMAN J2-HS centrifuge を用いて遠心分離 (13,000 rpm、4°C、15 min) によって大腸菌を回収し、10 mM Tris-HCl pH7.4 Buffer (10 mM THB) で再懸濁し、-80°C で保存する
5. 回収した大腸菌を、TOMY ULTRASONIC DISRUPTOR UD-200 を用いて超音波破碎する
6. 超音波破碎後、遠心分離機 BECKMAN COULTER Allegra™ 64R centrifuge を用いて遠心分離 (15,000 rpm、4°C、15 min) を行う
7. 遠心分離後、上清を回収し、平衡化バッファー (20 mM Imidazole, 0.3 M NaCl, 10 mM THB) で平衡化した Ni-NTA affinity column (Bed Volume 20 ml) に添加する
8. 100 ml の wash buffer (50 mM Imidazole, 0.3 M NaCl, 10 mM THB) で樹脂を洗浄する
9. 0.1 ~0.5 M Imidazol, 0.3 M NaCl, 10 mM THB で、合計 100 ml になるように勾配溶出を行う。2 ml/tube となるように分種したフラクションを 11%

SDS-PAGE, CBB 染色にて確認後、His-Rhodanese 含有フラクションを回収する

10. 回収したフラクションは Amicon Ultra (Ultracel-10k) を使用し、限外ろ過にて濃縮、preservation buffer (50 mM HEPES-KOH pH7.4, 10% Glycerol) に置換後、-80°Cで保存する

2-3-2) クエン酸合成酵素の準備

ブタ心臓から精製されたクエン酸合成酵素は Sigma-Aldrich から購入したものを使用した。

2-4) サイズ排除クロマトグラフィーによる分子量測定

1. タンパク質の分離に用いる TSK-GEL G3000SW column を assay buffer (10 mM HEPES-KOH pH7.4, 10 mM MgCl₂, 20 mM KCl)で一晩平衡化する (0.1 ml/min, 16 hours)
2. 精製した HSP60 (0.3 mg/ml) を assay buffer に希釈し、100 µl のサンプルを作成し、流速 1 ml/min で分離する
3. Thyroglobulin, Aldolase, Ovalbumin (Gel Filtration Kit HMW, GE Healthcare) の分離時間を用いて作成した standard curve と HSP60 の分離時間を用いて、HSP60 の分子量を算出する
4. 単量体分子量は、ChemiDoc MP System 及び Image Lab™ Software (BioRad) を用いて SDS-PAGE の結果から算出する
5. サイズ排除クロマトグラフィーを用いて算出された多量体分子量と、SDS-PAGE によって算出された単量体分子量を用いて、サブユニット数を決める

2-5) 透過型電子顕微鏡 (TEM) による分子観察

透過型電子顕微鏡 (TEM) は、秋田大学バイオサイエンス教育・研究センター分子医学部門、日立 H-7650 TEM を使用し、メッシュにはコロジオン膜張付メッシュ (日新 EM 株式会社) を真空状態でエッジングしたものを使用した。2%酢酸ウラン (秋田大学医学部 医学科 構造機能医学講座より提供) を用いた negative 染色法を用いた。分子観察における拡大倍率は 40000 倍、加速電圧は 100 kv で分子観察を行った。複合体分子形の統計分析は約 100 分子のサイドビューを 3 回に分けて収集することで行われた。

1. HSP60/HSP10 をそれぞれ終濃度 0.1 µM/0.2 µM になるように、assay buffer (50 mM HEPES-KOH pH7.4, 10 mM MgCl₂, 20 mM KCl, 1 mM DTT) に添加し、25°Cで 10 分間プレインキュベートする

2. ATP を終濃度 1 mM になるように添加し、25°C で 10 分間インキュベートする
3. インキュベート後、2%酢酸ウランで 2 回洗浄後、酢酸ウラン上に静置して、1 分間インキュベートする
4. インキュベート後、完全に乾燥させ、透過型電子顕微鏡にて観察する

2-6) グルタルアルデヒド (GA) クロスリンク

グルタルアルデヒド (GA) はタンパク質の架橋剤として使われており、HSP60 を含む、多量体タンパク質の安定化、多量体検出のためにも広く使用されている [29, 30]。本研究においても、HSP60 の ATP 及び HSP10 依存的な高分子形成を安定的に検出するために用いられた。

1. HSP60 (1.5 μ M) もしくは HSP60/HSP10 (1.5 μ M/3 μ M) を 1 mM ATP の存在もしくは非存在下における assay buffer (50 mM HEPES-KOH pH 7.4, 10 mM $MgCl_2$, 20 mM KCl, 1 mM DTT) に希釈し、25°C で 5 分間インキュベートする
2. 0.1% GA を添加し、25°C で 10 分間架橋反応を行う
3. 1 M Urea を含む SDS sample buffer を添加し、100°C で 5 分間インキュベートすることで反応を停止させる
4. 作成したサンプルは、i) 2.5-7% SDS-PAGE 及び CBB 染色、もしくは、ii) Blue Native PAGE (NativePAGE™ 3-12% Bis-Tris Gel, Invitrogen) 及び anti-HSP60 IgG を用いたイムノブロットによって解析する

2-7) ATP 加水分解測定

ATP 駆動タンパク質は、ATP を加水分解 ($ATP \rightarrow ADP + P_i$) することによって生まれるエネルギーを利用して固有の機能を発揮する。本研究では、ATP の加水分解によって産生された遊離リン酸を、マラカイトグリーンによる呈色反応によって検出することで、HSP60 の ATP 加水分解能を調査した。

1. 0.1 μ M の HSP10 存在、非存在下の assay buffer (50 mM HEPES-KOH pH 7.4, 10 mM $MgCl_2$, 20 mM KCl, 1 mM DTT) に、終濃度 0.1 μ M になるように HSP60 を希釈し、25°C で 10 分間プレインキュベートする
2. ATP を終濃度 1 mM になるように添加し、25°C でインキュベートする
3. 0 min, 60 min 間インキュベートしたサンプル 50 μ l を 96 well plate (greiner bio-one) へ移し、Biomol Green reagent 100 μ l (Enzo Life Science, New York, USA) を加え、室温で 25 分間インキュベートする
4. 650 nm の波長における遊離リン酸の吸光度を測定し、検量線にて定量化する

2-8) トリプシン消化耐性実験による HSP60/HSP10 の相互作用の確認

トリプシンはリジンおよびアルギニン残基のカルボキシル末端側を特異的に切断するタンパク質分解酵素である。タンパク質が他のタンパク質と結合する、もしくは構造変化を起こして露出残基が変化すると、分解酵素によるタンパク質分解パターンに変化が生まれる。この性質を利用して、HSP60 と HSP10 の結合解析を行った。

1. 終濃度 1 μM になるように (トリプシンとヌクレオチドを加えた後) HSP60/HSP10 を assay buffer (50 mM HEPES-KOH pH7.4, 10 mM MgCl_2 , 20 mM KCl, 1 mM DTT) に希釈し、25°Cで 10 分間プレインキュベートする
2. ヌクレオチドを終濃度 1 mM になるように (トリプシン添加後) タンパク質溶液に添加し、10 分間インキュベートする
3. トリプシンを終濃度 10 $\mu\text{g/ml}$ になるようにタンパク質溶液に添加し、25°Cで 15 分間インキュベートする
4. 4×Sample buffer を加えて反応を停止させ、12% SDS-PAGE, CBB 染色にて結果を確認する

2-9) 化学変性基質タンパク質のリフォールディング実験

2-9-1) 化学変性ローダネーゼのリフォールディング実験

Rhodanese はミトコンドリアの中に存在し、シアン化物をチオシアン化物に変換して毒性を減少させる解毒酵素である。Rhodanese はほとんど自発的にフォールディングを行わず、その折りたたみを分子シャペロンに依存している。それゆえ、GroEL の基質タンパク質として最もよく使われているタンパク質のひとつでもある。

1. 終濃度 5 μM になるように Rhodanese を変性溶液 (50 mM HEPES-KOH pH7.4, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 6 M Guanidine hydrochloride) に添加し、25°Cで 1 時間インキュベートし、Rhodanese を完全変性させる。
2. 変性 Rhodanese を終濃度 0.025 μM になるように、0.2 μM の HSP60 存在、非存在下の assay buffer (50 mM HEPES-KOH pH7.4, 10 mM MgCl_2 , 20 mM KCl, 20 mM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, 200 mM glucose) に希釈し、よく攪拌した後、HSP10 (0.4 μM) を添加する
3. タンパク質溶液にヌクレオチドを終濃度 1 mM になるように添加して反応を開始する
4. 反応開始から、各時間ごとにタンパク質溶液から 10 μL を回収し、Assay mixture (67 mM KH_2PO_4 , 83 mM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, 10 mM EDTA, 0.1 mg/ml BSA)

に添加し（氷上）、反応を停止させる

5. 全反応終了後、すべての assay mixture を 25°C で 10 分間インキュベートする
6. すべての assay mixture に 0.25 M KCN を 25 μ l 添加し、25°C で 30 分間インキュベートする
7. 18% ホルムアルデヒドを添加した後、Fe³⁺溶液 (0.25 M Fe(NO₃), 12% HNO₃) を 100 μ l 添加する
8. 反応溶液 200 μ l を 96 well plate へ移し、450 nm における吸光度を測定する
9. 非変性 Rhodanese の活性を 100% (測定された吸光度を 100%として使用) として、酵素活性が何%回復したかを算出する

2-9-2) 化学変性クエン酸合成酵素のリフォールディング実験

クエン酸合成酵素 (CS) はミトコンドリアに存在するタンパク質であり、約 45 kDa の単量体同士が結合した 2 量体タンパク質である。CS は 2 量体を形成することによって、その分子間に活性中心が作られ、酵素活性を発揮する[31]。CS の GroEL/GroES によるリフォールディングはよく研究されており、温度が上昇するにつれてその自発的リフォールディングが抑制されることが明らかにされている[32]。本研究では CS がオキサロ酢酸及びアセチル CoA を基質とし、反応性生物である CoA-SH を DTNB (5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid)、エルマン試薬) による呈色反応を用いて検出し、CS の酵素活性の回復を調査した。

1. 終濃度 10 μ M になるように CS を変性溶液 (50 mM HEPES-KOH pH 7.4, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 6 M Guanidine hydrochloride) に添加し、25°C で 1 時間インキュベートし、CS を完全変性させる。
2. 変性 CS を終濃度 0.05 μ M になるように、0.2 μ M の HSP60 存在、非存在下の assay buffer (50 mM HEPES-KOH pH7.4, 10 mM MgCl₂, 20 mM KCl, 20 mM Na₂S₂O₃, 200 mM glucose) に希釈し、よく攪拌した後、HSP10 (0.4 μ M) を添加する
3. タンパク質溶液にヌクレオチドを終濃度 1 mM になるように添加して反応を開始し、25°C で 60 分間インキュベートする
4. インキュベーション後、CS reaction buffer (0.4 mM Oxaloacetic acid, 0.5 mM DTNB, 10 mM EDTA, 0.01 mg/ml BSA, 50 mM HEPES-KOH pH7.4) に添加することで反応を停止させる
5. 反応停止後、CS reaction buffer に 0.1 mM acetyl-CoA を添加し、5 分間室温で反応させる
6. 412 nm の波長で吸光度を測定し、Native 活性と比較することでリフォール

ディング率を算出する

2-10) 熱変性ローダナーゼのリフォールディング実験

2-10-1) CD スペクトルによるローダナーゼの熱変性の確認

ローダナーゼの熱安定性は 50°C以上の高温で失われ、変性・凝集することが報告されている[33]。CD スペクトル（円偏光二色性測定）はタンパク質の二次構造を予測するために非常に良く使われている実験装置であり、ローダナーゼの高温による二次構造の現象を確認するために用いた。

1. ローダナーゼ (15 μM) を assay buffer (50 mM HEPES-KOH pH7.4, 10 mM MgCl_2 , 20 mM KCl, 20 mM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, 200 mM glucose) に希釈し、25°Cもしくは55°Cで5分間インキュベートする
2. 195 から 250 nm の波長及び窒素存在下において、J-720 spectrophotometer（日本分光）を用いてローダナーゼの CD スペクトルを測定する
3. 付属の標準解析ソフトウェアを用いて、ノイズ除去及び光学定数演算を行い、ローダナーゼの CD スペクトルを算出する

2-10-2) リフォールディング実験

1. ローダナーゼ (0.025 μM) を HSP60 (0.2 μM) の存在もしくは非存在下の assay buffer に希釈し、55°Cで5分間インキュベートする
2. 熱変性後、25°Cで10分間インキュベートする
3. HSP10 (0.4 μM) 及び ATP (1 mM) を添加し、25°Cリフォールディング反応を行う
4. リフォールディング反応の停止、ローダナーゼ酵素活性、リフォールディング率の算出は実験方法 2-9-1) と同様の方法で行う

2-10-3) トリプシン消化耐性実験を用いた基質封入化の確認

実験方法 2-8) でも述べたように、トリプシンはリジンおよびアルギニン残基のカルボキシル末端側を特異的に切断する。また、シャペロニン GroEL はコシャペロン GroES と共にフォールディングチャンバーを形成し、チャンバー内に基質を閉じ込め、他の分子から隔離する[34]。この性質を利用して、閉じ込められたタンパク質がプロテアーゼによる分解からシャペロニンによって保護されることを確認することによって、タンパク質の封入化を確認する実験が行われた[35, 36]。

1. ローダナーゼ (1 μM) を HSP60 (1 μM) の存在もしくは非存在下の assay buffer に希釈し、55°Cで5分間インキュベートする
2. 変性反応後、25°Cで15分間インキュベートする

3. HSP10 (2 μ M) 及び ATP (1 mM) を添加し、25°Cリフォールディング反応を開始する
4. リフォールディング開始から 1 分後もしくは 60 分後の反応溶液をトリプシン (2 μ g/ml) で 25°C、3 分間処理する
5. すべての反応は SDS-sample buffer の添加によって停止され、12% SDS-PAGE および CBB 染色によって解析する

3) 実験結果

3-1) ブタ肝臓由来の野生型 HSP60 は ATP 非存在下において 7 量体シングルリング構造で存在する

研究のはじめに、ブタ肝臓抽出物からの野生型 HSP60 及び HSP10 の精製を行った。Fig. 6A は精製した HSP60 及び HSP10 のそれぞれの SDS-PAGE の結果であり、それぞれ約 60 kDa および 10 kDa の単一バンドとして精製できたことがわかる。Fig. 6B は精製した HSP60 の Native-PAGE の結果を示しており、安定な多量体を形成していることがわかる。

より詳細な情報を得るために、透過型電子顕微鏡を用いた分子の可視化を行った [Fig. 6C]。白色の三角形で示した分子が HSP60 を真上から観察した画像であり (Top view)、白色の矢印で示した画像が真横から観察した画像である (Side view)。Top view の拡大図 (Fig. 6C, 一番下の 3 つのパネル) は、精製した野生型 HSP60 がこれまで報告されているグループ I シャペロニンのように、7 つのサブユニットから成るリング構造を形成していることがわかる。

さらに詳細な分子データを得るために、精製した HSP60 に対してサイズ排除クロマトグラフィーを用いた分子量測定を行った (Fig. 6D)。サイズ排除クロマトグラフィーは分子の大きさ (分子量) に従ってそれぞれの分子を分ける分子ふるいとして働く。そのため、あらかじめ分子量既知のサンプルを用いて保持時間 (または溶出時間, retention time) を調べ、分子量と保持時間に関するプロットから検量線を作成し、目的タンパク質の保持時間より目的の分子量を入手する。本実験では分子量既知の分子として Thyroglobulin (669 kDa), Aldolase (158 kDa), Ovalbumin (44 kDa) を用いており、それぞれの保持時間は 13.2 min, 16.75 min, 18 min であった。HSP60 の保持時間は 14.35 min であり、分子量は 418.9 kDa であった (Fig. 6D, 右の表)。SDS-PAGE を用いて単量体分子量を計算し、サブユニット数を決定した結果、精製した野生型 HSP60 は安定な 7 量体リング構造を形成していることがわかり、TEM 画像の side view はシングルリングを現している。

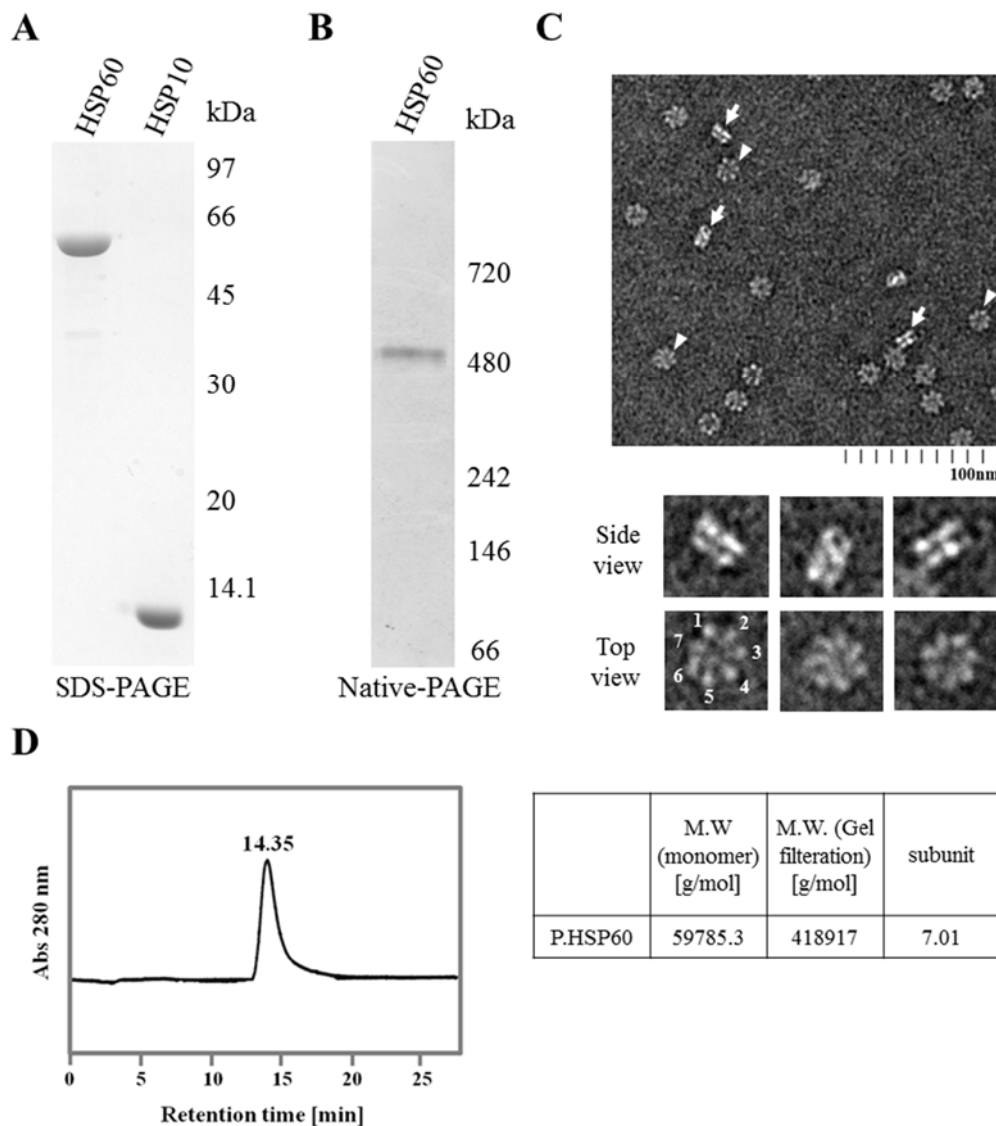


Fig. 6 哺乳類野生型分子シャペロン HSP60 の精製結果

A は精製した野生型 HSP60 及び HSP10 の SDS-PAGE を示している。B は HSP60 の Native-PAGE の結果を示す。C は野生型 HSP60 の透過型電子顕微鏡画像であり、白の矢印は side view を示し、白の三角は top view を示す。下の上下3つのパネルは、side view 及び top view を3分子ずつ選び、拡大した画像を示している。top view の拡大図より、HSP60 が7つのサブユニットがリング状につながった分子であることがわかる。D はサイズ排除クロマトグラフィーの結果を示す。SDS-PAGE から得られた単量体分子量と SEC 実験より算出された多量体分子量より、精製した野生型 HSP60 が安定な7量体で存在していることわかる。

3-2) ATP 存在下における HSP60 の構造変化

HSP60 が ATP の存在によってダブルリングかすることは以前から報告されている。この現象が精製した野生型タンパク質でも生じるかどうかを、透過型電子顕微鏡による分子観察で解析した (Fig. 7A)。ATP 存在下において HSP60 はシングルリング構造 (Fig. 7A, 白色の矢印) に加えて、シングルリングが二つ重なったダブルリング構造 (Fig. 7A, 白色の三角形) を形成した分子も観察された。Side view 分子を約 100 分子数えた結果、ダブルリングを形成している HSP60 は約 40%弱であることが示唆された。

ダブルリング化の更なる確証を得るために、グルタルアルデヒド (GA) による分子の架橋・固定化実験が行われた。この分子内及び分子間の架橋・固定化によって、動的に不安定な複合体を安定的にすることができる。また、通常、タンパク質分子は変性・還元条件下においてその構造的特性を失い、変性した単一のポリペプチドになる。SDS-PAGE はこの原理を利用しており、安定的に単量体分子を検出する。しかし、GA によって分子内及び分子間の接触を架橋・固定化することによって、変性条件下に分子をさらした場合、多量体状態のまま変性させ、SDS-PAGE によって検出することができる。Fig. 7B は GA によって処理した ATP 存在下及び非存在下における HSP60 の SDS-PAGE の結果を示している。ATP 非存在下において、GA で処理していない HSP60 と比較して、非常に大きくタンパク質バンドが高分子側にシフトした。このタンパク質バンドは単一バンドとして現れていることから、安定な 7 量体 HSP60 を示していると考えられる。ATP の添加によって、さらに高分子側にタンパク質バンドが出現しており、これがダブルリング構造を形成した HSP60 だと考えられる。

次に、Native 状態における複合体遷移を観察するために、Blue Native PAGE を用いた。Control 実験及び ATP 非存在下で GA 処理を行った HSP60 は 7 量体のシングルバンドのみで検出され、ATP, GA 両処理によってダブルリングを示すと思われるタンパク質バンドの出現を確認できた (Fig. 7C)。

この実験では HSP60 の単量体を示す明確な証拠は検出されず、また、ATP 依存的なダブルリングかを確認できた一方で、その変化は大きい変化ではなかった (TEM において 40%弱であり、GA 処理によるわずかなバンドの増加)。これらの結果は、HSP60 の構造遷移の動的平衡が ATP の結合によってわずかにダブルリング構造に傾くことを示している。

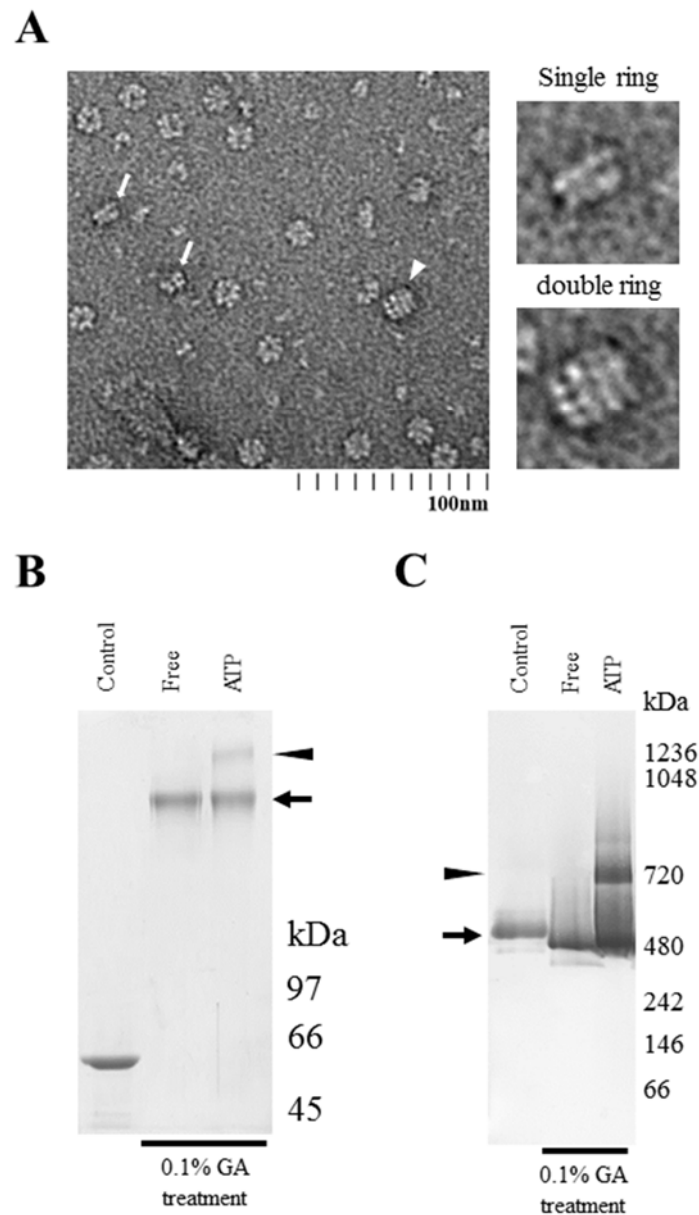


Fig. 7 ATP 依存的な野生型 HSP60 の構造変化

A は ATP 存在下における HSP60 の TEM 画像を示している。白矢印は 7 量体シングルリング構造の side view を、三角は 14 量体ダブルリング構造の side view を示している。それぞれの拡大図を右の二つのパネルに示し、上部のパネルがシングルリングを、下部のパネルがダブルリング HSP60 を示している。B 及び C は ATP 存在下及び非存在下における HSP60 のグルタルアルデヒド (GA) で処理したサンプルの SDS-PAGE 結果 (B) 及び Blue Native PAGE 結果 (C) を示している。黒の矢印がシングルリング、三角がダブルリングの HSP60 を示している。

3-3) ATP 及び HSP10 両存在下における HSP60 の構造変化

HSP60 の ATP 依存的な複合体遷移はコシャペロン HSP10 の存在下で安定化されることが、遺伝子組み換え HSP60 を用いた研究結果から明らかになっている。本研究においても、精製した野生型 HSP60 を用いた HSP10, ATP 両存在下における複合体の形成を、TEM 実験にて観察した。ATP 非存在下において HSP60 は HSP10 と相互作用せず、Fig. 6C のようなシングルリング構造でのみ存在していた (Fig. 8A、上部の TEM 画像)。一般的な知見として、GroEL は ATP 存在下において GroES と相互作用し、弾丸型複合体を形成する[2~4]。これまでの遺伝子組み換え HSP60 を用いた分子レベルの知見は、GroEL/GroES 複合体と異なり、HSP60 が ATP 存在下で HSP10 と相互作用し、ダブルリング化した HSP60 の両リングに HSP10 が結合した巨大なフットボール型複合体を形成することを示している[21]。この知見と一致して、野生型 HSP60 もまた、ATP、HSP10 両存在下においてフットボール型複合体を形成することが判明した (Fig. 8A、下部の TEM 画像)。

より詳細な構造的情報を入手するために、TEM 画像から得られる分子画像を用いて統計的解析を行った。HSP60 は ATP, HSP10 両存在下において主にフットボール型複合体 ($\text{HSP60}_{14}\text{-(HSP10}_7\text{)}_2$) を形成するのに加えて、シングルリング構造 (HSP60_7)、シングルリング複合体 ($\text{HSP60}_7\text{-HSP10}_7$) GroEL/GroES のような弾丸型複合体 ($\text{HSP60}_{14}\text{-HSP10}_7$) という非常に多くの複合体構造を形成していることが判明した (Fig. 8B、上部 3 つのパネル)。これらの分子観察を踏まえて、シングルリング構造及びシングルリング複合体をシングルリング構造種、弾丸型複合体及びフットボール型複合体をダブルリング構造種とした場合、シングルリング構造種は全体の約 30%であったのに対し、ダブルリング構造種は約 70%であることが判明した。今回の TEM 観察において、ATP のみの存在下で見られたようなダブルリング HSP60 (HSP60_{14}) を示す明確な画像は入手することができなかった。

次に GA 処理によるクロスリンク実験を行った。シングルリングからダブルリングへのタンパク質バンドのシフトは ATP のみの存在下と比較して、ATP、HSP10 両存在下において大きく増加した (Fig. 8C)。この結果は、TEM 観察で得られた統計学的情報を支持しており、HSP60 のダブルリング化が HSP10 の結合によって安定化されることを示唆している。

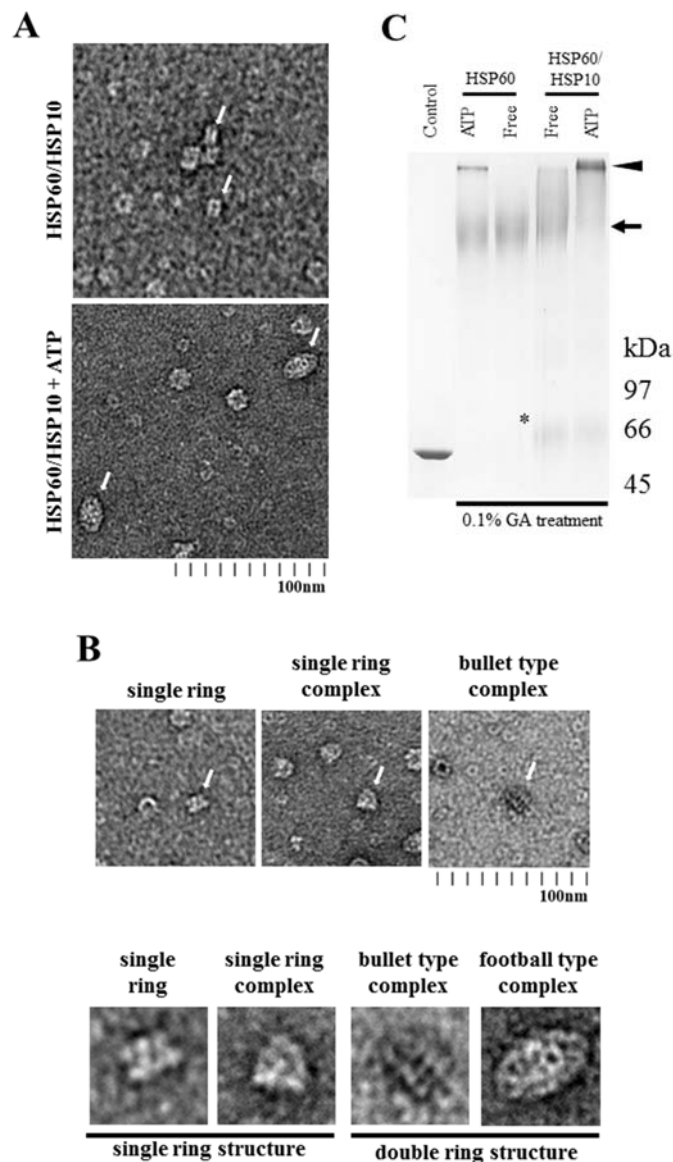


Fig. 8 ATP, HSP10 依存的な HSP60 の複合体形成遷移

A の上部は ATP 非存在下における HSP60/HSP10 の画像を、下部は ATP 存在下における画像を示している。上部の白矢印はシングルリングを示しており、下部の白矢印は HSP60/HSP10 によって形成されたフットボール型複合体を示す。B の上部はフットボール型複合体の他に観察された HSP60/HSP10 の複合体を示す。下部はそれぞれの複合体の拡大図であり、これら分子を 100 分子以上、3 回に分けてカウントし、二つの構造種にクラス分けをして統計学的解析を行った。C は GA 処理によって固定された複合体を SDS-PAGE にて解析した結果を示す。黒矢印はシングルリングを、三角はダブルリング複合体を示している。* は 7 量体 HSP10 のタンパク質バンドを示している。

3-4) HSP60 と HSP10 の相互作用は ATP 加水分解によって制御される

これまでの結果は HSP60 と HSP10 の相互作用が ATP によって制御されていることを示してきた。分子シャペロンの多くはその生理機能を発揮するために ATP 加水分解を利用しており、グループ I シャペロニンも典型的な ATP 加水分解タンパク質である[2]。ATP によって制御される HSP60 と HSP10 の相互作用を解析するため、最初にタンパク質分解酵素消化実験を行った。タンパク質分解酵素にはトリプシンを用いる。HSP60 と結合していない遊離の HSP10 は溶液中のトリプシンによって分解される。しかし、HSP60 と結合した HSP10 はトリプシンによって分解される部位が隠されることによって分解されない。トリプシンで処理したサンプルを SDS-PAGE で解析することによって、分解の有無を検出し、相互作用の有無を確認することができる (Fig. 9A)。今回はヌクレオチドの結合と加水分解によって制御される分子間の結合を調査するために、ATP に加えて、ADP、加水分解アナログである AMP-PNP 及び ATP γ S、ADP の γ -リン酸位に Al がフッ素を配位することによって加水分解を失速させる ATP-AlFx (もしくは、ATP の加水分解後に形成されるため ADP-AlFx と呼ばれる) を用いて実験を行った。

ヌクレオチド非存在下において、HSP10 のタンパク質バンドは完全に消失し、その下にトリプシンによって分解された HSP10 のタンパク質バンドが現れた。GroEL/GroES 相互作用に関するヌクレオチドの関係は研究されており、ATP に加えて、ADP, AMP-PNP, ATP γ S 存在下でも相互作用を確認できる[37]。しかしながら、HSP60 と HSP10 の相互作用は ATP に加えて、AMP-PNP 及び ATP-AlFx でのみ検出された。また、見かけ上の結合力の強さは ATP-AlFx > ATP > AMP-PNP となった。

Fig. 9B は HSP60 の ATP 加水分解能を示しており、HSP10 の結合によって HSP60 の ATP 加水分解活性が抑制されていることがわかる。加えて、AlFx の添加はこれらの活性をさらに抑制していることがわかる。Fig. 9A で観察された ATP 加水分解の失速による見かけ上の結合力の増加を、トリプシン消化耐性実験でさらに調査した (Fig. 9C)。Fig. 9C はトリプシンによる処理を時間経過毎に追跡し、nucleotide free, ATP 及び ATP-AlFx 存在下における HSP10 の結合持続力を調べている。ヌクレオチド非存在下の場合、5 分までにはほとんどの HSP10 がトリプシンによって分解された。ATP 存在下では、約 20 分でほとんど分解された。これらの結果と比較して、ATP-AlFx による HSP60 の ATP 加水分解の失速は、30 分経っても HSP10 がほとんど分解されていないことから、HSP10 の結合を強く増加させていることがわかる。

TEM を用いた分子観察は、さらに重要な情報を提供しているように思われる (Fig. 9)。HSP60 は ATP-AlFx によって明確なダブルリング化の増加が観察さ

れなかったのに対し (Fig. 9D、上部のパネル)、HSP10 の添加によって、side view で観察されるほとんどの分子がフットボール構造を形成した (Fig. 9D 下部のパネル)。これらの結果は、HSP60 による ATP の結合・加水分解はダブルリング化よりも優先的に HSP10 結合安定性に寄与しており、HSP10 の結合とそれに伴う HSP60 の構造変化及び ATP 加水分解の制御によって、主にフットボール型複合体を含む安定なダブルリング構造を形成していると考えられる。GroEL の過去の知見より、ATP の加水分解を失速させる変異体 GroEL を用いた実験や、本研究で用いた ATP-AlFx を応用した実験において、GroEL/GroES の相互作用の強化と安定なフットボール型複合体の形成が観察されている [35, 38, 39]。これらの結果はシャペロニンに対するコシャペロンの結合及びそれに伴う複合体形成が ATP の結合及び加水分解によって厳密に制御されていることを示している。

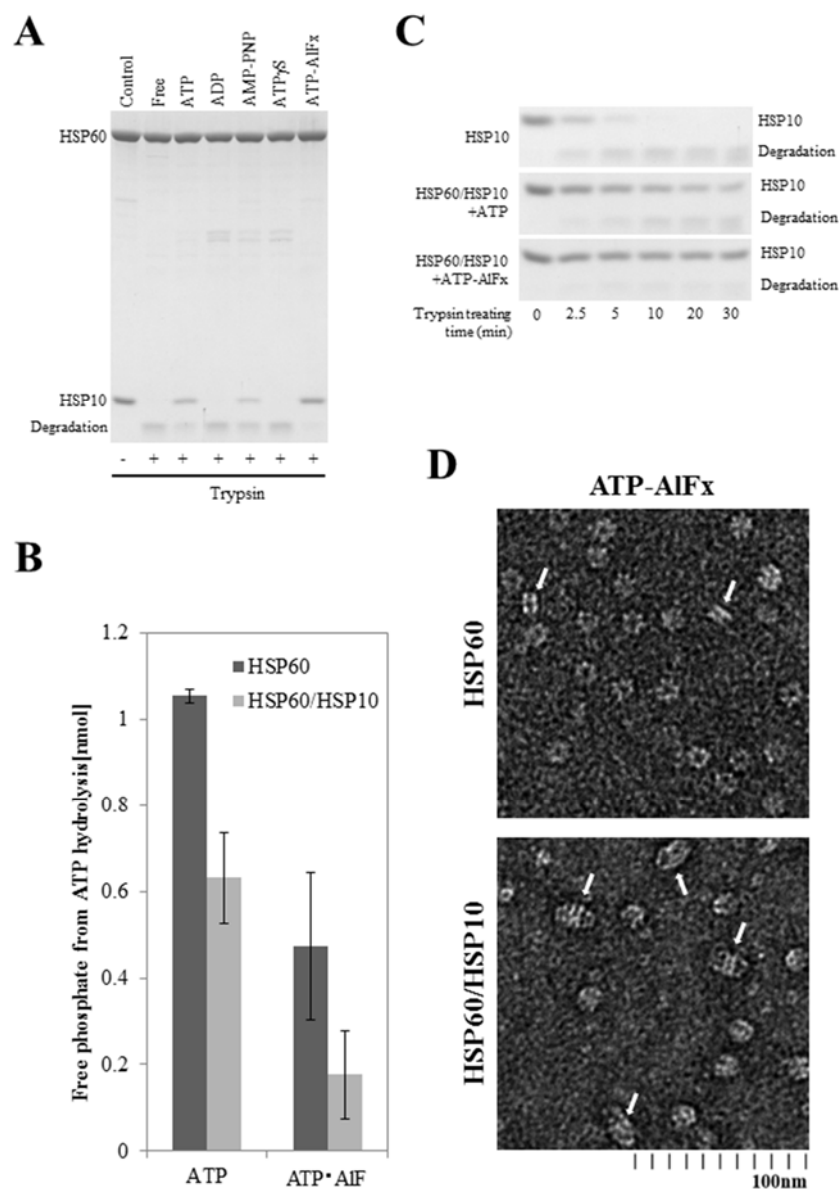


Fig. 9 HSP60 と HSP10 の相互作用は ATP 加水分解によって制御される
 A は各種ヌクレオチド条件におけるトリプシン消化耐性実験の結果を示す。図中の Degradation はトリプシンによって分解された HSP10 のタンパク質バンドである。B は HSP60 による ATP の加水分解活性を測定した。ATP-AlFx は実験中の溶液中に 0.2 mM AlCl₃, 10 mM NaF を添加することによって作成した。C はトリプシンによるタンパク質分解を時間ごとに追跡した結果を示す。D は ATP-AlFx 存在下における HSP60 もしくは HSP60/HSP10 の複合体形成を TEM にて解析した結果を示す。上部白矢印はシングルリング HSP60 を、下部白矢印は HSP60/HSP10 によって形成されるフットボール型複合体を示している。

3-5) HSP60 による化学変性基質タンパク質のリフォールディング

ここまでの結果は ATP 依存的な HSP60 の構造変化及び複合体系性を観察してきた。次に、精製した HSP60 の ATP 及び HSP10 依存的なシャペロン活性であるタンパク質フォールディング能を調査した。

最初に、ミトコンドリアに存在する解毒酵素である単量体タンパク質ローダネーゼを用いた (Fig. 10A)。ローダネーゼは変性状態からは自発的に折りたたまれないタンパク質であり、本研究においても確認することができた (Fig. 10A, open diamond)。この性質のため、多くのシャペロニンのフォールディング研究で、典型的な基質タンパク質として実験に用いられている。HSP60 単独の ATP による構造変化ではローダネーゼをフォールディングすることはできなかった (Fig. 10A, open circle)。HSP10 の添加によって形成される複合体はローダネーゼのリフォールディングを劇的に増加させた (Fig. 10A, closed square、約 80%)。Fig. 9 より、HSP60 と HSP10 の相互作用は ATP 加水分解アナログ AMP-PNP でも観察されていることから、リフォールディング活性を発揮すると考えられる。予想通り、HSP60/HSP10 複合体は AMP-PNP 存在下において、ATP のそれと同等かわずかに低い割合でローダネーゼをリフォールディングした (Fig. 10A, open triangle、約 75%)。AlFx の添加による HSP60/HSP10 の相互作用強化及び複合体の安定化は、ローダネーゼリフォールディングを大きく増加させた (Fig. 10A, closed square、約 95%)。

次に、2 量体を形成することによって酵素活性を発揮するクエン酸合成酵素 (citrate synthase; CS) を用いてリフォールディング実験を行った。25°C 条件下において、CS は約 45% 程度の自発的なリフォールディングを行う。HSP60 及び ATP 存在下において、CS の自発的なリフォールディングは強く抑制された (<5%)。これは変性した CS のポリペプチドを HSP60 が捕獲することで、リフォールディングを抑制していることを示す。HSP10 の添加によって HSP60 の ATP 依存的なフォールディング活性が発揮され、約 80% のフォールディング活性を示した。単量体タンパク質ローダネーゼのリフォールディングに対して AMP-PNP 及び ATP-AlFx は ATP と比較して影響しないか増加させる。しかしながら、CS に対しては、AMP-PNP は自発的なリフォールディングとほぼ同じフォールディング収率を示し (約 40%)、ATP-AlFx においては 16.3% までフォールディング収率を減少させた。

HSP60/HSP10 の ATP 依存的な CS のリフォールディング活性は自発的なリフォールディングの約 2 倍となった。自発的なリフォールディングが約 45% の収率しか示さないのは、おそらく、自発的なリフォールディングの間に生じる変性タンパク質の凝集が原因であると考えられる。HSP60 は変性した CS をアピカルドメインの疎水性に富む基質結合部位で捕獲することで、他の分子から隔離して

接触を減らし、凝集と自発的リフォールディングを抑え、HSP10の結合により効率的にフォールディングを行うと考えられる。CSのような本質的に2量体を形成するタンパク質のフォールディングが、GroEL/GroES複合体を安定化させる変異体を用いた実験で抑制されることが報告されている[39]。これはおそらく、複合体の安定化によって、折りたたまれた単量体タンパク質がフォールディングチャンバーから放出されず、2量体形成を行えないためだと考えられる。これはATP-AlFxによるHSP60/HSP10複合体の安定化(Fig. 9)が、単量体であるローダネーゼのリフォールディングは促進し、2量体を形成するCSのリフォールディングは著しく抑制するという結果と一致しているように思われる。

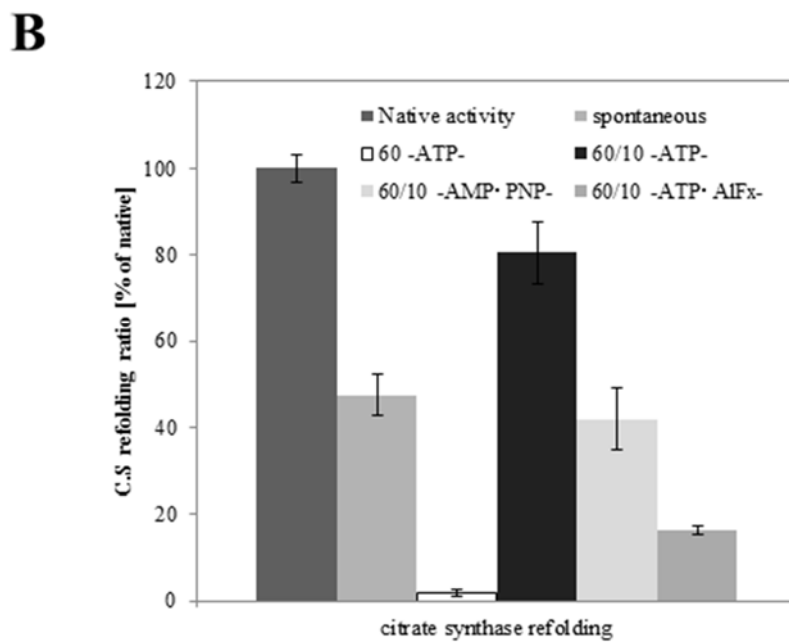
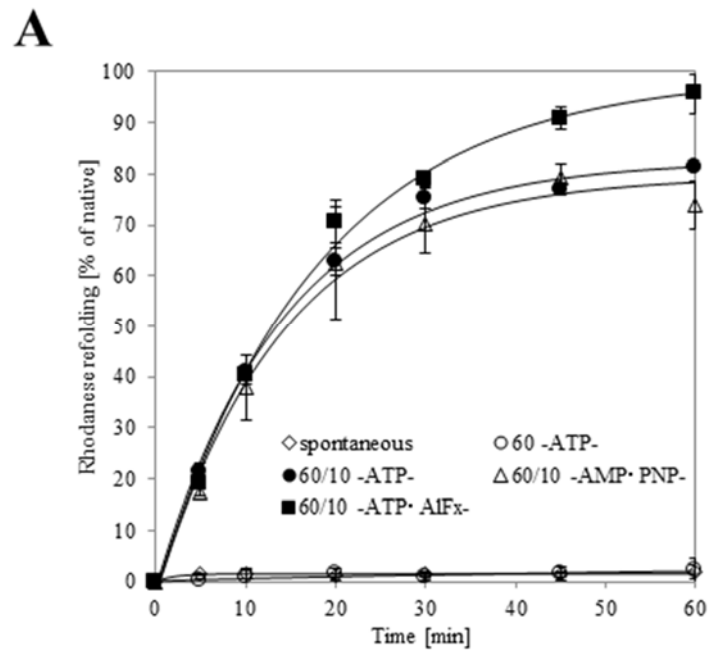


Fig. 10 HSP60/HSP10 依存的な変性タンパク質のリフォールディング実験

A はグアニジンによって化学変性された単量体タンパク質ローダナーゼ (約 33 kDa) の各種ヌクレオチド条件下におけるリフォールディング結果を示している。B は化学変性された 2 量体タンパク質クエン酸合成酵素 (citrate synthase; CS, 単量体分子量は約 45 kDa) の各種ヌクレオチド条件下におけるリフォールディング結果を示している。

3-6) 熱変性タンパク質のリフォールディングとフォールディングチャンバーへの封入

次に、熱変性タンパク質に対する HSP60/HSP10 のフォールディング活性を、単量体ローダネーゼを用いて解析した。熱変性ローダネーゼに対するフォールディングを調べるにあたり、まず、ローダネーゼの熱に対する安定性と変性度合いを確認する実験を、CD スペクトルを用いて確認した。ローダネーゼの熱安定性は 50°C 以上で失われるという報告から、今回の実験では 55°C、5 分のインキュベーションにおけるローダネーゼの構造を解析した。非変性条件 (25°C、5 分) で得られたローダネーゼの CD スペクトル (Fig. 11A、実線) と比較して、熱変性条件 (55°C、5 分) で得られたローダネーゼの CD スペクトル (Fig. 11A、点線) は変性もしくは凝集によって、溶媒の CD スペクトル (Fig. 11A、破線) とほぼ一致しており、ローダネーゼの二次構造が失われていることを示唆する。

55°C、5 分の処理によってローダネーゼの二次構造が失われ、そのことによってローダネーゼの酵素活性は約 8% まで失われた。熱変性ローダネーゼのリフォールディングは、熱変性の途中で生じる凝集を防ぐために HSP60 存在下における溶液中でローダネーゼを熱変性させ、変性種-HSP60 複合体を作成し、ATP 及び HSP10 を添加することでリフォールディングを開始する。HSP60 単独、及びヌクレオチド非存在下における HSP60/HSP10 は熱変性ローダネーゼに対するリフォールディング活性を發揮しない (Fig. 11B、左のグラフ、open diamond and open square)。化学変性ローダネーゼのリフォールディングと一致して、HSP60/HSP10 は ATP の添加によって効率的に熱変性ローダネーゼをリフォールディングした (Fig. 11B、左のグラフ、closed circle、約 90%)。この結果は、HSP60 が熱変性の過程で生じるローダネーゼの凝集を高い割合で抑制しており、また、HSP60 がローダネーゼの熱変性条件 (55°C、5 分) で損傷を受けないことを示している。化学変性ローダネーゼのリフォールディングと一致して、HSP60/HSP10 は AMP-PNP 及び ATP-AlFx 存在下においても熱変性ローダネーゼを効率的にリフォールディングすることができた (Fig. 11B、右のグラフ、open diamond and closed square)。

最後に、精製した野生型 HSP60 の in-cage folding を調べるための実験を行った。この実験のためにトリプシン消化耐性実験を応用した。実験は変性条件下で変性種-HSP60 複合体を形成した後、リフォールディングを開始させ、開始から 1 分もしくは 60 分後のサンプルをトリプシンで短時間処理し、SDS-PAGE を行う。HSP60 上の変性種、もしくはフォールディングチャンバー外のローダネーゼはトリプシンによって分解されるが、チャンバー内で隔離されたローダネーゼは分解されない。この実験を行うにあたり、最初に非変性ローダネーゼのトリプシン消化パターン及び消化パターンに対して HSP60/HSP10 が影響する

かどうかを調べた (Fig. 11C)。ローダネーゼはトリプシンの濃度依存的に分解され、分解産物として未分解ローダネーゼを示すタンパク質バンド (Fig. 11C, intact rhodanese) の下に、新たなタンパク質バンド (Proteolytic fragment) を産生した。タンパク質はアミノ酸配列によって定められた一時配列に従って固有の構造に折りたたまれている。そのため、タンパク質表面に露出しているアミノ酸残基は限られている。ローダネーゼがトリプシンによって完全に分解されなかったのはこれらの理由が考えられ、そのため独特な分解産物を産生したと考えられる。ATP の存在の有無に関係なく HSP60 はこの分解パターンに対し影響を示さなかった。

トリプシンによる非変性ローダネーゼの分解、分解産物の産生を確認できたことから、続いて *in-cage folding* を調べる実験を行った。ATP 非存在下において、ローダネーゼを示すタンパク質バンドは反応時間に関係なく完全に消失した (Fig. 11D, lanes 1 and 2)。非変性ローダネーゼは独特な分解産物を産生したとと比較して、変性させたローダネーゼは完全に消化されている。これは、HSP60 のアピカルドメイン上に捕獲されている変性ローダネーゼが、一本鎖ポリペプチド状態で保たれており、トリプシンによって分解されるアミノ酸残基の露出が増加したからだと考えられる。ATP 添加によるフォールディング反応の開始から 1 分後のサンプルをトリプシンで処理した場合、未分解ローダネーゼを示すタンパク質バンドと、わずかな分解産物を検出した (Fig. 11D, lane 3)。一方反応開始から 60 分後のサンプルをトリプシンによって処理した場合、未分解ローダネーゼのタンパク質バンドはほとんど分解され、かわりに非変性ローダネーゼの分解産物が著しく増加したのを確認できる (Fig. 11D, lane 4, 黒矢印)。この結果は、フォールディング反応開始直後は HSP60/HSP10 によって形成されたフォールディングチャンバー内にローダネーゼが隔離 (封入) され、反応が進むにつれて折りたたまれたローダネーゼが溶媒中に放出されることでトリプシンに分解されていることを示している。この封入・放出サイクルは、効率的な単量体フォールディングと、放出による 2 量体形成を行うという CS リフォールディングの結果と一致しており、HSP60/HSP10 複合体の ATP 依存的な *in-cage folding* の存在を如実に表している。AMP-PNP 及び ATP-AlFx 存在下における実験結果は類似しており、反応経過時間に関係なく、ローダネーゼが分解されていないことを示している (Fig. 11D, lanes 5 to 8)。この結果は、CS のリフォールディングにおいて、折りたたまれた単量体が放出されず、引き続く 2 量体形成が行われず、結果としてリフォールディング収率が減少した結果を支持する。

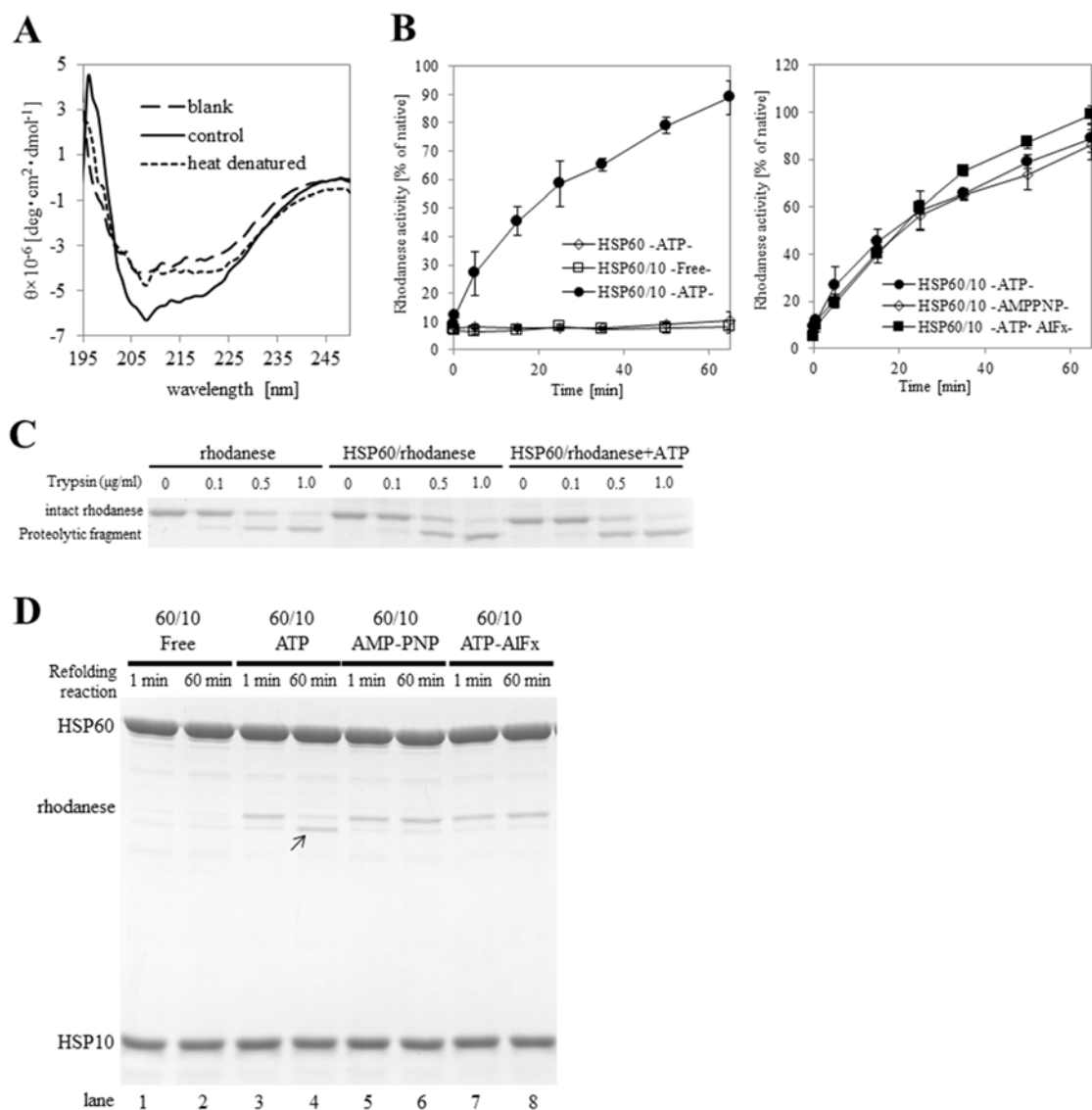


Fig. 11 熱変性ローダナーゼに対する HSP60/HSP10 のフォールディング実験

A は 55°C、5 分間のインキュベーションによってローダナーゼが二次構造を失うかどうかを CD スペクトルで調査した結果を示す。B は熱変性ローダナーゼに対する各種ヌクレオチド条件下におけるリフォールディング実験の結果を示す。C は非変性ローダナーゼに対する各種濃度におけるトリプシン消化のパターン及び、HSP60 が非変性ローダナーゼの分解に影響しないことを調べた結果を示す。D は熱変性ローダナーゼの各種ヌクレオチド条件下における封入化と放出を調べるためのトリプシン消化耐性実験の結果を示す。図中の黒矢印は折りたたまれて放出されたローダナーゼがトリプシンによって分解され、産生されたタンパク質バンドを示す。

4) 考察

シャペロニンの研究において、大腸菌の GroEL 及びコシャペロン GroES や、最近では遺伝子組み換え技術を用いた recombinant HSP60 及び HSP10 の生理機能や構造に関する情報は数多く報告されてきている。これらの多くにはアミノ酸配列に変異を施し、機能を改善もしくは一つの機能に特化させた変異体タンパク質が用いられている。遺伝子組み換えを用いない野生型 HSP60 の研究はほとんど行われておらず、遺伝子組み換え体を用いた実験の信憑性を得るためにも、重要な領域を残しているといえる。

本研究では、ブタ肝臓抽出物から野生型 HSP60 を精製し、生理機能・構造解析を行った。野生型 HSP60 の研究が進まなかった要因のひとつとして、精製が困難であったことが挙げられる。従って本研究の初めに、これまで報告されている野生型 HSP60 の精製法を基に、できるだけ短時間で、尚且つ高純度に精製する方法の確立を目的として実験を行った。今回用いた方法で精製した野生型 HSP60 は機能・構造両方の面でこれまでの HSP60 の知見と遜色なく、安定的に精製できているといえる。また、精製の再現度も高く、精製法が確立できたといえる。

精製した野生型 HSP60 を用いた実験は、これまでの recombinant HSP60 を用いた実験で報告されているように、GroEL/GroES とは異なる多くの情報を提供する。GroEL/GroES のシャペロニンシステムは、GroEL ダブルリングの片方に GroES を結合させ、交互に入れ替えながらタンパク質フォールディングを行う弾丸型サイクルを行う。今回の TEM 解析を含む HSP60/HSP10 の構造解析はこれまでの GroEL/GroES で得られている知見とは異なっていることを示唆する。GroEL/GroES は ATP 存在下では、ダブルリング (GroEL₁₄) もしくは弾丸型複合体 (GroEL₁₄-GroES₇) で存在しているとされる。一方、HSP60/HSP10 は ATP 存在下において、主にフットボール型複合体 (HSP60₁₄-(HSP10₇)₂) を含む、弾丸型複合体 (HSP60₁₄-HSP10₇)、シングルリング複合体 (HSP60₇-HSP10₇)、シングルリング構造 (HSP60₇) という多様な構造種を形成する。HSP60 のシングル-ダブルリング構造間の動的平衡は ATP の存在によってダブルリング側にわずかに傾く (TEM 解析よりダブルリングは全体の約 40%であった)。HSP10 の HSP60 への結合は、HSP60 の ATP 加水分解を制御することによって、複合体構造を安定化させる。結果として、HSP60/HSP10 の複合体種は弾丸型やフットボール型複合体を含むダブルリング構造種が全体の 70%を超えるほど、リング構造間の動的平衡がダブルリング側に大きく傾いていると考えられる。このように、recombinant HSP60 を用いた他の実験結果でも予測されているように、HSP60/HSP10 の ATP 依存的な複合体反応サイクルは GroEL/GroES のそれとは異なる制御を受けていると考えられる。

今回の構造学的解析結果を基に、HSP60/HSP10 の ATP 依存的な反応サイクルを予測した (Fig. 12)。ATP と結合した HSP60 は HSP10 と結合する (Fig. 12, step 1)、もしくは他の ATP 結合 HSP60 と結合しダブルリング構造を形成する (step 2)。TEM 解析において明確なダブルリング HSP60 を示す画像は観察されなかったことから、この構造種は HSP60/HSP10 共存在下において一過性の構造体であると考えられる。そのため、ダブルリング構造を形成した HSP60 は直ちに HSP10 と結合し、フットボール型複合体を形成すると考えられる (step 3)。シングルリング複合体を形成した HSP60 は、ATP の加水分解の後に、ADP、HSP10 を放出し、次にサイクルに入るか (step 1', Cycle (i); Single ring cycle)、他のシングルリング複合体と結合してフットボール型複合体を形成すると考えられる (step 2')。フットボール型複合体は ATP の加水分解の後、ADP 及び HSP10 を放出し、シングルリングに戻ることで次のサイクルに入ると考えられる (step 3', Cycle (ii); Double ring cycle)。解析の中で観察された弾丸型複合体は、Double ring cycle における step 3 もしくは step 3' の中間体であると考えられる。

大腸菌 GroEL/GroES システムの解析は詳細に進んでいる一方で、弾丸型複合体が反応サイクルの主な構造種なのか、それともフットボール型複合体が主な構造種なのかということが議論となっている。低加水分解変異体を含む解析結果を基にした考察では、GroEL/GroES のフットボール型複合体は反応サイクルの GroES 転換時に見られる一過性の構造種であるとされてきた[34]。しかし、最近の研究結果より、ある種の基質タンパク質存在下において、GroEL/GroES は安定なフットボール型複合体を形成することが明らかにされた[40-42]。また、これらの現象はフォールディングに抵抗性のある基質についてのみ生じるという報告もある[43]。いずれの報告にしても、条件によっては主な複合体をフットボール型に転換することができることを示唆している。大腸菌の細胞質に存在するタンパク質の種類は約 2500 種であるという報告に対し[34]、哺乳類細胞の細胞質で典型的に発現しているタンパク質種は 1 万種を超えるといわれている[1]。基質の存在によって複合体形態に変化が現れるという報告を基に考察するならば、哺乳類のタンパク質種は大腸菌のそれよりはるかに多いことから、HSP60/HSP10 システムはこれら多くのタンパク質種に対応するために、GroEL/GroES から進化してきたのかもしれない。このように、GroEL にしても HSP60 にしても、反応サイクルの研究にはいまだ議論の余地があるといえる。

HSP60 に対する最近の研究は、単純なフォールディングマシン以外のとても興味深い知見を提供している。そのひとつに翻訳後修飾がある。哺乳類細胞内のタンパク質制御において翻訳後修飾はとても重要な役割を担っている。

HSP60 も例外ではなく、チロシンのリン酸化によってタンパク質の成熟を促進するという報告や、アセチル化による HSP60 の細胞質集積による細胞死の制御などが報告されている[44, 45]。これらのような翻訳後修飾された HSP60 の分子レベルにおける生理機能や構造解析は手付かずのままになっている。今後は、本研究で得られた精製法や解析技術を応用・発展させることで、翻訳後修飾された HSP60 の生理機能や構造解析につなげ、生体内における HSP60 の役割を分子レベルでさらに詳細に解析し、解明することにつなげて生きたいと考えている。

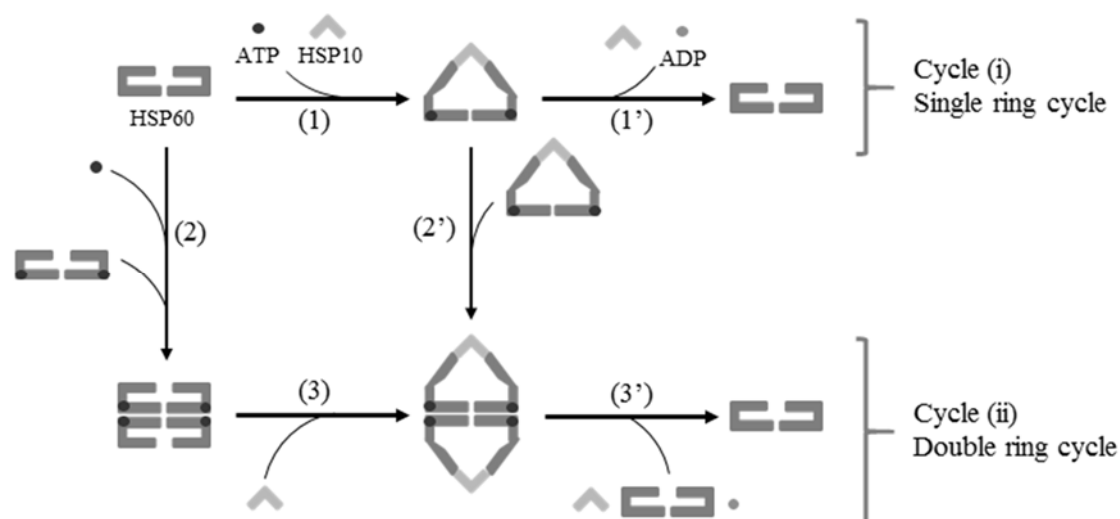


Fig. 12 ATP 依存的な HSP60/HSP10 シャペロンサイクルの予想

電子顕微鏡の結果より、一般的に GroEL/GroES は ATP 存在下で弾丸型複合体のみを形成するといわれているのに対して、HSP60/HSP10 は主にフットボール型複合体を含む多くの複合体形態を形成することが判明した。ATP と結合した HSP60 はシングルリング複合体でサイクルを辿るか(Cycle (i); Single ring cycle)、フットボール複合体を形成してサイクルを辿る (Cycle (ii); Double ring cycle) と考えられる。電子顕微鏡を基にした統計学的解析は、ヌクレオチド存在下における HSP60/HSP10 の複合体種がダブルリング構造種へ集積することが示唆されており、HSP60/HSP10 の ATP 依存的なシャペロンサイクルは主に Double ring cycle を辿ると考えられる。

第3章 HSP60のATP加水分解活性とGTPの影響

1) 緒言 シャペロニンとGTP加水分解活性

第2章では一般的な分子シャペロンのエネルギーとして利用されているATP依存的なHSP60/HSP10の生理機能発現及び構造変化を確認してきた。大腸菌グループI型シャペロニンGroEL/GroESや、細胞質グループII型シャペロニンTRiC/CCTのATP加水分解に対する研究は非常に詳細に行われている[46, 47]。これらの研究は、シャペロニンのATP加水分解が、リング内の正の協同性(intra-ring positive cooperativity)とリング間の負の協同性(inter-ring negative cooperativity)によって、その構造変化と機能発揮を制御していることを明確に示唆している。遺伝子組み換えHSP60-HSP10複合体を用いた過去の研究は、HSP60-HSP10複合体のATPに対する著しいinter-ring negative cooperativityを示さず、そのため、それぞれのリングが独立することで安定なフットボール型複合体を形成することを示唆している[24]。このように、構造変化のみならず、ATPに対する反応性に対しても大腸菌GroELと哺乳類HSP60の間で大きな差異があることを示している。しかしながら、野生型HSP60を用いてそれらの減少を証明する報告はいまだなされていない。

ATPに加えて、生体内のヌクレオチドには他にGTP, CTP, TTP (もしくはUTP)などがあり、DNA (もしくはRNA) 合成などの多くの生理学的役割を担っている。特にGTPをエネルギーに用いるタンパク質については多くの報告があり、シグナル伝達、GTP結合及び加水分解による構造変化と機能発現、チューブリンタンパク質の繊維化など、多くのタンパク質の機能調整に関与しており、細胞内過程の重要な制御因子であることを示している[48-50]。過去の当研究室の研究結果より、ブタ精巣から単離精製した哺乳類のグループII型細胞質シャペロニンが、ATP加水分解能に加えてGTP加水分解能も有しており、ATP同様に構造を変化させることでタンパク質フォールディングなどの機能を発現できるかもしれないことを示した[51]。さらに、同じく哺乳類分子シャペロンであるHSP90がGTP加水分解能を有していることも報告されている[52]。GTPはATPと同様にプリンヌクレオチドに属しており、構造的にも類似している。以上のことから、CCTと同じ哺乳類シャペロニンファミリーに属しているグループI型シャペロニンHSP60にも同様の機能があると仮定した。

本研究では、第2章で精製法の確立したブタ肝臓由来哺乳類野生型分子シャペロンHSP60を用いて、二つのヌクレオチド加水分解の反応速度論的解析を始め、コシャペロンとの相互作用、発揮されるシャペロン活性、複合体形成の差異を、生化学的手法を用いて解明することを目的として実験を行った。加えて、生体内ヌクレオチド濃度(本研究では哺乳類細胞質のヌクレオチド濃度を適用)を用いることによって、HSP60のヌクレオチドに対するアロステリーや構造変化、

機能発現などを解析することによって、より詳細な生体内における **HSP60** の機能や構造変化を予測する。

2) 実験材料及び実験方法

2-1) タンパク質の準備

本研究で用いたローダネーゼ、クエン酸合成酵素、哺乳類野生型分子シャペロン HSP60 及び HSP10 は第 2 章の 2) 実験材料及び実験方法に記載したとおりの方法で準備した。

GFP タンパク質は遺伝子組み換え技術を用いた大腸菌発現系を用いて精製した。GFP 発現ベクターは pET21 ベクターに組み込まれたプラスミドを元島 史尋先生（富山県立大学）から頂き、使用した。発現用の大腸菌には BL21(DE3) を用いている。発現及び精製は参考文献[53]の実験方法を基に、以下に示すように行った。

1. 少量のグリセロールストックを、抗生物質アンピシリン（終濃度 50 µg/ml）を添加した LB 培地で 37°C、250 rpm で一晩培養する
2. 培養した大腸菌を、100 倍量の新しく用意した LB 培地（50 µg/ml アンピシリンを含む）に添加し、分光光度計を用いて 600 nm における吸光度が 0.6~1.0 になるまで 250 rpm、37°C で培養する
3. 吸光度が 0.6~1.0 に達した後、20°C で 30 分間培養する。その後、終濃度 0.1 mM となるように IPTG を添加し、250 rpm、20°C で 24 時間培養する。
4. 培養後、遠心分離機 BECKMAN J2-HS centrifuge を用いて遠心分離（13,000 rpm、4°C、15 min）によって大腸菌を回収し、purification buffer（20 mM Tris-HCl pH7.4, 1 mM EDTA, 1 mM DTT）で再懸濁し、-80°C で保存する
5. 回収した大腸菌を、TOMY ULTRASONIC DISRUPTOR UD-200 を用いて超音波破碎する
6. 超音波破碎後、遠心分離機 BECKMAN COULTER Allegra™ 64R centrifuge を用いて遠心分離（15,000 rpm、4°C、15 min）を行う
7. 遠心分離後、上清を回収し、purification buffer で平衡化した DEAE Sepharose column（Bed Volume 10 ml）に添加する
8. 50 ml の purification buffer で樹脂を洗浄する
9. 0~0.5 M NaCl, purification buffer で、合計 50 ml になるように勾配溶出を行う。1 ml/tube となるように分種したフラクションを 11% SDS-PAGE, CBB 染色にて確認後、GFP 含有フラクションを回収する
10. GFP 含有フラクションを回収し、25%硫酸アンモニウムを加える。
11. 25%硫酸 in purification buffer で平衡化した Butyl column に添加する
12. 同 buffer で洗浄した後、25~0%の硫酸で勾配溶出する
13. 11%SDS-PAGE, CBB 染色にて含有フラクションを確認する
14. 限外ろ過（10 k cut）で濃縮及び buffer 置換し、-80°C で保存する

2-2) 変性タンパク質のリフォールディング実験

化学変性ローダネーゼ、クエン酸合成酵素及び熱変性ローダネーゼの実験は第2章の2) 実験材料及び実験方法に記載したとおりの方法で準備した。

GFP は酸性条件下で変性させ、リフォールディング実験に用いた。実験方法は以下のとおりである。

1. GFP (10 μM) を変性 buffer (0.1 M HCl, 50 mM HEPES-KOH pH7.4) で変性させる
2. 変性溶液を 0.2 μM HSP60 の存在もしくは非存在下における assay buffer (50 mM HEPES-KOH pH7.4, 10 mM MgCl_2 , 20 mM KCl, 1 mM DTT, 0.01 mg/ml BSA) に 200 倍で希釈する。
3. HSP10 (0.4 μM) 及びヌクレオチド (1 mM) を添加し、反応を開始する
4. TECAN infinite 200 を用いて GFP の蛍光強度 (励起波長: 485 nm、発光波長: 535 nm) を 5 分間観察する

2-3) NTP 加水分解解析

実験方法は第2章の実験方法 2-7) ATP 加水分解測定 の原理と方法に従って行った。0 から 1.0 mM の濃度条件における HSP60 (0.1 μM) もしくは HSP60/HSP10 (0.1 μM /0.1 μM) の ATP 加水分解曲線は、KaleidaGraph software (HULINKS) を用いて、過去の TRiC/CCT で用いられてヒル式を応用した経験式 (1)

$$V_0 = (V_{\max(1)} + V_{\max(2)}([S]/K_2)^m) / (1 + (K_1/[S])^n + ([S]/K_2)^m) \quad (1)$$

を用いて curve fitting を行い、速度論パラメーターを算出した。

同濃度条件下における GTP 加水分解活性の速度定数はヒル式 (2)

$$V_0 = V_{\max(1)}K_1[S]^n / (1 + K_1[S]^n) \quad (2)$$

に、直接的に curve fitting させ、速度論パラメーターを算出した。また、0 から 0.02 mM 濃度条件下における ATP 加水分解曲線も式 (2) で fitting されている。

V_0 は反応速度を示す。 V_{\max} は最大反応速度、 K は速度定数、 $[S]$ は基質 (ここでは ATP もしくは GTP) 濃度、 n および m はヒル係数を示している。この研究で行ったすべての curve fitting において、正確性を示す R^2 値は 0.99 以上となるように curve fitting を行った。

2-4) SEC-MALS を用いた分子量解析

多角度光散乱測定 (multi angle light scattering) は静的光散乱測定法にサイズ排除クロマトグラフィーを組み合わせた実験である。静的光散乱法は生体高分子 (タンパク質など) の分子量やサイズを比較的マイルドな非破壊的条件下

で測定することができる。静的光散乱法の理論式は式 (3) として表される [54]。

$$\frac{K^*c}{R(\theta)} = \frac{1}{M} \left(1 + \frac{16\pi^2 n_0^2}{3M\lambda_0^2} (r_g^2) \sin^2 \left(\frac{\theta}{2} \right) + \dots \right) + 2A_2c \quad (3)$$

K^* : 光学定数 = $4\pi^2(\text{dn/dc})^2 n_0^2 / N_a \lambda_0^4$

n_0 : 溶媒の屈折率、 N_a : アボガドロ数

λ_0 : 真空中の入射光の波長

$R(\theta)$: 過剰還元散乱高度

c : 試料濃度

M : 重量平均分子量

A_2 : 第二ビリアル係数

r_g : RMS 半径

なお、タンパク質などの生体高分子の測定において使用する試料の濃度は希薄 (1 mg/ml 以下) であるため、 $2A_2c$ 項は無視できるものとする。この実験の大きな特徴は、分子量既知のサンプルを用いない絶対分子量測定ができることにある。

光散乱測定は非常に感度が強く、溶媒中の不純物に影響を受けやすい。そこでサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) を用いた。サイズ排除クロマトグラフィーを用いることによって、試料を単一分子に分画するだけでなく、微粒子などを除去するフィルターとしても用いることができ、測定分子の正確な光散乱測定を行うことができる。SEC カラム (SEC Protein Column for MALS, Wyatt technology) を通過した分子は UV 検出器 (日本分光)、光散乱測定装置 (DAWN HELEOS II 8+ MALS detector, Wyatt technology)、示差屈折率系 (Optilab trEX reflective index/concentration detector, Wyatt technology) の順にそれぞれの検出器を通過し、得られた値をソフトウェア内 (Wyatt Astra Software, Wyatt technology) で式 (3) を基に分子量を算出した。実験方法を以下に示す。

1. column buffer (10 mM Tris-HCl pH7.4, 10 mM MgCl₂, 20 mM KCl) を用いて低流速 (0.1 ml/min) で一晩平衡化する
2. HSP60 (1.23 mM) もしくは HSP60/HSP10 (1.23 mM/2.46 mM) を 1 mM スクレオチド存在もしくは非存在下の column buffer で 25°C、5 分間インキュベーションする。なお、示差屈折率のノイズを極力を減らすため、この実験においてのみタンパク質の回収 buffer は column buffer を用いている
3. インキュベーション後、カラムに添加し、25°C、流速 1 ml/min の条件で試料を分離する
4. 前述した方法でタンパク質の分子量を測定する

2-5) TEM による分子観察

第 2 章の実験方法 2-5) の方法に従って実験を行った。

2-6) トリプシン消化耐性実験

HSP60/HSP10 の相互作用確認のために行った実験に関しては、第 2 章の実験方法 2-8) を基に実験を行った。

基質タンパク質と封入化の確認実験は、第 2 章の実験方法 2-10-3) を基に実験を行った。

2-7) NTP プルダウン実験

ヌクレオチドとタンパク質間の直接的相互作用を解析するために ATP-agarose もしくは GTP-agarose (共に Sigma-Aldrich より購入) を用いた実験が行われた。本実験では、実験中のタンパク質-ヌクレオチド間の結合を安定化させるために 0.2 mM AlCl_3 および 10 mM NaF 存在下で行われた。

1. それぞれの樹脂を 100 μl 分取し、樹脂の 3 倍量の assay buffer (50 mM HEPES-KOH pH7.4, 10 mM MgCl_2 , 20 mM KCl, 0.01% NP-40, 0.2 mM AlCl_3 , 10 mM NaF) で平衡化を行う
2. HSP60 (0.5 μM) もしくは HSP10 (1.0 μM) を assay buffer 中で樹脂と共に 4°C、60 分間インキュベートさせ、樹脂へタンパク質を結合させる
3. インキュベートの後に、樹脂の 3 倍量の assay buffer で樹脂を 5 回洗浄する
4. 洗浄後、3 倍量の SDS-Sample buffer を添加し 100°C、5 分間インキュベートすることで樹脂に結合したタンパク質をサンプリングする
5. それぞれの樹脂を、それぞれのヌクレオチドで溶出する場合、1 mM ATP もしくは 1 mM GTP 存在下における 3 倍量の assay buffer で 4°C、30 分間インキュベートし、樹脂に結合したタンパク質を溶出させる
6. 溶出後、残った樹脂に対して SDS-Sample buffer を添加し、樹脂に残ったタンパク質をサンプリングする
7. 12% SDS-PAGE にてサンプリングしたタンパク質を分離し、CBB 染色にてタンパク質を検出する

3) 実験結果

3-1) HSP60 は GTP 加水分解能を有し、シャペロン活性を発揮する

研究の初めに、HSP60 および HSP60/HSP10 の ATP 濃度依存的な加水分解曲線に対する *curve fitting* および速度論パラメーターを解析した。第 2 章でも報告したように、精製した HSP60 は ATP 加水分解能を有しており (Fig. 13A, open circle)、その活性は HSP10 の結合によって抑制される (Fig. 13A, closed circle)。過去の CCT を用いた ATP 加水分解パラメーターの *fitting* 解析は、CCT が ATP 加水分解に対して 2 段階の遷移を持っていることを明らかにした。1 段階目のアロステリック遷移は *intra-ring* アロステリック遷移であり、2 段階目は *inter-ring* アロステリック遷移を示唆しており、この *fitting* に対応するための式 (1) が用いられている[47]。HSP60 および HSP60/HSP10 の ATP 加水分解曲線は見かけ上 2 段階反応であることを示しており、式 (1) に *fitting* させたところ、どちらの加水分解曲線も式 (1) とよく *fitting* しており、HSP10 の存在に関わらず、HSP60 の ATP 加水分解が 2 段階のアロステリック遷移を持っていることを示唆している。HSP60 の加水分解曲線における速度論パラメーターは、 K_1 、 K_2 、 n 、 m の順に $14 (\pm 1) \mu\text{M}$ 、 $0.42 (\pm 0.08) \text{mM}$ 、 $1.76 (\pm 0.18)$ 、 $5.52 (\pm 4.34)$ で算出され、HSP10 存在下の場合には $4.6 (\pm 0.2) \mu\text{M}$ 、 $0.34 (\pm 0.04) \text{mM}$ 、 $2.23 (\pm 0.28)$ 、 $8.22 (\pm 7.76)$ であった。過去の GroEL の研究は、GroES が GroEL の ATP 要求性を高め、活性状態を安定化させ、ATP に対する *positive cooperativity* を増加させることを報告している[55]。HSP60 および HSP60/HSP10 の結果は、これらの GroEL を用いた研究結果と一致して、どちらのアロステリック遷移においてもコシャペロン存在下においてヒル係数が増加しており、ATP に対する *positive cooperativity* が増加していることを示している。第 2 章の研究結果より、*apo* 状態の HSP60 は安定なシングルリングで存在していることを証明しており、今回の濃度範囲 (0 から 1.0 mM) で観察された 2 段階遷移はダブルリング化によって生じていると考えられる。

次に、HSP60 が GTP 加水分解能を有しているかどうかを調べた。今回の測定において、HSP60 が GTP 加水分解能を有していることが初めて示された (Fig. 13B, open square)。ATP 加水分解能と比較して、GTP 加水分解の最大速度 V_{max} が低くなっていることがわかる。また、興味深いことに、HSP60 の GTP 加水分解は HSP10 存在下において抑制されず、わずかに増加していることがわかる (closed square)。HSP60 および HSP60/HSP10 の ATP 加水分解曲線は式 (1) によく *fitting* した一方、GTP 加水分解で得られた曲線は ATP 加水分解曲線のような 2 段階反応を示さず、単純なヒル式 (式 (2)) に対して一致した。HSP60 および HSP60/HSP10 で得られた GTP 加水分解の GTP 濃度依存的曲線は典型的なシグモイド曲線を示しており、*curve fitting* によって得られたヒル係数は

それぞれ 2.58 (± 0.22) および 1.99 (± 0.33) であることから、HSP60 は GTP 加水分解に対して強い正の協同性を持っていることがわかった。加えて、**curve fitting** より算出された速度定数はそれぞれ 0.28 mM、及び 0.34 mM であり、ATP のそれと比較して高い値を示している。一般的に K_m 値が低いほうが分子に対する親和性が高いといわれていることから、これらの結果は、HSP60 は ATP に対して高い選択性を持っているが、GTP と結合し、加水分解することを示唆している。Fig. 13C で示されているように、**positive cooperativity** を示すシグモイド曲線は ATP 加水分解では低濃度帯 (0 から 0.02 mM) で観察されていることも、HSP60 の ATP に対する親和性の高さを予想させると考えられる。

次に、得られた加水分解の結果が ATP のコンタミネーション、もしくは GTP 加水分解タンパク質のコンタミネーションではなく、HSP60 が直接的に加水分解している証拠を入手することを調べる実験を行った。本研究において、これらの事を調べるために、ATP-もしくは GTP-agarose を用いたプルダウン実験によって HSP60 と GTP が直接的に相互作用するかどうかを調べた。この実験において、ヌクレオチドとタンパク質間の実験中の結合を安定させるために、アルミニウムフロライド作成条件 (実験中の溶液に 0.2 mM AlCl_3 および 10 mM NaF を添加する) で実験を行っている (アルミニウムフロライドの影響については第 3 章の Fig. 16 を参照)。Fig. 13D の上部二つの SDS-PAGE の結果は結合反応後の樹脂を SDS-Sample buffer で直接溶出した実験の結果を示す。HSP10 はヌクレオチドと結合しなく、この実験条件でタンパク質が凝集していないことを示すためのコントロール実験を行うために用いられている。左が ATP-agarose を、右が GTP-agarose を用いた実験結果であり、どちらの実験においても HSP10 のタンパク質バンドが検出されておらず、この実験条件でタンパク質は凝集していないことを示す。一方、HSP60 はどちらのヌクレオチド条件でも結合が見られていることから、二つのヌクレオチドアガロースのどちらにも特異的に結合できていることを示す。これらの結合が機能的であり、凝集していないことをさらに調べるために、結合させた後のアガロース樹脂をそれぞれのヌクレオチドで溶出する実験を行った。Fig. 13D 下部の SDS-PAGE がその結果を示しており、左が ATP-agarose を、右が GTP-agarose を用いた結果を示す。どちらのヌクレオチド実験においても HSP10 の結合・溶出は検出されなかった。GTP 存在下と比較して、ATP 存在下における実験は強く溶出されていることを示す。加水分解実験の結果は ATP 加水分解の代謝回転が GTP 加水分解のそれより速いことを示しており、溶出割合の差はこれらの代謝回転の差と一致しているように思われる。これら結果をまとめると、HSP60 は生体内において、ATP と同様に GTP と直接的に結合し、加水分解できることを示している。

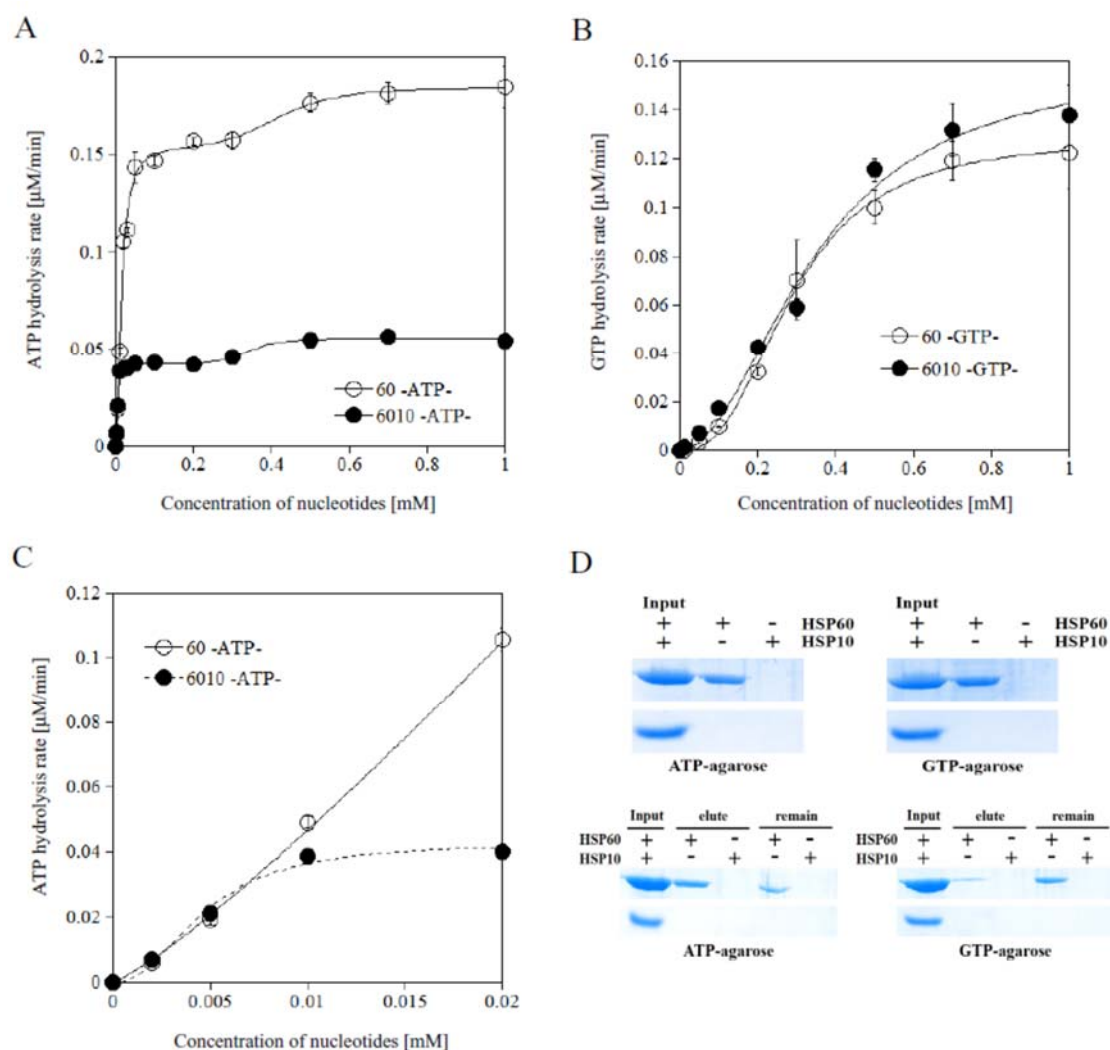


Fig. 13 HSP60 による ATP 加水分解及び GTP 加水分解

A は HSP60 及び HSP60/HSP10 の異なる ATP 濃度における加水分解速度を測定した結果を示す。fitting curve は KaleidaGraph software (HULINKS) を用いて作成し、式 (1) を用いて速度論パラメーターを算出した。B は異なる GTP 濃度条件下における加水分解活性の測定結果であり、式 (2) に fitting させることによってグラフを作成し、速度論パラメーターを算出した。C は低濃度下における ATP 加水分解曲線を示す。グラフは式 (2) に fitting させることによって作成した。D は ATP-agarose および GTP-agarose を用いたプルダウン実験の SDS-PAGE の結果を示す。上部二つの結果はそれぞれのカラムを SDS-Sample buffer で直接溶出した結果を示し、下部二つの結果はそれぞれの樹脂を 1 mM ATP もしくは GTP で 30 分間溶出した結果を示す。本実験において、ヌクレオチド-タンパク質間相互作用を安定化させるために 0.2 mM AlCl_3 および 10 mM NaF 存在下で実験を行っている。

3-2) 二つのヌクレオチドによって誘導されるタンパク質間相互作用の差異

HSP60 の GTP 加水分解能が HSP10 のよって抑制されなかったことから、ATP もしくは GTP 結合によって誘導される HSP10 の結合に差異があると予想される。この予想を調べるために、トリプシン消化耐性実験を用いてそれぞれのヌクレオチド存在下における HSP10 の相互作用を確認した (Fig. 14A)。ATP 存在下における HSP10 のトリプシンによる分解は ATP 濃度 0.05 mM 以上から明確に確認できた一方で、GTP 存在下においては GTP 濃度 0.5 mM 以上でわずかに確認できるのみであった。この結果は、HSP60 と HSP10 の相互作用は GTP 加水分解によって誘導されるが、その親和性は ATP 加水分解で誘発されるそれと比較してかなり低いことを示唆している。

明確な結合の証拠を得るために、次に基質タンパク質のリフォールディング実験を行った (Fig. 14B)。基質として用いられている GFP のリフォールディングはほとんど自発的に行われる (Fig. 14B, closed diamond)。この自発的リフォールディングは HSP60 のアピカルドメイン上に捕獲されることで強く抑制される (Fig. 14B, open triangle)。ATP 存在下においても GTP 存在下においても、GFP のリフォールディングは観察されていないことから (Fig. 14B, open triangle and open circle)、HSP60 単独ではヌクレオチドの種類に関係なく GFP を放出できていないことを示す。HSP10 の添加によって、ATP, GTP どちらのヌクレオチドも効率的な GFP のリフォールディングを観察することができた (Fig. 14B, closed triangle and closed circle)。これらの結果は GTP が ATP と同様に HSP60/HSP10 相互作用を誘導しており、HSP10 が HSP60 のアピカルドメインに接触することで GFP を放出させ、リフォールディングを促進させていることを示す。HSP60 の GTP 加水分解能が HSP10 の結合によって抑制されなかったのは、ATP 加水分解で誘導される HSP10 の結合と比較して、誘導される結合力が弱いのか、結合時間が短いためかもしれない。

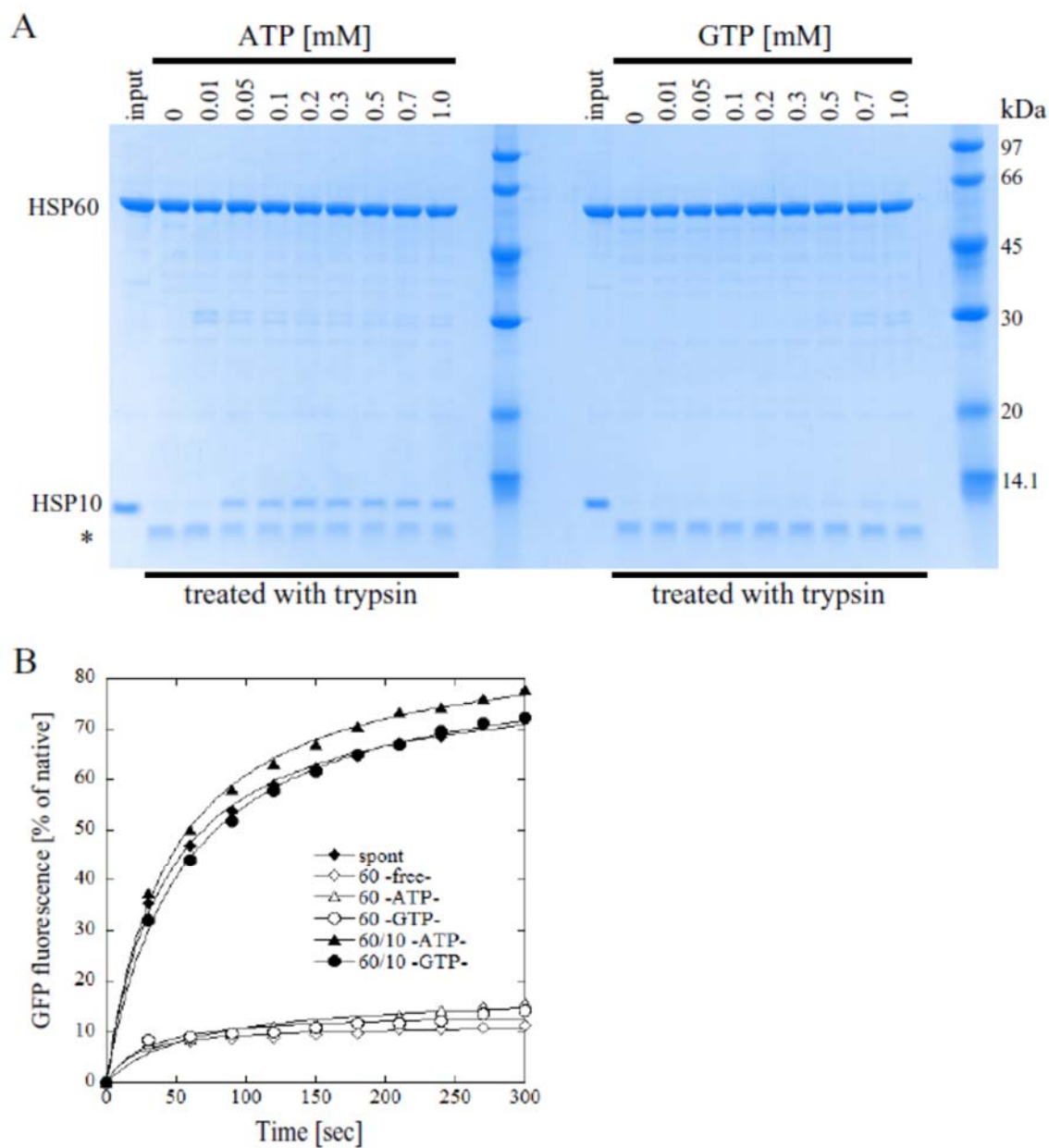


Fig. 14 GTP 加水分解によって発揮される生理機能の差異

A はそれぞれのヌクレオチドの濃度依存的な HSP60/HSP10 の相互作用をトリプシン消化耐性実験及び SDS-PAGE で解析した結果である。*はトリプシンによって生産された HSP10 の分解産物を示す。B は各種ヌクレオチド条件における酸変性 GFP のリフォールディングを蛍光強度測定で解析した結果を示している。

3-3) GTP 加水分解による HSP60/HSP10 の複合体形成

HSP60 が GTP 加水分解能を有し、HSP10 との相互作用を発揮することが確認された。次に、GTP によって誘導される HSP60/HSP10 の複合体形成を TEM による分子観察によって解析した (Fig. 15A)。HSP60 および HSP60/HSP10 の ATP 依存的な複合体形成は第 2 章で特徴付けたのと同様の結果を示した。また、統計学的解析においても同様の結果を示す。HSP60 のヌクレオチド依存的なダブルリング構造の形成は、GTP 存在下でも確認することができた。また、HSP60/HSP10 は GTP 存在下でシングルリング複合体やフットボール型複合体を形成することも確認できた。しかしながら、分子観察を基にした統計学解析は大きく異なっていることを示す。HSP60/HSP10 は ATP 存在下において主にフットボール型を含むダブルリング構造種に集積する (全体の約 70%) のに対し、GTP 存在下において主に形成される複合体はシングルリング複合体であり、フットボール型を含むダブルリング構造種は全体の約 20%ほどであるのに対し、主にシングルリング複合体を含むシングルリング構造種への集積は約 80%にも及ぶ。HSP10 非存在下における HSP60 の ATP 依存的なダブルリング化は約 30~40%であったのに対し、GTP 依存的なダブルリング化は HSP10 存在下の時と変わらず約 20%程であった。

ヌクレオチド依存的な複合体形成をさらに調べるために、SEC-MALS 解析を行った。最近の研究により、この実験によって HSP60/HSP10 複合体や、HSP60 多量体構造の安定性を調べられるということが報告されている [24]。従って本研究においても、SEC-MALS 法を用いて、ヌクレオチド存在下及び非存在下における HSP60 もしくは HSP60/HSP10 で得られた絶対分子量を基に、複合体形成の安定性を調べた (Fig. 15B and C)。Fig. 14B は HSP10 非存在下における HSP60 の各種ヌクレオチド条件下における分子量を示している。ヌクレオチド非存在下において HSP60 を示す単一のピークが検出され、算出された分子量は 412.6 kDa であり、安定な 7 量体を形成していることを示している (Fig. 15B, black solid and broken line)。ATP 存在下において、多量体ピークに加え、もうひとつ小さなピークを検出した。過去の研究より、HSP60 が ATP 存在下において単量体化するという報告があり [20]、今回新たに検出されたピークもおそらく単量体の HSP60 を示していると思われる。算出された多量体 HSP60 の分子量はわずかに上昇し、500.8 kDa であった (Fig. 15B, red solid and broken line)。この分子量の増加は、主にシングルリング構造で形成される単一の多量体ピークの中にわずかにダブルリング構造を形成した HSP60 が現れたためだと考えられる。GTP 存在下においても、ATP 存在下の時と比較してわずかに大きい単量体ピークが現れた。多量体ピークの分子量は 442.5 kDa で算出された (Fig. 15B, blue solid and broken line)。GTP 存在下においても分子量の増加

が確認され、ダブルリングが形成されたと考えられる。しかし、ATP 存在下の場合の分子量増加と比較すると小さく、この結果は、GTP によって誘導される HSP60 のダブルリング構造的割合が、ATP のそれと比較して少ないという結果を示す TEM 画像解析と一致している。

Fig. 15C は HSP10 存在下における各種ヌクレオチド条件下で測定された HSP60 の SEC-MALS 実験の結果を示している。ヌクレオチド非存在下において、クロマトグラムは多量体 HSP60 を示すピークに加えて、わずかな単量体を示すショルダーピークとそれに引き続く HSP10 を示す大きな単一ピークを検出した。多量体 HSP60 の分子量は 395.7 kDa で算出され、7 量体で存在していることを示す (Fig. 15C, black solid and broken line)。ATP 存在下において多量体 HSP60 を示すピークの分子量は 668.1 kDa で算出されたのに対し (Fig. 15C, red solid and broken line)、GTP 存在下では 514.2 kDa であった (Fig. 15C, blue solid and broken line)。これらの結果は、ATP 存在下において HSP60/HSP10 が主にダブルリング構造種に集積するのに対し、GTP 存在下では集積しないという TEM 解析の結果と一致している。さらに、HSP10 を示すピークは ATP 存在下において大きく減少しているのに対し、GTP 存在下ではほとんど変化していない。この現象は HSP60 に HSP10 が結合したために生じていると考えられる。これらの結果は、ATP によって誘導される HSP60/HSP10 間の相互作用が、GTP 存在下で誘導される相互作用より強いことを示唆しているトリプシン消化耐性実験の結果とも一致しているように思われる。

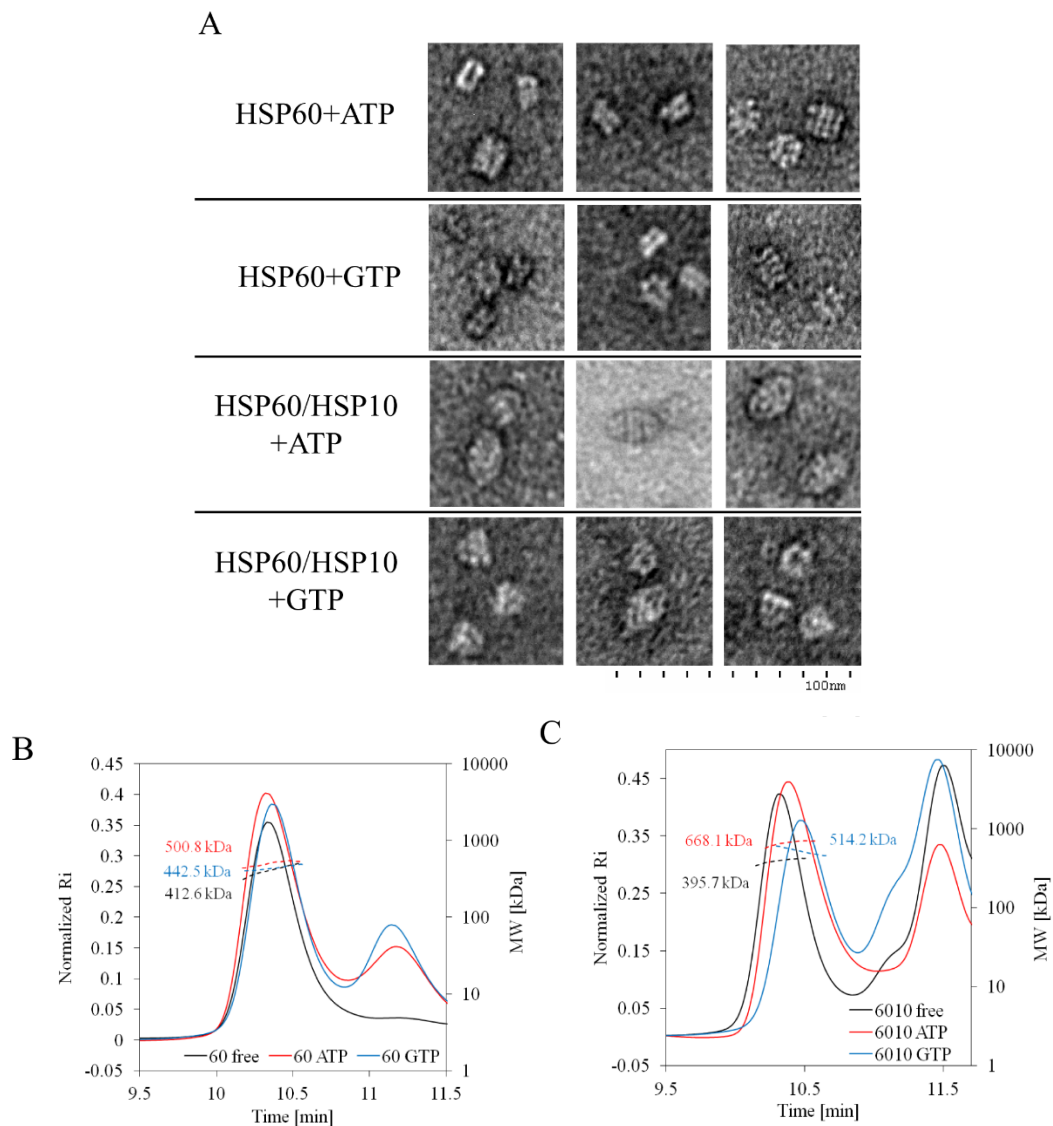


Fig. 15 各ヌクレオチドによる HSP60 及び HSP60/HSP10 の複合体形成

A は各ヌクレオチド条件下における HSP60 及び HSP60/HSP10 の複合体系性を TEM によって解析し、side view のみを抜粋した結果を示す。これらを含む TEM 画像の解析により、構造種の統計学的解析を行った。B 及び C は HSP60 及び HSP60/HSP10 の各ヌクレオチド存在下における SEC-MALS 実験の結果を示している。それぞれの条件において実線で示されるクロマトグラムは示唆屈折率で追跡されており、図中の点線は各ピークにおいて算出された分子量分布を、数字はそれぞれの色に対応する分子量を表している。

3-4) 加水分解制御による複合体への影響

第2章の研究結果より、ATP加水分解の失速（AlFxによる制御）によってHSP10の結合が強化され、複合体が安定化される可能性を示した。HSP60のGTP加水分解はHSP10の結合によって制御されていないことから、相互作用及び複合体の不安定性が生じていると考えられる。そこで、AlFxを添加することでGTP依存的な複合体形成が安定化するかどうかを調査した。なお、GTPの加水分解とそれに伴って形成されるGTP-AlFx（もしくはGDP-AlFx）は、他のGTP加水分解タンパク質を用いた実験にも適用されている[47]。Fig. 16Aは加水分解測定の結果を示しており、ATP同様、GTP加水分解もAlFxによって抑制されることを示す（blue bar and green bar）。また、GTP加水分解の抑制はHSP60とHSP10の結合を強く促進する（Fig. 16B）。その結果、HSP60/HSP10複合体が安定化され、TEMで観察されるフットボール型複合体の分子数は大きく増加し、ダブルリング構造種への集積は約20%から約50%へ大きく増加した（Fig. 16C, bottom three panels）。これらの結果は、ヌクレオチド加水分解の制御が複合体安定性に重要な役割を持っていることを強く示唆する。

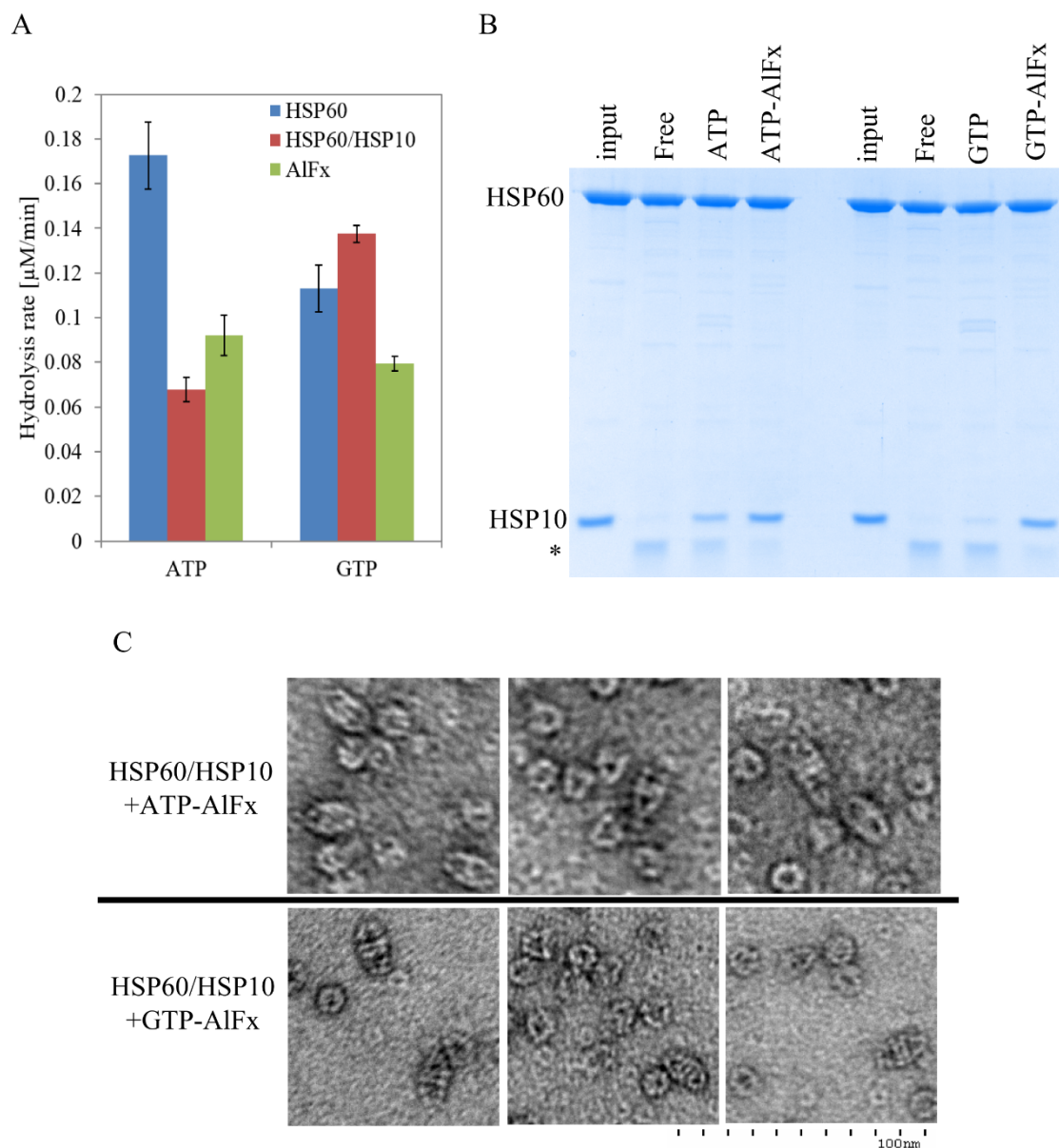


Fig. 16 GTP 加水分解の失速が HSP60/HSP10 複合体形成に与える影響

A はそれぞれの条件における各ヌクレオチドの加水分解速度を測定した結果を示している。B は GTP 加水分解の制御によって HSP60 と HSP10 の結合力が增加することを、トリプシン消化耐性実験及び SDS-PAGE にて解析した結果を示す。*は分解された HSP10 のタンパク質バンドを示す。C は HSP60/HSP10 の各ヌクレオチド加水分解の失速条件における複合体形態を TEM によって解析した結果を示している。これらの TEM 画像を基に統計学的解析を行った。

3-5) GTP 加水分解によって発揮される HSP60 のシャペロン活性

次に、ヌクレオチド依存的に発揮される HSP60/HSP10 のシャペロン活性であるタンパク質フォールディング測定を行った。Fig. 17A は非自発的リフォールディング基質であるローダネーゼのリフォールディング実験の結果を示す。HSP60 の ATP 依存的なリフォールディング活性は、第 2 章でも述べたように HSP10 の結合によって発揮され、約 70%まで酵素活性を回復させた (Fig. 17A, closed blue circle and closed red square)。同様に GTP 依存的な HSP60 のリフォールディング活性は HSP10 存在下においてのみ観察されたが、その活性は ATP と比較して低く、酵素活性の回復は約 40%までであった (Fig. 17A, open cyan circle and closed green triangle)。AlFx による複合体の安定化は、GTP によって発揮されるリフォールディング活性を大きく改善した (Fig. 17A, yellow closed triangle)。

一方、ある程度自発的にリフォールディングできる基質である CS を用いた実験では、ATP, GTP どちらのヌクレオチドにおいても効率的に CS をリフォールディングできていることを示す。また、AlFx によるリフォールディング活性の低下も観察された (Fig. 17B)。CS のリフォールディングに対し、ローダネーゼのリフォールディングには明確な *in-cage folding* が要求されると考えられている。これらの結果は、GTP のみでは HSP60/HSP10 の安定な結合を誘導できず、効率的な *in-cage folding* を行えないが、AlFx による強制的な制御によって GTP 存在下においても強固なフォールディングチャンバーを形成したことを示唆している。

フォールディングチャンバーの形成を調査するために、第 2 章で紹介した熱変性基質を用いたトリプシン消化耐性実験を応用した。熱変性ローダネーゼに対する各種ヌクレオチド存在下におけるリフォールディング活性は Fig. 17C に示しており、化学変性ローダネーゼに対するリフォールディング活性 (Fig. 17A) とほぼ同じような結果になったことを示している。ATP 存在下において、反応開始直後のフォールディングチャンバー内への明確なローダネーゼ封入化 (Fig. 17D, top panel, 1 min of ATP) と、反応終了後の折りたたまれたローダネーゼの溶媒中への放出が確認された (Fig. 17D, top panel, 60 min of ATP, *は折りたたまれたローダネーゼ由来の分解産物を示す)。一方、GTP 存在下では反応開始直後の明確な封入化は観察されず (Fig. 17D, bottom panel, 1 min of GTP)、反応終了後わずかに折りたたまれたローダネーゼ由来の分解産物を示すのみという結果になった (Fig. 17D, bottom panel, 60 min of GTP)。これらの結果は効率的な *in-cage folding* が行えず、結果としてリフォールディング活性の減少につながっている Fig. 17A や Fig. 17C の結果と一致している。AlFx の処理によって、ATP-AlFx と同様に、GTP-AlFx においても明確な封入化と折りたたまれ

た基質の非放出が観察された。この結果もまた、ローダネーゼの *in-cage folding* の改善及び CS リフォールディングの 2 量体形成阻害によるリフォールディング活性の低下を示している実験結果と一致している。これらの結果は、GTP 加水分解は HSP60/HSP10 の効率的な *in-cage folding* に要求されないが、CS や GFP のような自発的にフォールディングできるタンパク質のリフォールディングには対応できることを示している。

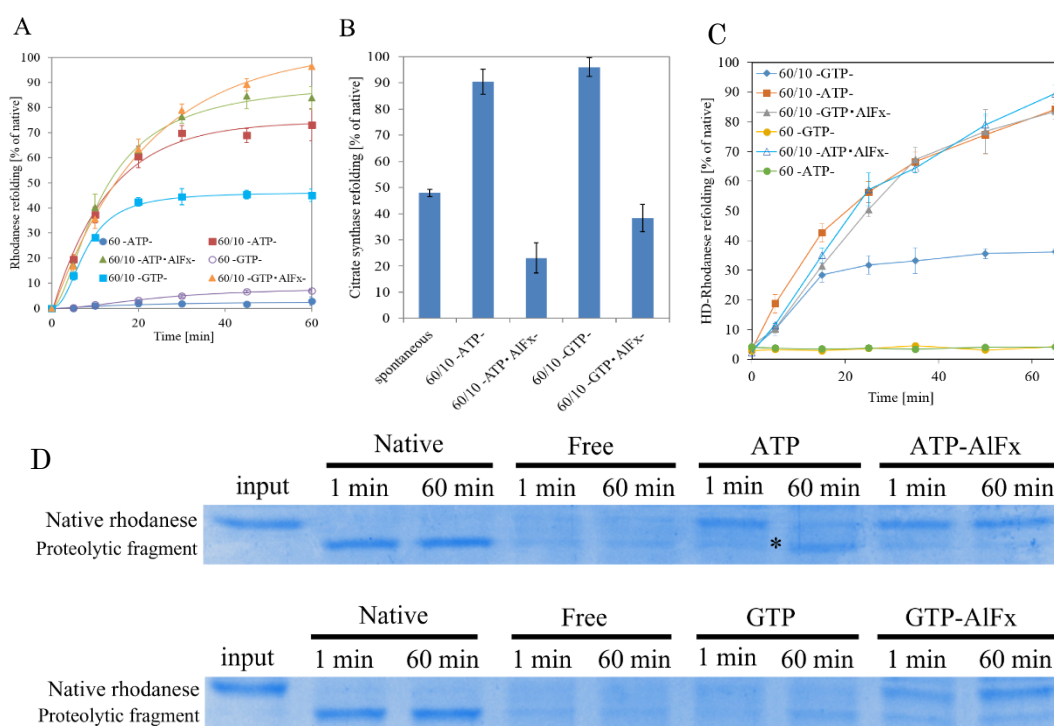


Fig. 17 各ヌクレオチド条件によって誘導される HSP60 のシャペロン活性

A は各ヌクレオチド条件下における HSP60 及び HSP60/HSP10 の化学変性ローダネーゼのリフォールディング実験の結果を示している。同様に、B は化学変性クエン酸合成酵素の、C は熱変性ローダネーゼのリフォールディング実験の結果を示している。D は各ヌクレオチド条件下における熱変性ローダネーゼのフォールディングチャンバーへの封入・放出をトリプシン消化耐性実験にて解析した結果を示している。*はフォールディング後にチャンバー外に放出されたローダネーゼの分解産物を示している。

3-6) ATP 依存的なシャペロン活性に対する GTP の影響

第 3 章の実験の最後に、生体内におけるヌクレオチド濃度（本研究では細胞質濃度を適用；3.5 mM ATP および 0.5 mM GTP）条件下における ATP 依存的なシャペロン活性と、その活性に対する GTP 分子の影響を調査する実験を行った。実験の初めに、0 から 3.5 mM 濃度条件における ATP 加水分解速度を測定した (Fig. 18A)。HSP60 の ATP 加水分解曲線は 0 から 1 mM における 2 段階のアロステリック遷移に加えて、1 から 3.5 mM における明確な加水分解速度の現象が観察された (Fig. 18A, blue closed circle)。GroEL の過去の研究において、ATP 加水分解曲線の濃度依存的な加水分解速度の減少 (roll-off と呼ばれる) はすでに報告されている [26]。これらの減少は、安定なダブルリング構造で存在している GroEL の両方のリングが活性状態に移行することによって、リング間の負の協同性 (inter-ring negative cooperativity) によって生じると考えられている。このことから、HSP60 の ATP 加水分解速度の減少はダブルリング化及び両リングの活性化に伴う negative cooperativity によって生じていると考えられる。HSP10 の存在下において、1 mM 以上の ATP 濃度条件下における明確な roll-off は観察されなかった (Fig. 18A, orange closed circle)。遺伝子組み換え体 HSP60 を用いた結晶構造解析は安定なフットボール型複合体におけるリング間の接触を詳細に解析しており、GroEL とは異なるリング間のコミュニケーションを描写した。さらに、安定なフットボール型複合体において、両リングのサブユニットがすべて ADP で満たされていることから、著しい negative cooperativity は見られないと推察しており [24]、roll-off が見られなかった今回の結果は、過去の報告と一致していると考えられる。

GTP は ATP 加水分解のアロステリック遷移にわずかな影響を与えた。HSP60 の roll-off は GTP 非存在下において 1 mM 以上で生じていたのに対し、GTP 存在下では 0.5 mM 以上で生じた (Fig. 18A, gray closed circle)。加えて、最大反応速度もわずかに増加している。HSP10 存在下における実験においても同様に、最大加水分解速度の上昇が見られる (Fig. 18A, yellow closed circle)。大きな違いとして、明確な roll-off が生じていることである。このように、GTP の存在はヌクレオチド加水分解速度を増加させているように思われる。しかしながら、生体内ヌクレオチド濃度 (3.5 mM ATP および 0.5 mM GTP) において、GTP の存在に関わらず、inter-ring negative cooperativity による roll-off によって、ヌクレオチド加水分解活性は一樣に同程度の加水分解率になっていることが判明した。

次に、これらの異なる ATP 濃度条件下における HSP60/HSP10 によるタンパク質リフォールディング活性を調べた。Fig. 18B の左のグラフは 0.5 mM GTP 存在下におけるリフォールディング活性および 0.5 mM GTP 非存在下における

異なる ATP 濃度 (0.01, 0.5, 1.0, 3.5 mM) 条件下のローダナーゼリフォールディング活性を示している。0.5 mM GTP のみのリフォールディング活性は、Fig. 17 における 1 mM GTP 濃度下における実験と一致して効率的なリフォールディングを行うことに失敗している。対して、ATP 存在下の場合、どの濃度条件においてもローダナーゼを効率的にリフォールディング可能であることを示している。面白いことに、0.01 mM ATP 存在下では、安定な HSP60 と HSP10 の結合を示さなかったのに対して (Fig. 14A)、リフォールディング活性は他の濃度と比較可能なほど効率的である。HSP60 による 0.01 mM ATP の ATP 加水分解速度は HSP10 の存在下で減少していることから (Fig. 13C)、結合安定性 (おそらく結合・解離サイクルの速度が速い) は他の濃度条件と比較して低いものの、リフォールディング可能な状態であることを示している。Fig. 18B の右のグラフは 0.5 mM GTP 存在下における異なる ATP 濃度条件下のリフォールディング活性を示している。0.5 mM GTP 存在下においても、すべての ATP 濃度条件下において効率的なリフォールディングを発揮していることを示した。これらの結果は、たとえ GTP の影響で加水分解速度が上昇するとしても、生体内濃度条件下では安定なダブルリング形成による両リングの活性化と inter-ring negative cooperativity によって消費が抑えられ、且、効率的にリフォールディング活性を発揮することを示唆している。

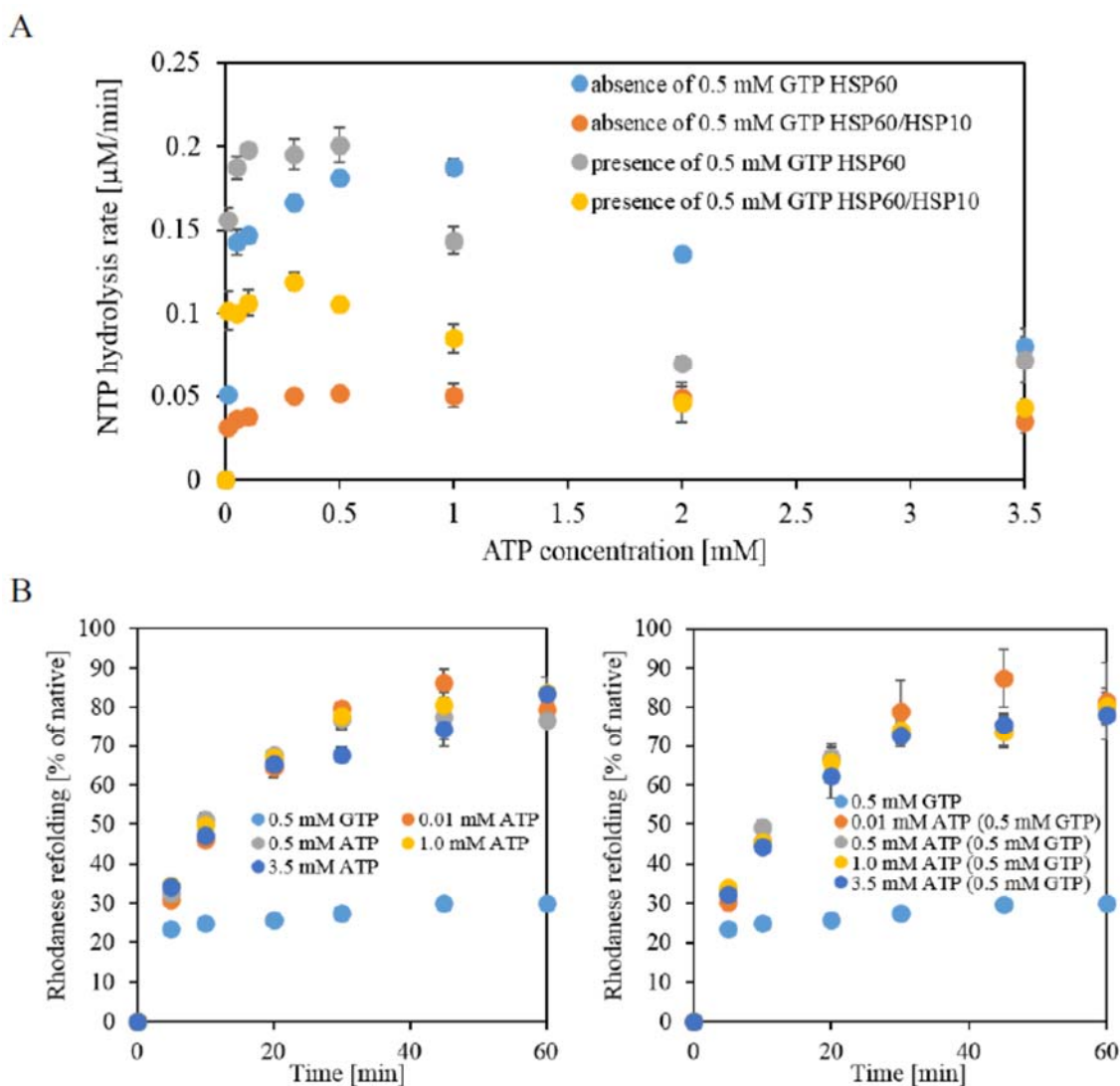


Fig. 18 生体内ヌクレオチド条件によって誘導されるシャペロン活性

Aは0.5 mM GTP 存在もしくは非存在下における0から3.5 mM ATP 濃度条件下のHSP60 および HSP60/HSP10 のヌクレオチド加水分解測定の結果を示している。Bの左のグラフは0.5 mM GTP 非存在下における各ATP 濃度条件下におけるHSP60/HSP10 の化学変性ローダネーゼのリフォールディング実験の結果を示している。右のグラフは0.5 mM GTP 存在下における各ATP 濃度のリフォールディング活性を示す。

4) 考察

これまでの研究により、ATP 依存的な哺乳類分子シャペロン HSP60/HSP10 のフォールディングサイクルに関する研究についてはいくつか報告されており、特徴付けられている。過去の当研究室の研究結果は哺乳類細胞質シャペロニン CCT が GTP 加水分解活性を有していることを明らかにしており、GTP によって制御される分子シャペロンの新たな側面を明確に示唆した。本研究において、HSP60 が CCT と同様に GTP 加水分解活性を有していることを発見した。ATP 加水分解で誘導される HSP60 単独及び HSP60/HSP10 の複合体形成と、GTP 加水分解で誘導される複合体形成は異なっていることが示唆された。ATP 加水分解は HSP10 の結合によって抑制されるのに対し、GTP 加水分解は抑制されなかった。また、もともとの加水分解速度も低く、親和性にも大きな違いがあった。ヌクレオチド結合によって生じる HSP60 の構造変化がわずかに違い、その差異が複合体形成の動的平衡や HSP10 の結合に差を生んでいるのかもしれない。この結合力の差は HSP60/HSP10 の重要な機能であるタンパク質フォールディング活性にも大きな影響を与える。非自発的フォールディングタンパク質であるローダネーゼのリフォールディングは、ATP 存在下においては効率的にフォールディングチャンバー内に封入され、リフォールディングされた。一方、GTP 存在下においては、封入化に失敗しており、結果としてリフォールディング活性は減少した。この結果は、GTP によって誘導される弱い HSP10 の相互作用ではアピカルドメイン上の変性基質を競合的に剥がすことができず、フォールディングチャンバー内への封入に失敗していることを示唆している。

ローダネーゼのような自発的フォールディングを行わないタンパク質のフォールディングに失敗した一方で、GFP や CS のような自発的リフォールディングタンパク質に対しては効率的なフォールディング活性を示した。GroEL/GroES のフォールディングに関する最近の研究結果において、アピカルドメイン上の基質ポリペプチドが GroES 結合による封入時に、一部チャンバー内から逃げ出し、フォールディングケージの外で自発的なフォールディングを促進している (out-of-cage folding) ことを示唆する報告がなされた[55]。また、特殊な条件で作成した非凝集性の安定な変性ポリペプチドのフォールディングに関して、CCT を含むシャペロニンがアピカルドメイン上への捕獲と ATP 依存的な構造変化による基質のアンフォールディングによって、コシャペロン非依存的に放出し、out-of-cage folding を促進することも報告された[56]。GTP によって誘導される HSP60 のアピカルドメインへの HSP10 の結合は、その相互作用の弱さから、アピカルドメイン上のポリペプチドのチャンバー内への放出に失敗するが、ポリペプチドを自由溶媒中に逃げ出させ、ポリペプチドの自発的リフォールディングを促進しているのかもしれない。この仮説は各種ヌクレオ

チドによって発揮される HSP60/HSP10 の結合親和性だけでなく、自発的及び非自発的にフォールディングを行ういくつかの変性ポリペプチドと HSP60 との結合親和性の解析を行うことによってより明確に解明できるかもしれない。このように、ATP と GTP ではリフォールディングできる基質が異なっていることが予想される。哺乳類細胞は大腸菌と比較して非常に多くの基質の種類が考えられ、これらの条件に適応するために進化してきた機能なのかもしれない。

本研究では、ATP 加水分解に対する HSP60 のアロステリーも同時に調査した。GroEL の過去の研究は 7 つのサブユニットによるリング内の正の協同性と、ダブルリング構造によるリング間の負の協同性を明確に証明している[46]。GroEL のアロステリック遷移は中間地点 16 μM で示される **intra-ring positive cooperativity** と、中間地点 160 mM で示される **inter-ring negative cooperativity** が報告されている。対して、HSP60 のアロステリック遷移は 2 段階の **positive cooperativity** と、緩やかな **negative cooperativity** からなる 3 段階のアロステリック遷移を示した。HSP60 は GroEL と異なり apo 状態ではシングルリング構造で存在しており、おそらく 2 段階目の遷移はダブルリング化によるものだと考えられる。GTP ではこの 2 段階目のアロステリック遷移は観察されず、ダブルリング構造の増加も観察されなかった。またフォールディング活性も発揮されなかったことから、2 段階目のアロステリック遷移は活性状態のリング状態に遷移するための重要な変化を示しているのかもしれない。HSP10 存在下では、明確な **negative cooperativity** は観察されず、過去の HSP60 の報告と一致する。GroEL は GroES と結合することによって活性状態が安定化されることが報告されており[57]、HSP60 の **negative cooperativity** の消失は、両リングの活性状態が独立して HSP10 によって制御されているためだと考えられる。また、HSP60 の **inter-ring negative cooperativity** は GroEL のそれと比較して非常に緩やかであり、この結果も HSP60 のリング間の協同性が GroEL のそれと比較して低いことを示している。

GTP 分子は HSP60 の ATP 加水分解活性とアロステリック遷移にわずかに影響し、加水分解速度の増加をさせ、HSP10 存在下における明確な **inter-ring negative cooperativity** を出現させた。しかしながら、生体内濃度条件下 (3.5 mM ATP および 0.5 mM GTP) では、GTP の存在に関係なく HSP10 存在および非存在下のそれぞれの加水分解速度はほぼ同程度になり、加水分解が非常に低い速度で行われていることを明らかにした。これらの低く抑えられた加水分解にもかかわらず、タンパク質のリフォールディング活性は高い割合で保たれている。これらの結果から、HSP60 は生体内においてヌクレオチドの消費を極力抑えながら、効率的なリフォールディングを実現しているのかもしれない。

第4章 総括

本研究は解析がほとんど進んでいなかった哺乳類分子シャペロン HSP60 の生理機能及び機能的構造変化に関する基礎的な情報を入手するために行われた。

1970年代の初め、アンフィンセンは小さいタンパク質はそのアミノ酸配列に従って自発的に固有の高次構造に折りたたまれることを示した[58]。しかし、後にこの現象は細胞内の環境を度外視した条件下における分子量が非常に小さく、単一のドメインから構成されるタンパク質についてのみ生じることが示された。自発的フォールディングできないタンパク質のフォールディングには何かしらほかの因子が必要であることが考えられ、今日の分子シャペロンの研究に至る。分子シャペロンによるタンパク質フォールディングの研究で最も有名なものの一つが大腸菌グループ I シャペロニン GroEL/GroES システムである。GroEL/GroES のアミノ酸配列は生物種をわたって幅広く保存されており、グループ I シャペロニンのフォールディングサイクルは GroEL/GroES と同一のものと考えられてきた。

本研究の第2章において、GroELの相同体である哺乳類野生型分子シャペロン HSP60 の ATP 及びコシャペロン依存的なシャペロンサイクルの基礎を研究した。その結果、HSP60/HSP10 の ATP 依存的なシャペロンサイクルは従来の GroEL/GroES で報告されている ATP 依存的なシャペロンサイクルと異なり、より複雑な複合体形成過程を辿ってシャペロンサイクルを進行させていることが判明した。第3章では ATP 依存的なシャペロンサイクルに加えて、GTP 依存的なシャペロンサイクルを研究した。過去に当研究室はグループ II シャペロニン CCT において GTP 加水分解とそれによって引き起こされる構造変化を明らかにした。同様に、HSP60 も GTP 加水分解能を有していることが本研究で明らかにされた。ATP 依存的なシャペロンサイクルと比較して、効率的なシャペロン活性を発揮するためには基質に対して選択性を持っていることが示唆された。大腸菌のタンパク質の種類と比較して、哺乳類細胞のタンパク質の数は進化によって大きく増加しており、HSP60 はこの環境に対応するために GroEL から進化してきたのかもしれない。

加えて、ATP 加水分解に対する HSP60 のアロステリック遷移の研究も行った。GroEL の過去の研究は、安定なダブルリング構造による明確なリング間の接触によって生じる、強い negative cooperativity が観察されている。このため、GroEL/GroES は交互に反応が生じる弾丸型複合体を形成すると考えられている。しかしながら、HSP60 の ATP 加水分解に対するアロステリック遷移、特に inter-ring negative cooperativity は GroEL と比較して非常に弱く、各リングがそれぞれ独立して働いていることが予想され、そのため、安定なフットボール型複合体を形成できると考えられる。

GTP 分子は ATP 分子と共役することで、ヌクレオチドの加水分解速度を大きく上昇させた。しかしながら、生体内濃度下になったとき、加水分解の roll-off によって加水分解速度は大きく減少する。フォールディング活性はこの状態でも非常に高い効率性を示したことから、HSP60/HSP10 は生体内条件ではヌクレオチドの消費を抑えて、且、効率的に基質を折りたたんでいることを示唆している。

本研究で示唆されたように、HSP60 は GroEL と異なる機能を多数有していると思われる。HSP60 はミトコンドリアの機能異常によって発生する疾患に加え、免疫疾患、がん、最近ではアルツハイマー病など多くの病理学的知見における重要な因子として挙げられる。これらの報告は HSP60 の生理機能が単純なタンパク質フォールディングマシンとして機能するだけでなく、生体内の恒常性の維持のために非常に多くの機能を有していることを如実に示唆している。以上のことから、HSP60 の生理機能及び機能的構造変化の更なる解析によって導き出される生理的意義の解明は、HSP60 を重要な因子として生じる各種疾患に対する、HSP60 を標的とした疾患治療に有望な情報を提供することが期待できる。

参考文献

- [1] Hartl FU, Bracher A and Hayer-Hartl M. (2011). Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature*. **475**(7356), 324-32.
- [2] Clare DK, Saibil HR. (2013). ATP-Driven Molecular Chaperone Machines. *Biopolymers*. **99**, 846-859.
- [3] Clare DK, Vasishtan D, Stagg S, Quipe J, Farr GW, Topf M, Horwich AL and Saibil HR. (2012). ATP-Triggered Conformational Changes Delineate Substrate-Binding and –Folding Mechanics of the GroEL Chaperonin. *Cell*. **149**, 113-123.
- [4] Horwich AL. (2011). Protein folding in the cell: an inside story. *NATURE MEDICINE*. **17**, 1211-1216.
- [5] Hartl FU. (2011). Chaperone-assisted protein folding: the path to discovery from a personal perspective. *NATURE MEDICINE*. **17**, 1206-1210.
- [6] Dahiya V and Chaudhuri TK. (2014). GroEL/GroES accelerates the refolding of a multi-domain protein through modulating on pathway intermediate. *Journal of Biological Chemistry*. **289**(1), 286-98.
- [7] Yagi-Utsumi M, Kunihara T, Nakamura T, Uekusa Y, Makabe K, Kuwajima K, Kato K. (2012). NMR characterization of the interaction of GroEL with amyloid β as a model ligand. *FEBS Letters*. **587**, 1605-1609.
- [8] Ojha B, Fukui N, Hongo K, Mizobata T and Kawata Y. (2016). Suppression of amyloid fibrils using the GroEL apical domain. *SCIENTIFIC REPORTS*. **6**: 31041. DOI: 10.1038.
- [9] Chen J, Yagi H, Sormanni P, Vendruscolo M, Makabe K, Nakamura T, Goto Y, Kuwajima K. (2012). Fibrillogenic propensity of the GroEL apical domain: A Janus-faced minichaperone. *FEBS Letters*. **586**, 1120-1127.
- [10] Horwivh AL. (2013). Chaperonin-mediated protein folding. *Journal of Biological Chemistry*. **288**, 23622-32.
- [11] Chandra D, Choy Grace and Tang DG. (2007). Cytosolic Accumulation of HSP60 during Apoptosis with or without Apparent Mitochondrial Release: EVIDENCE THAT ITS PRO-APOPTOTIC OR PRO-SURVIVAL FUNCTIONS INVOLVE DIFFERENTIAL INTERACTIONS WITH CASPASE-3. *Journal of Biological Chemistry*. **282**, 31289-31301.
- [12] Henderson B. (2010). Integrating the cell stress response: a new view of molecular chaperones as immunological and physiological homeostatic regulators. *Cell Biochem Funct*. **28**, 1-14.
- [13] Lim R, Lappas M, Ahmed N, Permezel M, Quinn MA, Rice GE. (2011).

- 2D-PAGE of ovarian cancer: Analysis of soluble and insoluble fractions using medium-range immobilized pH gradients. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **406**, 408-413.
- [14] Rappa F, Pitruzzella A, Mario Gammazza A, Barone R, Mocciano E, Tomasello G, Carini F, Farina F, Zummo G, de Macario EC, Macario AJ, Cappello F. (2016). Quantitative patterns of Hsps in tubular adenoma compared with normal and tumor tissues reveal the value of Hsp10 and Hsp60 in early diagnosis of large bowel cancer. *Cell Stress and Chaperones*. **21**, 927-933.
- [15] Itoh H, Komatsuda A, Wakui H, Miura AB, Tashima Y. (1999). Mammalian HSP60 is a major target for an immunosuppressant mizoribine. *Journal of Biological Chemistry*. **274**, 35147-51.
- [16] Nakamura H, Minegishi H. (2013). HSP60 as a drug target. *Curr Pharm Des*. **19**, 441-51.
- [17] Pace A, Barone G, Lauria A, Martorana A, Piccionello AP, Pierro P, Terenzi A, Almerico AM, Buscemi S, Campanella C, Augileri F, Carini F, Zummo G, de Macario EC, Cappello F, Macario AJ. (2013). HSP60, novel target for antitumor therapy: structure-function features and prospective drug design. *Curr Pharm Des*. **19**, 2757-64.
- [18] Hu D, Liu Y, Lai YT, Tong KC, F YM, Lok CN and CHe CM. (2016). Anticancer Gold(III) Porphyrins Target Mitochondrial Chaperone Hsp60. *Angew. Chem. Int. Ed*. **55**, 1387-1391.
- [19] Hohfeld J and Hartl FU. (1994). Role of the Chaperonin Cofactor Hsp10 in Protein Folding and Sorting in Yeast Mitochondria. *Journal of Cell Biology*. **126**, 305-315.
- [20] Viitanen PV, Lorimer G, Bergmeier W, Weiss C, Kessel M and Goloubinoff P. (1998). Purification of mammalian mitochondrial chaperonin 60 through in vitro reconstitution of active oligomer. *Methods in Enzymology*. **290**, 203-217.
- [21] Levy-Rimler G, Viitanen P, Weiss C, Sharkia R, Greenberg A, Niv A, Lustig A, Delarea Y, Azem A. (2001). The effect of nucleotides and mitochondrial chaperonin 10 on the structure and chaperone activity of mitochondrial chaperonin 60. *Eur. J. Biochem*. **268**, 3465-3472.
- [22] Nielsen KL, Cowan NJ. (1998). A single ring is sufficient for productive chaperonin-mediated folding in vivo. *Mol Cell*. **2**, 93-99.
- [23] Parnas A, Nisemblat S, Weiss C, Levy-Rimler G, Pri-Or A, Lund PA,

- Bross P, Azem A. (2012). Identification of Elements That Dictate the Specificity of Mitochondrial Hsp60 for Its Co-Chaperonin. *PLOS ONE*, **7(12)**: e50318.
- [24] Nisemblat S, Yaniv O, Parnas A, Frolow F and Azem A. (2015). Crystal structure of the human mitochondrial chaperonin symmetrical football complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **112**, 6044-6049.
- [25] Chen DH, Madan D, Weaver J, Lin Z, Schroder GF, Chiu W and Rye HS. (2013). Visualizing GroEL/ES in the Act of Encapsulating a Folding Protein. *Cell*. **153**, 1354-1365.
- [26] Weaver J and Rye HS. (2014). The C-terminal Tails of the Bacterial Chaperonin GroEL Stimulate Protein Folding by Directly Altering the Conformation of a Substrate Protein. *Journal of Biological Chemistry*. **289**, 23219-32.
- [27] Wakui H, Itoh H, Tashima Y, Kobayashi R, Nakamoto Y and Miura AB. (1992). Purification of a Mature Form of 60 kDa Heat-Shock Protein (Chaperonin Homolog) From Porcine Kidney and Its Partial Amino Acid Sequence. *Int. J. Biochem*. **24**, 1507-1510.
- [28] Itoh H, Kobayashi R, Wakui H, Komatsuda A, Ohtani H, Miura AB, Otaka M, Masamune O, Andoh H, Koyama K, Sato Y and Tashima Y. (1995). Mammalian 60-kDa Stress Protein (Chaperonin-Homolog). Identification, biochemical properties, and localization. *Journal of Biological Chemistry*. **270**, 13429-35.
- [29] Parnas A, Nadler M, Nisemblat S, Horovitz A, Mandel H and Azem A. (2009). The MitCHAP-60 Disease Is Due to Entropic Destabilization of the Human Mitochondrial Hsp60 Oligomer. *Journal of Biological Chemistry*. **284**, 28198-28203.
- [30] Azem A, Tsfadia Y, Hajouj O, Shaked I, Daniel E. (2010). Cross-linking with bifunctional reagents and its application to the study of the molecular symmetry and the arrangement of subunits in hexameric protein oligomer. *Biochim Biophys Acta*. **1804**, 768-80.
- [31] Bayer E, Bauer B and Eggerer H. (1981). Evidence from Inhibitor Studies for Conformational Changes of Citrate Synthase. *Eur. J. Biochem*. **120**, 155-160.
- [32] Schmidt M, Buchner J, Todd MJ, Lorimer GH and Viitanen PV. (1994). On the Role of groES in the Chaperonin-assisted Folding Reaction. *Journal of Biological Chemistry*. **269**, 10304-10311.

- [33] Natalello A, Mattoo R U.H., Priya S, Sharma SK, Goloubinoff P and Doglia S. (2013). Biophysical Characterization of Two Different Stable Misfolded Monomeric Polypeptides That Are Chaperone-Amenable Substrate. *J. Mol. Biol.* **425**, 1158-1171.
- [34] Hayer-Hartl M, Bracher A and Hartl FU. (2015). The GroEL-GroES Chaperonin Machine: A Nano-Cage for Protein Folding. *Trends in Biochemical Sciences.* **41**, 62-76.
- [35] Taguchi H, Tsukuda K, Motojima F, Koike-Takeshita A and Yoshida M. (2004). BeF_x Stops the Chaperonin Cycle of GroEL-GroES and Generates a Complex with Double Folding Chambers. *Journal of Biological Chemistry.* **279**, 45737-45743.
- [36] Motojima F, Motojima-Miyazaki Y and Yoshida M. (2012). Revisitin the contribution of negative charges on the chaperonin cage wall to the acceleration of protein folding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **109**, 15740-5.
- [37] Fenton WA, Kashi Y, Furtak K, Horwich AL. (1994). Residues in chaperonin GroEL required for polypeptide binding and release. *Nature.* **371**, 614-619.
- [38] Koike-Takeshita A, Arakawa T, Taguchi H, Shimamura T. (2014). Crystal structure of a symmetric football-shaped GroEL:GroES₂-ATP₁₄ complex determined at 3.8 Å reveals rearrangement between two GroEL rings. *Journal of Molecular Biology.* **426**, 3634-41.
- [39] Koike-Takeshita A, Mitsuoka K, Taguchi H. (2014). Asp-52 in combination with Asp-398 plays a critical role in ATP hydrolysis of chaperonin GroEL. *Journal of Biological Chemistry.* **289**, 30005-11.
- [40] Ye X, Lorimer GH. (2013). Substrate protein switches GroE chaperonins from asymmetric to symmetric cycling by catalyzing nucleotide exchange. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **110**, E4289-E4297
- [41] Yang D, Ye X, Lorimer GH. (2013). Symmetric GroEL: GroES₂ complexes are the protein-folding functional form of the chaperonin nanomachine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **110**, E4298-E4305.
- [42] Fei X, Ye X, LaRonde NA, Lorimer GH. (2014). Formation and structures of GroEL: GroES₂ chaperonin footballs, the protein-folding functional form. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **111**, 12775-12780.
- [43] Haldar S, Gupta AJ, Yan X, Milicic G, Hartl FU, Hayer-Hartl M. (2015). Chaperonin-Assisted Protein Folding: Relative Population of Asymmetric and Symmetric GroEL:GroES Complex. *J Mol Biol.* **427**, 2244-2255.

- [44] Leung WH, Vong QP, Lin D, Bouck D, Wendt S, Sullivan E, Li Y, Bari R, Chen T, Leung W. (2015). PRL-3 mediates the protein maturation of ULBP2 by regulation the tyrosine phosphorylation of HSP60. *J. Immunol.* **194**, 2930-2941.
- [45] Gorska M, Marino Gammazza A, Zmijewski MA, Campanella C, Cappello F, Wasiewicz T, Kuban-Jankowska A, Daca A, Sielicka A, Popowska U, Knap N, Antoniewicz J, Wakabayashi T, Wozniak M. (2013). Geldanamycin-Induced Osteosarcoma Cell Death Is Associated with Hyperacetylation and Loss of Mitochondrial Pool of Heat Shock Protein 60 (Hsp60). *PLOS ONE*. **8**, e71135.
- [46] Yifrach, O., Horovitz, A. (1995) Nested cooperativity in the ATPase activity of the oligomeric chaperonin GroEL. *Biochemistry*, **34**, 5303-5308.
- [47] Kafri, G., Willison, K.R., Horovitz, A. (2001) Nested allosteric interactions in the cytoplasmic chaperonin TCP-1. *Protein Science*, **10**, 445-449.
- [48] Bailey ME, Jiang N, Dima RI, Ross JL. (2016). Microtubule Severing Enzymes Couple ATPase Activity with Tubulin GTPase Spring Loading. *Biopolymers*. **105**, 547-556.
- [49] Daumke O, Praefcke GJK. (2016). Mechanisms of GTP Hydrolysis and Conformational Transitions in the Dynamin Superfamily. *Biopolymers*. **105**, 580-593.
- [50] Shan S-o. (2016). ATPase and GTPase Tangos Drive Intracellular Protein Transport. *Trends in Biochemical Sciences*. Article in press.
- [51] Noguchi S, Toyoshima K, Yamamoto S, Miyazaki T, Otaka M, Watanabe S, Imai K, Senoo H, Kobayashi R, Jikei M, Kawata Y, Kubota H, Itoh H. (2011). Cytosolic chaperonin CCT possesses GTPase activity. *American Journal of Molecular Biology*. **1**, 123-130.
- [52] Nardai G, Schnaider T, Soti C, Ryan MT, Hoj PB, Somogyi J and Csermely P. (1996). Characterization of the 90 kDa heat shock protein (HSP90)-associated ATP/GTPase. *Journal of Biosciences*. **21**, 179-190.
- [53] Nojima T, Ikegami T, Taguchi H, Yoshida M. (2012). Flexibility of GroES Mobile Loop Is Required for Efficient Chaperonin Function. *J Mol Biol*. **422**, 291-9.
- [54] 尾高 雅文. (2011). 光散乱法によるタンパク質の絶対分子量と複合体系の解析. 生物工学. 第 89 巻、398-400.
- [55] Motojima F and Yoshida M. (2010). Polypeptide in the chaperonin cage partly protrudes out and then folds inside or escapes outside. *EMBO*

Journal. **29**, 4008-4019.

- [56] Priya S, Sharma SK, Sood V, Mattoo RUH, Finka A, Azem A, DE Los Rios P, Goloubinoff P. (2013). GroEL and CCT are catalytic unfoldases mediating out-of-cage polypeptide refolding without ATP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **110**, 7199-204.
- [57] Gray, T.E., Fersht, A.R. (1991) Cooperativity in ATP hydrolysis by GroEL is increased by GroES. *FEBS LETTERS*, **292**, 254-258.
- [58] Anfinsen CB. (1973). Principles that govern the folding of protein chain. *Science.* **181**, 223-230.

研究業績

発表論文（査読付き）

- Haga A, **Okamoto T**, Yamada S, Kubota T, Sanpei A, Takahashi S, Nakayama M, Nagai M, Otaka M, Miyazaki T, Nunomura W, Grave E, Itoh H.: Zinc-L-Carnosine Binds to Molecular Chaperone HSP70 and Inhibits the Chaperone Activity of the Protein. *J Biochem.* **154**, 249-56. (2013)
- Tsuji N, Fukuda K, Nagata Y, Okada H, Haga, Hatakeyama S, Yoshida S, **Okamoto T**, Hosaka M, Sekine K, Ohtaka K, Yamamoto S, Otaka M, Grave E, Itoh H.: AhR activation mechanisms by molecular chaperone HSP90. *FEBS Open Bio* **4**, 796-803 (2014)
- Grave E, Yokota S, Yamamoto S, Tamura A, Ohtaki-Mizoguchi T, Yokota K, Oguma K, Fujiwara K, Ogawa N, **Okamoto T**, Otaka M, Itoh H.: Geranylgeranylacetone selectively binds to the HSP70 of *Helicobacter pylori* and alters its coccoid morphology. *Scientific Reports* **5**:13738. doi: 10.1038/srep13738. (2015)
- **Okamoto T**, Ishida R, Yamamoto H, Tanabe-Ishida M, Haga A, Takahashi H, Takahashi K, Goto D, Grave E, Itoh H.: Functional structure and physiological functions of mammalian wild-type HSP60. *Archiv Biochem Biophys* **586**, 10-19 (2015)
- Yamamoto S, **Okamoto T**, Ogasawara N, Hashimoto S, Shiraishi T, Sato T, Yamamoto K, Tsutsumi H, Takano K, Himi T, Itoh H, Yokota SI.: NIP-SNAP-1 and -2 mitochondrial proteins are maintained by heat shock protein 60. *Biochem Biophys Res Commun.* pii: S0006-291X(16)32193-3. (2016)

学会発表等

国内学会

- 羽賀 愛沙美、岡本 知也、久保田 俊彦、三瓶 杏、高橋 将太、仲山 真弘、永井 美希、山田 辰太郎、大高 道郎、伊藤 英晃：胃粘膜保護剤 Polaprezinc 結合タンパク質の同定と機能解析。第6回臨床ストレス応答学会、2011年。名古屋

- 伊藤 英晃、石田 竜一、岡本 知也：哺乳類分子シャペロンの構造と生理機能 / Structure and physiological functions of mammalian chaperonin. 第 13 回日本蛋白質科学年会、2013 年 6 月 12 日 (水) ~14 日 (金). とりぎん文化会館
- 伊藤 英晃、石田 竜一、岡本 知也、宮崎 敏夫、涌井 秀樹：分子シャペロン HSP60 による細胞内 ATP 合成量制御. 第 86 回 日本生化学会大会、2013 年 9 月 13 日 (金). パシフィコ横浜
- 羽賀 愛沙美、岡本 知也、畠山 詩織、黒澤 友翼、三瓶 杏、西 聡美、菅原 卓、南條 博、伊藤 英晃：DNA polymerase η と HSP90 の相互作用解析. 第 8 回臨床ストレス応答学会、2013 年. 信州大学 (松本)
- Asami Haga, Tomoya Okamoto, Shiori Hatakeyama, Taku Sugawara, Hideaki Itoh : Analysis of interaction between HSP90 and DNA polymerase η . 第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月 3 日 (火) ~12 月 6 日 (金). 神戸ポートアイランド
- Tomoya Okamoto, Asami Haga, Hiroshi Yamamoto, Hideaki Itoh : Physiological analysis of mammalian molecular chaperone HSP60 existing cytoplasm and mitochondria. 第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月 3 日 (火) ~12 月 6 日 (金). 神戸ポートアイランド
- 岡本 知也：哺乳類分子シャペロン HSP60 の機能・構造解析. 第 4 回分子生命研究会、2013 年 12 月 27 日. 秋田大学
- 柿崎 友佳、保坂 未来、岡本 知也、羽賀 愛沙美、伊藤 英晃：AhR と HSP90 の結合における阻害剤の影響. 第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月 25 日 (火) ~27 日 (木). パシフィコ横浜
- 保坂 未来、柿崎 友佳、羽賀 愛沙美、岡本 知也、伊藤 英晃：Aryl hydrocarbon receptor (AhR) の HSP90 結合ドメイン及び活性化機構の解明. 第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月 25 日 (火) ~27 日 (木). パシフィコ横浜

- ・伊藤 英晃、Ewa Grave、田村 ありさ、岡本 知也、横田 伸一、山本 聡、大高 道郎 : Geranylgeranylacetone のヘリコバクターピロリ菌 HSP70 に対する選択低親和性及び形態変化促進. 第 38 回日本分子生物学会年会及び第 88 回日本生化学会大会合同大会、2015 年 12 月 1 日 (火) ~4 日 (金). 神戸ポートアイランド
- ・ Ewa Grave, Arisa Tamura, Tomoya Okamoto, Shin-ichi Yokota, Soh Yamamoto, Michiro Otaka, Hideaki Itoh : Geranylgeranylacetone selectively binds to the HSP70 of *H. pylori* and alters its coccoid morphology. 第 38 回日本分子生物学会年会及び第 88 回日本生化学会大会合同大会、2015 年 12 月 1 日 (火) ~4 日 (金). 神戸ポートアイランド

国際学会

- ・ Tomoya Okamoto, Ryuichi Ishida, Asami Haga, Hiroshi Yamamoto, Toshio Miyazaki, Hideaki Itoh : Characterization of Cytosolic- and Mitochondria type of Human HSP60. 国際ミニシンポジウム Protein Folding and Disease、2013 年 10 月 29 日 (火) ~10 月 30 日 (水). 秋田ビューホテル
- ・ Tomoya Okamoto, Hiroshi Yamamoto, Ryuichi Ishida, Hideaki Itoh : STRUCTURE AND PHYSIOLOGICAL FUNCTIONS OF CYTOSOLIC HSP60 . Cold Spring Harbor Laboratory, MEETING & COURSES, MOLECULAR CHAPERONES & STRESS RESPONSES, April 29-May 3, 2014.
- ・ Tomoya Okamoto, Ryuichi Ishida, Hideaki Itoh : PHYSIOLOGICAL FUNCTION OF MAMMALIAN MOLECULAR CHAPERONE HSP60. Cold Spring Harbor Laboratory, MEETING & COURSES, MOLECULAR CHAPERONES & STRESS RESPONSES, April 29-May 3, 2014.

謝辞

本研究は、秋田大学大学院 工学資源学研究科 生命科学専攻 生化学・分子生物学研究室の伊藤 英晃教授のもとで行われました。

3年生の後半という早い時期から研究室に配属させて頂き、ほとんど知識のない私に、自身のこれまで経験されたことや知識、研究者として生きていくすべなどを熱心にご指導してくださり、ここまで導いていただいた伊藤 英晃 教授に心から感謝申し上げます、ここに厚く御礼申し上げます。

分子生物学を始め、多くの生命科学分野における基礎的知識をご教授していただきました、生命科学専攻の教員の皆様に心から感謝し、ここに厚く御礼申し上げます。

初めて研究テーマをいただいた際に、朝早くから夜遅くまで時に厳しく、熱心に指導してくださり、また、ご卒業された後も多くの実験について議論や助言をしていただき、ご支援してくださいました大阪大学 石田 竜一 様に心より感謝し、ここに厚く御礼申し上げます。

透過型電子顕微鏡の解析を行うにあたり、酢酸ウランの貸し出しや、電子顕微鏡装置の使用方法についてなど、円滑に実験を行うために様々な面でサポートしていただき、多大なるご支援をいただきました、秋田大学 医学部 分子医学部門の職員の皆様に心から感謝し、ここに厚く御礼申し上げます。

SEC-MALS 解析を行うにあたり、光散乱測定の基礎的知識や測定方法、機器の貸し出しなど多くの面でご支援いただきました、生命科学専攻 尾高 雅文教授、応用化学専攻 松本 和也 講師に心から感謝すると共に、ここに厚く御礼申し上げます。

実験補助や研究室の行事など、研究室の生活における様々な面でご支援いただきました、卒業生を含む研究室のメンバーに心から感謝し、厚く御礼申し上げます。

学生生活を送るにあたり、多くの面で支えていただき、卒業された後も多くの助言や励ましをいただき、支えてくださいました、秋田大学剣道部の同期メンバーの皆様に心から感謝し、ここに厚く御礼申し上げます。

最後に、学部から始まり、「大学に残って研究がしたい」という私のわがまを許していただき、9年間という長い学生生活を不自由なく送れるようにご支援していただきました親族の皆様に心から感謝すると共に、ここに厚く御礼申し上げます。

多くの方々に支えられながら得た知識を、少しでも社会に還元できるように、今後も研究に励んで生きたいと思っております。

2017年 岡本 知也