

## [研究論文] 金属ナノ粒子内包 GroEL 複合体整列の検討

## -- 分析電子顕微鏡システム利用研究成果、その XXV (2) --

依田ひろみ・小池あゆみ

博士後期課程応用化学・バイオサイエンス専攻

Approach for an alignment of chaperonin GroEL complexes  
encapsulating metal nano particles

--Research works accomplished by using Electron Microscope System: XXV(2)--

Hiromi Yoda, Ayumi Koike-Takeshita

## Abstract

Chaperonin GroEL is double ring structure which constructed with 14-mer of 57 kDa subunits. GroEL has two cavities to trap both newly polypeptides and denatured proteins, and folds them with co-chaperonin GroES and ATP. Both Asp-52 and Asp-398 in *E. coli* GroEL are important for ATP hydrolysis. The ATPase activity of GroEL(D52A/D398A) mutants was <0.01 % of wild-type GroEL. GroEL(D52A/D398A) formed a extremely stable symmetric football-shaped GroEL-GroES complex in the presence of ATP, with a half-time of ~150 h (~6 days). We applied GroEL(D52A/D398A) as a nano-sized capsule that could encapsulate metal nanoparticles in its two cavities, and tried to align GroEL(D52A/D398A) complexes encapsulating metal nano particles on the surface of a TEM grid.

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

## 1. 緒言

細胞内タンパク質の適切な折れ畳みを介助するシャペロニン GroEL は、真正細菌の可溶性画分に存在し、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。GroEL のリングの入口付近に基質タンパク質が結合し、GroEL の各サブユニットに ATP が結合すると、GroEL の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 5 nm 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<sup>1,2</sup>。

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<sup>1</sup>。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<sup>3,4</sup>、2 つのリングが同時に活性化されるダブル

ストロークモデルも近年提唱されている (Fig. 1)。

GroEL の ATP 加水分解に関わる Asp-52 と Asp-398 を Ala に置換した変異体 GroEL(D52A/D398A) (以後、GroEL<sup>D52A/D398A</sup>) は、ATP 加水分解活性が野生型の<0.01 %に低下しており、フットボール型複合体を 12 日以上 (半減時間は約 6 日) 維持することができる<sup>5,6</sup>。この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ルとして応用する可能性が考えられる。

近年、カーボンブラック、シリカ、二酸化チタン、酸化亜鉛、カーボンナノチューブ、カーボンナノファイバー、フラーレン、 dendrimer 等のナノ材料が注目され、応用されている<sup>7</sup>。しかし、金属ナノ粒子は表面積が大きいために粒子界面は常に外部からの影響を受けやすく、多くの場合、酸化や凝集を起こしやすい。これらの現象はナノ材料の特性を著しく損なうため、市販の金属ナノ粒子は合成時に脂肪酸やポリマーで表面修飾し、それに応じた溶媒に分散されている。一方、金属ナノ粒子の一時的な保持を目的に、自己組織化する生物分子をナノ粒子のテンプレートに利用する研究が行われており、生物分子としてシャペロニン<sup>8,9</sup>やフェリチン<sup>10</sup>を利用した報告がされている。単

一の構造をしたタンパク質に包んだ金属ナノ粒子であれば、そのタンパク質を密集させるだけで粒子を凝集することなく一定の間隔で配置でき、その後、レーザー照射によりタンパク質を除去することも可能である<sup>11,12</sup>。そこで我々は、金属ナノ粒子を GroEL/GroES 複合体に内包後、平面上に整列させることを試みた。

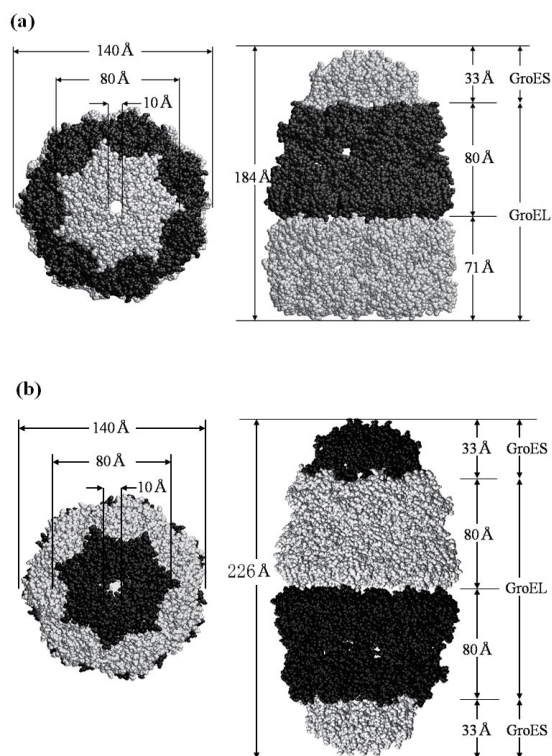


Fig. 1 GroEL/GroES 複合体の結晶構造

(a) 弾丸型複合体 (1AON)、(b) フットボール型複合体 (3WVL). 共に左が上から見た図、右が横から見た図。

## 2. 材料および方法

### 2.1 精製タンパク質の調製

GroEL<sup>52/398</sup> 変異体は既報<sup>4</sup>に従い精製した。GroEL<sup>52/398</sup> 精製画分は 65% 飽和硫酸沈殿として 4°C で保存した。使用の際は、沈殿を 20 mM HEPES/KOH、100 mM KCl、5 mM MgCl<sub>2</sub> (HKM 緩衝液、pH 7.5) に溶解し、PD-10 ゲル濾過カラム (GE ヘルスケア・ジャパン) で脱塩して実験に供した。以下、GroEL<sup>52/398</sup> を GroEL と表記する。

アミノ酸配列の C 末端に 6 個のヒスチジンを融合した C-end His<sub>6</sub>-GroES 変異体の発現には *pET C-end His<sub>6</sub>-GroES* 発現ベクターを用い、大腸菌 BL21 (DE3) の形質転換から疎水クロマトグラフィーによる精製までを GroEL 同様に行った。粗精製画分を 50 mM リン酸緩衝液 (pH 8.0) で透析し、イミダゾールが終濃度 10 mM になるように透析試料に加えた。10 mM イミダゾールを含む 50 mM リン酸緩衝液 (pH 8.0) で平衡化した Ni-NTA superflow 樹脂 (キアゲン) に試料を適用し、10 mM 及び 50 mM イミダゾールを含むリン酸緩衝液で順次洗浄し、250 mM イミダゾー

ルを含むリン酸緩衝液で C-end His<sub>6</sub>-GroES を溶出した。精製画分を GroEL 同様に保存し、実験に用いた。以下、C-end His<sub>6</sub>-GroES を GroES と表記する。

### 2.2 FePt ナノ粒子の合成

ピルビン酸修飾された白金鉄ナノ粒子 (FePt) の合成は、Sun らの方法を参照して行った<sup>13</sup>。得られた FePt 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。使用前に FePt ナノ粒子を 14,500 rpm で遠心し、上清除去後、アルコール洗浄を経て、pH 7.5 に調整した HEPES/KOH に分散した。透過型電子顕微鏡 (TEM) にて FePt ナノ粒子を観察し、視野上の 713 個の粒子の粒子径を測定したところ、平均粒子径は  $3.99 \pm 1.00$  (SD) nm であった。

### 2.3 FePt ナノ粒子内包 GroEL/GroES 複合体の調製

FePt ナノ粒子を 40 mg/ml となるように塩類を含まない HEPES/KOH (pH 7.5) に懸濁後、超音波クリーナーで 1 分間処理をして FePt ナノ粒子懸濁液を調製した。FePt ナノ粒子懸濁液と GroEL をマイクロチューブ内で 1 分間ピペティングにより混合した後、GroES、ATP を加えて HKM 緩衝液中で 1 μM GroEL/1 μM または 2 μM GroES/FePt (4 mg/ml)/1 mM ATP または ADP 条件下で FePt ナノ粒子内包 GroEL/GroES 複合体を作製した。FePt ナノ粒子を含まない GroEL/GroES 複合体も同様に作製した。

GroEL/GroES 複合体は、Amicon Ultra MWCO 100 kDa (メルク) を用い、10 mM イミダゾールを含む 50 mM リン酸緩衝液 (pH 8.0) に溶媒を置換すると共に遊離の GroES を除去した。Ni-NTA superflow 樹脂 (キアゲン) とマイクロチューブ内で一晚転倒混和した後、Ni-NTA 樹脂をスピンカラムに移し、10 mM または 50 mM イミダゾールを含むリン酸緩衝液で十分に洗浄し、250 mM イミダゾールを含むリン酸緩衝液で溶出した。

### 2.4 GroEL/GroES 複合体の SDS-PAGE

Ni-NTA で精製した GroEL/GroES 複合体溶液を、14% ポリアクリルアミドゲルを用いて SDS-PAGE で分析した。一緒に泳動した濃度既知の GroEL および GroES を Image J Ver. 1.46 で定量して検量線を作成し、GroEL/GroES 複合体中の GroEL および GroES のモル比を計算した。

### 2.5 結晶化試薬を用いた FePt ナノ粒子内包 GroEL/GroES 複合体の整列

Harris ら<sup>14</sup> の GroEL/GroES 複合体タンパク質の結晶化手法を参照し、GroEL/GroES 複合体の整列を検討した。GroEL/GroES 複合体試料の溶媒を 5 mM HEPES、10 mM KCl、0.5 mM MgCl<sub>2</sub> (pH 7.5) に置換し、GroEL/GroES 複合体濃度を 1.0~0.5 μM になるように調整した。KOH で pH 7.0 に調整した 1% モリブデン酸アンモニウム/0.2% PEG1500 を GroEL/GroES 複合体と等量混合し、透過型電子顕微鏡用のコロジオン支持膜付 Cu グリッド (イーエムジャパン) に 5 μl 滴下した。反転させたグリッドを室温で

静置し (ハンギングドロップ法)、10 ml 程度の超純水を入れたガラスビーカーの共存下でグリッドを自然乾燥した。乾燥後、5  $\mu$ l の超純水をグリッド表面にのせて直ちに濾紙で吸い取り、5  $\mu$ l の 0.5% リンタングステン酸/NaOH (pH 4.0) で電子染色した。グリッドをデシケーターで一晩乾燥後、TEM にて加速電圧 100 kV で試料を観察した。GroEL、FePt ナノ粒子懸濁液も同様に調製、観察した。

また、結晶化試薬混合前の FePt ナノ粒子内包 GroEL/GroES 複合体を観察するために、グリッドをイオンコーター IB-2 (エイコーエンジニアリング) にて 1400 V、3 mA、30 秒間グロー放電して親水化し、1 時間以内に試料をのせて電子染色後、TEM で観察した。

TEM は JEM 2000EX または JEM 2100 (共に日本電子) のいずれかを使用した。

### 3. 結果

#### 3.1 Ni-NTA 精製後の GroEL/GroES 複合体の GroES:GroEL 結合比

Ni-NTA カラムで精製後の GroEL/GroES 複合体の GroES/GroEL (mol/mol) の結合比は、ATP 存在下で GroEL:GroES を 1:2 で混合して複合体形成させたときに 1.8、ATP と FePt 存在下で GroEL:GroES を 1:2 で混合して複合体形成させたときには 1.4 を示し、1 つの GroEL に対して 1 つ以上の GroES の結合が維持されていることが分かった (Fig. 2, lane 1, 4)。また、ATP と FePt 存在下で GroEL:GroES を 1:1 で混合して複合体形成させたときに 0.8 (Fig. 5, lane 5) で、FePt を加えても弾丸型複合体の形成が確認できた。一方、ADP と FePt 存在下で GroEL:GroES を 1:1 で混合して複合体形成させたときに GroES/GroEL (mol/mol) の結合比は 0.3 で、同条件で FePt 非存在下では弾丸型複合体を形成しているのに比べ GroES の結合は大きく低下していた (Fig. 2, lane 3, 6)。

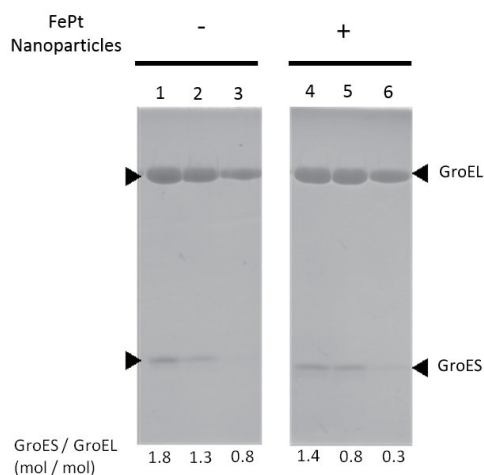


Fig. 2 GroEL/GroES 複合体の SDS-PAGE

Lane 1, 4 は GroEL:GroES=1:2 の混合比、Lane 2, 3, 5, 6 は GroEL:GroES=1:1 の混合比、Lane 1, 2, 4, 5 は ATP 存在下、Lane 3, 6 は ADP 存在下、Lane 1-3 はナノ粒子非存在下、Lane 4-6 は FePt ナノ粒子存在下で複合体を形成した。

#### 3-2. GroEL および GroEL/GroES 複合体の平面整列

結晶化試薬を混合せずに TEM グリッドに供した GroEL は分散して見え、GroEL のリング状構造が観察された (Fig. 3a)。一方、結晶化試薬を混合した試料では、部分的に密に並んだ GroEL が観察された (Fig. 3b)。

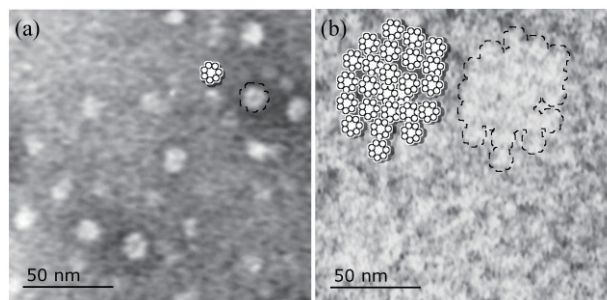


Fig. 3 結晶化試薬を用いて整列させた GroEL の TEM 像 JEM 2000EX にて撮影。(a) 結晶化試薬を含まない GroEL 試料、(b) 結晶化試薬を含む GroEL 試料。図中に、破線で囲んだ GroEL の模式図を示す。

FePt ナノ粒子内包 GroEL/GroES 複合体の平面整列に用いた結晶化試薬混合前の試料は、あらかじめ TEM で FePt 内包率 (FePt ナノ粒子を内包する GroEL/GroES 複合体の個数/視野中の GroEL/GroES 複合体の総数) を確認し、70.4% (n=71) であった (Fig. 4)。

結晶化試薬を用いて FePt ナノ粒子懸濁液をグリッド上で乾燥させると、粒子同士が集塊を形成した (Fig. 5a)。一方、FePt ナノ粒子内包 GroEL/GroES 複合体 (粒子内包率 70.4%) を乾燥させた場合は、黒点として観察される

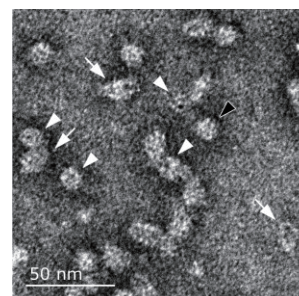


Fig. 4 整列前の FePt ナノ粒子内包 GroEL/GroES 複合体の TEM 像

JEM 2100 にて撮影。矢印(白): 転倒した粒子内包複合体、矢頭(白): 起立した粒子内包複合体、矢頭(黒): 起立した未内包複合体を示す。

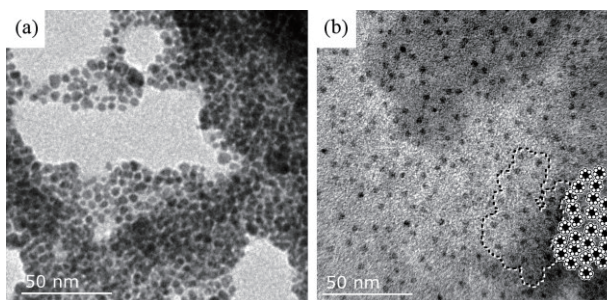


Fig. 5 結晶化試薬を用いて整列させた試料の TEM 像

(a) FePt ナノ粒子、(b) FePt ナノ粒子内包 GroEL/GroES 複合体

FePt ナノ粒子が視野中に分散していることが確認できた (Fig. 5b)。例えば、Fig. 5b で、破線で囲んだ部分の FePt ナノ粒子内包 GroEL/GroES 複合体の配列を図中に模式的に表した。次に、FePt ナノ粒子間の距離を 137 カ所測定したところ、平均粒子間距離は  $7.93 \pm 2.04$  (SD) nm であった (Fig. 6)。

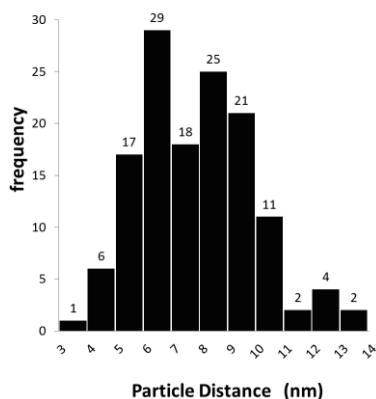


Fig. 6 FePt ナノ粒子内包 GroEL/GroES 複合体の整列後の FePt ナノ粒子間距離の度数分布表

#### 4. 考察

FePt を内包した GroEL/GroES 複合体を、GroES に結合させた His タグを利用して Ni-NTA カラムで精製したところ、FePt を内包し、かつ、GroES を 2 つ結合した GroEL 複合体 (フットボール型複合体) が約 70 % 程度存在した。この手法により、複合体形成後に遊離の GroES、GroEL を除き、GroEL/GroES 複合体を整列するために単離、濃縮できることを示した。

GroEL/GroES 複合体に内包された FePt ナノ粒子を結晶化法を利用して整列させた TEM 像では、視野中に粒子が分散して観察された。GroEL/GroES 複合体への内包により、FePt ナノ粒子を凝集させずに比較的等間隔で平面配置させることが可能であることを示せた。粒子間の平均距離は約 8 nm で、結晶構造で示されている GroEL リングの直径 13.7 nm よりも小さな値であった。これは、試料作成過程での急速な水分除去、真空条件下での観察、または GroEL/GroES 複合体が積層したことにより、GroEL リングが収縮したことによる可能性が考えられた。GroEL/GroES 複合体濃度、結晶化試薬の組成、乾燥条件による粒子間距離の調整が期待できる。

#### 5. まとめ

タンパク質の結晶化の手法を利用して整列させた GroEL/GroES 複合体は、部分的に密な整列状態が観察された。グリッド上での試料の乾燥条件を検討することで、より広範な二次元結晶化が期待できる。さらに、金属ナノ粒子間の電子授受が可能な 2-10 nm の距離を GroEL/GroES 複合体が間接的に提供できるかもしれない。

金属ナノ粒子内包 GroEL/GroES 複合体の整列は、導電性材料の構成方法により効率化を目指す半導体分野に貢献できる可能性がある。

#### 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, 291, (2005)
- [2] Z. Xu, A. -L. Horwich, P. -B. Sigler: The crystal structure of the asymmetric GroEL-GroES-(ADP)<sub>7</sub> 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] A. Koike-Takeshita, T. Arakawa, H. Taguchi and T. Shimamura: Crystal structure of a symmetric football-shaped GroEL · GroES2 complex determined at 3.8 Å reveals rearrangement between two GroEL rings. *J. Mol. Biol.*, **426**, 3634, (2014)
- [6] A. Koike-Takeshita, K. Mitsuoka, H. Taguchi: Asp52 in combination with Asp398 plays a critical role in ATP hydrolysis of chaperonin GroEL. *J. Biol. Chem.*, **289**, 30005, (2014)
- [7] 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, NTS, (2007)
- [8] R. -A. McMillan, C. -D. Paavola, J. Howard, S. -L. Chan, N. -J. Zaluzec and J. -D. Trent: Ordered nanoparticle array formed on engineered chaperonin protein templates. *Nature Materials*, **1**, 247, (2002)
- [9] 依田ひろみ, 小池あゆみ: シヤペロニン 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) --, *神奈川県工科大学研究報告*, **B**, 49, (2014)
- [10] I. Yamashita, K. Iwahori, S. Kumagai: Ferritin in the field of nanodevices. *Biochim Biophys Acta.*, **1800**, 846, (2010)
- [11] R. -C. Triulzi, Q. Dai, J. Zou, R. -M. Leblanc, Q. Gu, J. Orbulescu, Q. Huo: Photothermal ablation of amyloid aggregates by gold nanoparticles, *Coll. Surf. B: Biointerfaces*, **63**, 200, (2008)
- [12] Y. Guo, Z. Zhang, D. Kim W. Li, J. Nicolai D. Procissi, Y. Huan, G. Han, R. -A. Omary, A. -C. Larson: Photothermal ablation of pancreatic cancer cells with hybrid iron-oxied core gold-shell nanoparticles, *Int. J. Nanomedicine*, **8**, 3437, (2013)
- [13] S. Sun, S. -B. Murray, D. Weller, L. Folks, A. Moser: Monodisperse FePt Nanoparticles and Ferromagnetic FePt Nanocrystal Superlattices, *Science*, **287**, 1989, (2000)
- [14] J. -R. Harris, A. Pluckthun, R. Zahn: Transmission electron microscopy of GroEL, GroES, and symmetrical GroEL/ES complex, *J. Struct. Biol.*, **112**, 216, (1994)