

[研究論文]

シャペロニン GroEL への金属ナノ粒子の高効率内包 --分析電子顕微鏡システム利用研究成果、そのXXIV (2)--

依田ひろみ¹・小池あゆみ¹

1 博士後期課程応用化学・バイオサイエンス専攻

High efficiency encapsulation of nano particles in the chaperonin GroEL --Research works accomplished by using Electron Microscope System: XXIV (2) --

Hiromi Yoda¹, Ayumi Koike-Takeshita¹

Abstract

The chaperonin GroEL is a double-ring structure which is constructed with 7 subunit ring of 57 kD, and those ring forms back to back. GroEL is bound with ATP and the co chaperon GroES for assisting protein folding in the cell. GroES is a septemer ring structure of 10 kD, and forms an asymmetric bullet shaped complex and a symmetric football shaped complex with GroEL. We tried to encapsulate metal nano particle in the mutant GroEL which can constructs stable football shaped complexes. High efficiency encapsulation of FePt nano particles in the mutant GroEL complexes was shown by TEM observation.

Keywords: GroEL, GroES, Chaperonin complex, metal nano particles

1. はじめに

細胞内タンパク質の適切な折れ畳みを介助する GroEL は、真正細菌の可溶性画分に存在するシャペロニンで、真核生物のミトコンドリアに存在する Hsp60、葉緑体に存在する Cpn60 とともに、I型シャペロニンに分類される代表的なシャペロンである。GroEL は 57 kD のサブユニット 7 個から成るリング状構造が背中合わせに 2 つ重なった 14 量体構造を形成している (Fig. 1)。片側のリングの入口付近に基質タンパク質が結合した GroEL に ATP が結合すると、構造変化が起こって GroES が結合し、基質タンパク質は直径約 5nm の内腔に放出され、凝集の危険にさらされることなくフォールディングができる^{1,2}。

野生型 GroEL の ATP 加水分解時間は約 8 秒であり、GroES が 1 つ結合した弾丸型 GroEL / GroES 複合体を形成しながら 2 つのリングが交互に活性化されるシングルストロークモデルが従来提唱されてきた¹。しかし、1 つの GroEL に 2 つの GroES を結合したフットボール型 GroEL / GroES 複合体が反応中間体として存在することが明らか

になり、その重要性が示唆されている^{3,4}。GroEL の ATP 加水分解に関わるアミノ酸変異体は、ATP 加水分解時間が延長されるため、野生型に比べてフットボール型複合体を長時間維持することができると考えられる⁴。同変異体にタンパク質以外の物質を取り込ませることができれば、GroEL / GroES 複合体をタンパク質性のナノサイズカプセ

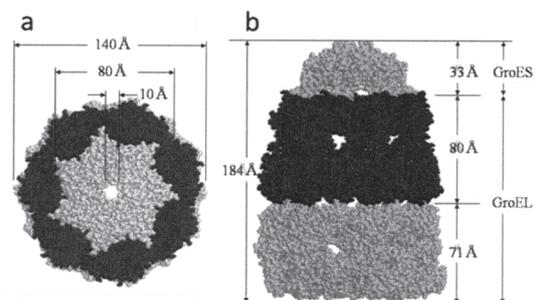


Fig. 1 GroEL / GroES bullet shaped complex
(a) Top view, (b) Side view.

ルとして利用する可能性が考えられる。

一方、近年の半導体分野では、量子ドットや金属ナノ粒子の一次元及び二次元配置が望まれており⁵、また、医療分野では生体適合性かつ非侵襲性のナノサイズ診断機・治療器の開発が望まれている⁶。いずれもカーボンナノチューブやナノ粒子といったナノ材料の利用が検討されており、ナノ粒子においては分散性を維持し、任意の配置を可能とするよう取り扱えることが望ましい。しかし、金属ナノ粒子は、表面積が大きいことから酸化作用などを受けやすく、クラスターやコロイドになりやすい。ナノ粒子が凝集してしまうことは、ナノ粒子の特性を損なうことになる。例えば、ナノ粒子の一種である量子ドットは、一次粒子として存在することにより粒径依存的に青～赤の異なる発光を有する量子サイズ効果を持つが、コロイドになると励起されにくくなる。そのため、市販のナノ粒子は、合成時に脂肪酸やポリマーで粒子表面が修飾され、親和性のある溶媒に分散されている。

そこで、金属ナノ粒子を GroEL / GroES 複合体に効率よく内包し、水溶液中で安定に分散することを確認した。

2. 材料および方法

2.1 金属ナノ粒子

ピルビン酸修飾白金鉄ナノ粒子 (FePt - P.A.) の合成は、Sun らの方法を参照して行った⁷。得られた白金鉄ナノ粒子は、エタノール浸漬し、使用するまで 4 °C で保存した。

ナノ粒子懸濁液として供するため、エタノール溶媒ごと FePt - P. A. を 14,500 rpm で遠心し、上清除去後、アルコ

ール洗浄を経て、20 mM HEPES (pH 7.5) に分散して使用した。

FePt - P. A. の粒径分布測定のため、TEM 用コロジョン支持膜付グリッド (EM Japan) をイオンコーター IB-2 (エイコーエンジニアリング) にて、1400 V、3 mA、30 秒間でプラズマ処理した。FePt - P. A. 粒子懸濁液 3 - 6 μ l をグリッド上で 1 分間保持後、濾紙片で試料を吸い取り、グリッドをドライキーパー (SANPLATEC Corp.) 内で 16 時間以上乾燥した。

グリッドの観察は、透過型電子顕微鏡 JEM 2000 EX (日本電子) にて、加速電圧 100 kV で行った。Image J 1.46 の Analyze Particles により、画像中の粒径を算出して統計処理し、平均粒径を求めた。

2.2 タンパク質 GroEL, GroES の精製

ATP 加水分解時間を延長した GroEL 変異体 (以下 GroEL と称する)、および野生型 GroES は論文に従い精製した⁴。

2.3 GroEL / GroES 複合体の調製

透過型電子顕微鏡観察のため、Table 1 に従って GroEL / GroES / FePt - P. A. 複合体を作製した。マイクロチューブに FePt - P. A. を入れ、Step 1 の試料を添加後 1 分間ピペティングにより混合し、Step 2 の試料を追加して、複合体を形成した。

また、動的光散乱 (DLS) 測定のために、Table 2 に従って試料を作製した。

Table 1 Recipes for TEM observation

Sample	Handling (Step 1 \rightarrow Step 2)	Step 1 (Transient concentration in 50 ml)			Step 2 (Final concentration in 100 ml)			
		GroEL (μ M)	GroES (μ M)	BSA (mg/ml)	GroEL (μ M)	GroES (μ M)	BSA (mg/ml)	ATP (mM)
(a)	FePt - P. A.	-	-	-	-	-	-	-
(b)	FePt - P. A. / GroEL \rightarrow GroES, ATP	0.17	-	-	0.1	0.2	-	1.0
(c)	FePt - P. A. / GroES \rightarrow GroEL, ATP	0.33	-	-	0.1	0.2	-	1.0
(d)	FePt - P. A. / GroEL / GroES \rightarrow ATP	0.17	0.33	-	0.1	0.2	-	1.0
(e)	FePt - P. A. / BSA \rightarrow GroEL, GroES, ATP	-	-	0.02	0.1	0.2	0.01	1.0
(f)	FePt - P. A. / GroEL / GroES (Rotation for 40 min.) \rightarrow ATP	0.17	0.33	-	0.1	0.2	-	1.0
Common composition		FePt - P. A. 16.67 mg/ml			FePt - P. A. 10.00 mg/ml 20mM HEPES, 100mM KCl, 5mM MgCl ₂			

Table 2 Recipes for DLS analysis

Sample	Handling (Step 1 \rightarrow Step 2)	Step 1 (Transient concentration in 50 ml)			Step 2 (Final concentration in 100 ml)			
		GroEL (μ M)	GroES (μ M)	FePt - P. A. (mg/ml)	GroEL (μ M)	GroES (μ M)	FePt - P. A. (mg/ml)	ATP (mM)
(a)	FePt - P. A.	-	-	-	-	-	-	-
(b)	FePt - P. A. / GroEL \rightarrow GroES, ATP	2.0	-	2.0	1.0	2.0	1.0	1.0
(c)	GroEL / GroES \rightarrow ATP	2.0	4.0	-	1.0	2.0	-	1.0
Common composition		20mM HEPES, 100mM KCl, 5mM MgCl ₂						

2.4 試料の観察

タンパク質のTEM観察のため、TEM用コロジオン支持膜付グリッドをイオンコーターIB-2にてプラズマ処理した(1400 V、3 mA、30 秒)。当日調製したGroEL/GroES複合体試料溶液3-6 μl をグリッド上で1分間保持後、超純水で2回洗浄し、KOHでpH 4.0に調製した0.5%リンタングステン酸(TAAB)6 μl で1分間ネガティブ染色した。各溶液は濾紙片でその都度吸い取った。その後、グリッドをドライキーパー内で16時間以上乾燥した。透過型電子顕微鏡JEM 2000 EXにて観察し(加速電圧100 kV)、撮影画像中のGroEL/GroES複合体のうち、FePt-P. A.を内包する複合体の個数から粒子内包率を算出した。

DLS測定のため、DelsaMax PRO(ベックマン・コールター)を用い、調製したFePt-P. A.、GroEL/GroES/FePt P. A.、GroEL/GroESの粒径分布を分析した。

3. 結果

3.1 FePt - P. A. の平均粒径

透過型電子顕微鏡で撮影したFePt - P. A.は黒点として見え、視野上の粒子の粒径を統計処理したところ平均粒径は $3.99 \pm 1.00 \text{ nm}$ (S. D.)であった(Fig. 2)。

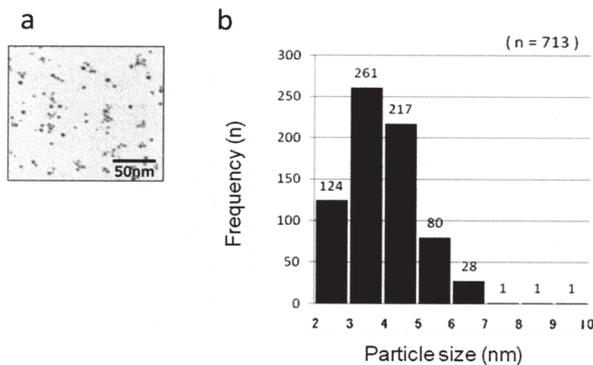


Fig. 2 Particle size analysis by TEM

(a) TEM image, (b) Particle size distribution.

3.2 FePt - P. A. の GroEL / GroES への内包条件

TEM観察により、丸、または楕円状に白く見えるGroEL/GroES複合体内部にFePt-P. A.の黒点が見られ、FePt-P. A.を内包したことが確認できた(Fig. 3)。FePt-P. A.は、水溶液中で粒子同士が凝集する傾向が観察されたが(Fig. 3a)、GroEL/GroES複合体に内包させることでグリッド上の分散性が良くなった。

FePt-P. A.とGroELを混合したのちGroES、ATPを追加した試料b(Fig. 3b)、FePt-P. A.とGroEL、GroESを同時に混合したのち、ATPを追加した試料d、f(Fig. 3d、f)の粒子内包率は順に84.4%、83.2%、95.4%であった。

GroES共存下でFePt-P. A.とGroELを混合した試料の粒子内包率が80%以上であるのに対し、FePt-P. A.とGroESの混合後にGroEL、ATPを追加した試料cは粒子内

包率が59.3%であった(Fig. 3c)。また、FePt-P. A.とBSAの混合後にGroEL、GroESを追加した試料eの粒子内包率は17.7%であった(Fig. 3e)。

3.3 DLS測定による水溶液中の粒径分布

DLS測定結果を、試料粒径の光散乱に基づく度数分布表としてFig. 4に示した。終濃度1.0 mg/mlとなるように水溶液中に懸濁したFePt-P. A.は、単独では平均粒径2195.4 nmを示し、1000 nm以上の粒塊を形成することがわかった(Fig. 4a)。また、GroEL/GroES複合体は平均粒径21.3 nmと1283.6 nmに2つのピークがあるが、大半は前者に属し(Fig. 4c)、これはX線結晶構造解析で解明されたGroEL/GroES複合体の大きさとほぼ一致していた(Fig. 1)。一方、FePt-P. A.を含むGroEL/GroES複合体試料では平均粒径207.7 nmに大きなピークを得た(Fig. 4b)。

4. 考察

今回使用したFePt-P. A.は平均粒径が約4 nmの粒子であり、GroELの直径約5 nmの空洞に入る適切な大きさであった。

TEM観察試料において最も粒子内包率が高かったのは、FePt-P. A.、GroEL、GroESを40分間ロータリーシェイカーで攪拌混合後にATPを添加した試料(Fig. 3f)で、その内包率は95.4%であった。また、GroELの2つの空洞のそれぞれに粒子を内包したフットボール型複合体も観察された(Fig. 3f 拡大図)。GroES存在下でGroELにATPを添加すると、GroELの空洞にはGroESの蓋がされ、空洞が閉じた空間となる。ATP添加前のFePt-P. A.とGroELの接触時間を増加することによって、GroELの空洞入り口付近へのFePt-P. A.粒子の結合が十分に起こり、GroEL/GroESへの粒子内包効率が向上すると考えられる。また、FePt-P. A.とGroELを、GroES非存在下(Fig. 3b)または存在下(Fig. 3d)で1分間ピペッティングで混合した後に、ATPを追加した試料のいずれの粒子内包率も80%以上であることが確認された。一方、FePt-P. A.を予めGroES(Fig. 3c)、あるいはBSA(Fig. 3e)と混合した後にGroEL、ATPを添加した場合、粒子内包率は著しく低下した。FePt-P. A.とGroESあるいはBSAの相互作用により、見かけ上の粒径が大きくなり、GroELへの内包を妨げた可能性が考えられる。

DLS測定では、予想に反して、FePt-P. A.を含むGroEL/GroES複合体試料において、GroEL/GroES複合体の長径20 nmの約10倍に相当する粒径ピークが得られた(Fig. 4b)。DLS測定は試料濁度が測定結果に影響を与えることから、測定中の余剰FePt-P. A.の凝集沈殿を軽減するために、試料濃度を1.0 μM GroEL / 2.0 μM GroES / FePt-P. A. (1.0 mg/ml)としており、高い粒子内包率を示したTEM観察試料(0.1 μM GroEL / 0.2 μM GroES / FePt-P. A. (10.0 mg/ml))とは組成が異なる。TEMの視野上では、FePt-P. A.を内包したGroEL/GroES複合体試料は余剰粒子と共に点在して観察されたが、

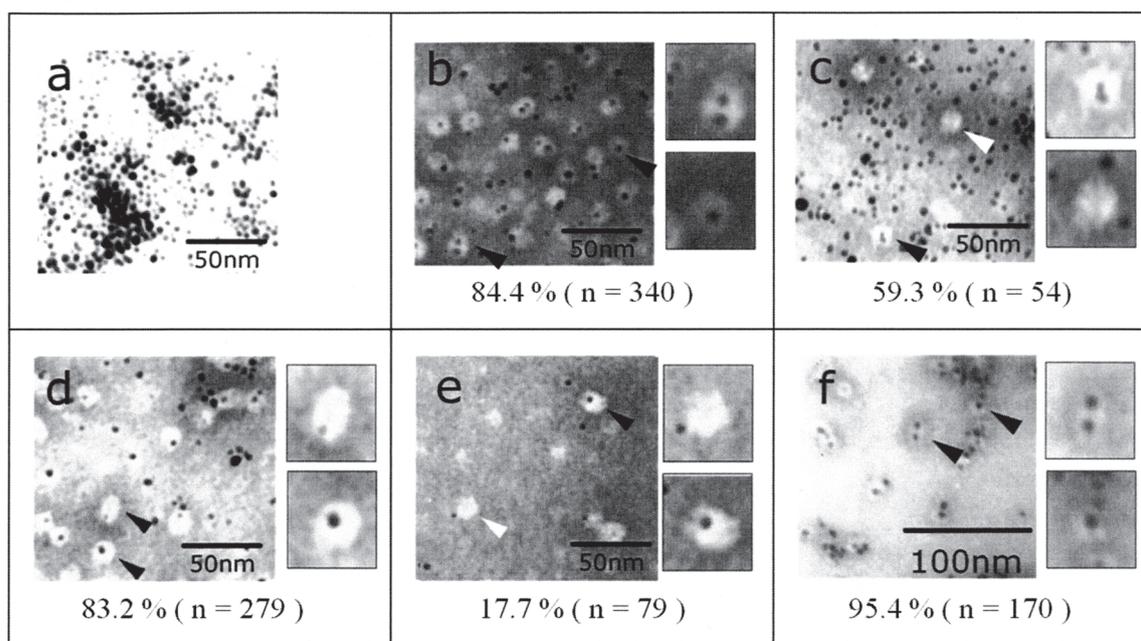


Fig. 3 TEM images of FePt - P. A. in GroEL / GroES complexes

(a) - (f) were formed according to the recipes in Table 1. (a) FePt - P. A., (b) GroEL / GroEL / FePt - P. A. → GroES, ATP, (c) GroES / GroES / FePt - P. A. → GroEL, ATP, (d) FePt - P. A. / GroEL / GroES → ATP, (e) BSA / FePt - P. A. → GroEL, GroES, ATP, (f) FePt - P. A. / GroEL / GroES → ATP. The Black arrow head shows FePt - P. A. encapsulated in GroEL / GroES complexes. The White arrow head shows empty GroEL / GroES complexes. The FePt - P. A. encapsulation percentage and the counted total number (n) of GroEL / GroES complexes on the TEM image are shown under the each sample.

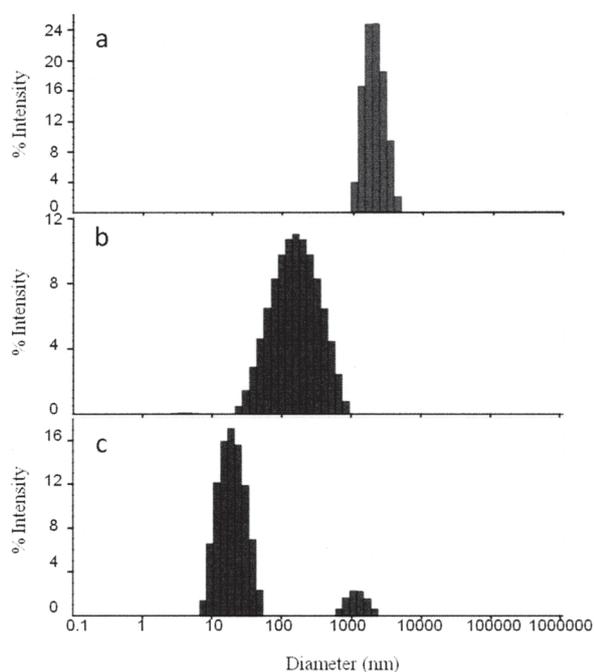


Fig. 4 Particle size analysis by DLS

(a) - (c) were formed according to the recipes in Table 2. (a) FePt - P. A., (b) GroEL / GroES / FePt - P. A., (c) GroEL / GroES.

TEM 試料にくらべて DLS 測定では FePt - P. A. 濃度が低いため、GroEL 同士が内包する FePt - P. A. を取り合ったか、FePt - P. A. を介して GroEL や GroEL / GroES 複合体の側面同士が付着して平均約 200 nm の粒塊を形成した可能性も考えられ

る。しかし、FePt - P. A. を水溶液中に分散するにあたり、GroEL / GroES 複合体への粒子内包によって FePt - P. A. 同士での凝集を妨げ、約 200 nm 以下の粒塊として存在させることは可能であると言える。

本実験により、分子の中にナノサイズの空間を形成する GroEL / GroES 複合体は、金属ナノ粒子を 90% 以上の高効率で内包することが可能であることが明らかとなり、半導体分野、医療分野で応用の裾野を広げられることが期待できる。

参考文献

- [1] 後藤祐児, 桑島邦博, 谷澤克行 編: タンパク質科学, 化学同人, (2005)
- [2] Z. Xu, A. -L. Horwich, P. -B. Sigler, The crystal structure of the asymmetric GroEL-GroES-(ADP)₇ chaperonin complex, *Nature*, **388**, 741, (1997)
- [3] T. Sameshima, T. Ueno, R. Iizuka, N. Ishii, N. Terada, K. Okabe, T. Funatsu, Football- and Bullet-shaped GroEL-GroES complexes coexist during the reaction cycle, *J. Biol. Chem.*, **283**, 23765, (2008)
- [4] A. Koike-Takeshita, M. Yoshida, H. Taguchi, Revisiting the GroEL-GroES Reaction Cycle via the Symmetric Intermediate Implied by Novel Aspects of the GroEL(D398A) Mutant, *J. Biol. Chem.*, **283**, 23774, (2008)

[5] 岩村秀 監訳, 廣瀬千秋 翻訳: ナノ粒子科学 基本原理から応用まで, 株式会社 NTS, (2007)

[6] T. Pradeep 著, 木村啓作, 八尾浩史, 佐藤井一 訳: ナノの本質 ナノサイエンスからナノテクノロジーまで, 共立出版株式会社, (2011)

[7] S. Sun, S. -B. Murray, D. Weller, L. Folks, A. Moser, Monodisperse FePt Nanoparticles and Ferromagnetic FePt Nanocrystal Superlattices, *Science*, **287**, 1989, (2000)