

[研究論文] 様々な反応サイクル時間をもつ GroEL 変異体のデザイン

— 材料分析室利用研究成果、その XXIX(3) —

増田恵¹・依田ひろみ^{1, 2}・小池あゆみ^{1, 2}

1 バイオメディカル研究センター

2 博士後期課程応用化学・バイオサイエンス専攻

Design of GroEL mutants with various reaction cycle time

-- Research works accomplished by using materials analysis facilities:XXIX(3)--

Megumi Masuda¹, Hiromi Yoda^{1,2}, Ayumi Koike-Takeshita^{1,2}

Abstract

The chaperonin GroEL is an essential multisubunit assemblies that promotes facilitated protein folding in concert with ATP hydrolysis. The *Escherichia coli* GroEL consists of 14 identical subunits arranged in two heptamer rings. Each ring contains a central cavity and the two rings are stacked back-to-back. GroEL and its cofactor, GroES, form a nano-cage for a single molecule of substrate to fold, and undergo an ATP-regulated interaction cycle to close and open the folding cage. Asp52 and Asp398 in GroEL are known as the critical residues on ATP hydrolysis because GroEL(D52A/D398A) mutant is severely deficient in ATP hydrolysis but not in ATP binding. Here, we investigated the functional role of another amino acid residues facing towards the nucleotide-binding pocket in the crystal structure of GroEL. A series of ATP hydrolysis mutants of GroEL, in which reaction cycle time is 8-sec ~ 6-days, have been constructed for application to DDS carrier.

Keywords: GroEL, GroES, Chaperonin, ATP hydrolysis

1. 緒言

大腸菌のシャペロニン GroEL/GroES は、細胞内の全可溶性タンパク質の約 15% のフォールディングを介助するタンパク質である^[1]。GroEL は 57 kD のサブユニット 7 つからなるリングが背中合わせに 2 つ重なった 14 量体構造 (総分子量 ~ 800 kD) を形成している (Fig. 1A)。GroEL で囲まれたリング内部にはそれぞれ直径約 45 Å の空洞があり、2 つの空洞はつながってはいない。一方、GroES は 10 kD のサブユニット 7 つからなる帽子のような構造をしている。GroEL は ATP 加水分解を伴って、GroES を蓋のように結合し、閉鎖された空洞内に変性ポリペプチドを閉じ込めて、凝集を防ぎながらフォールディングする^[2,3]。

GroEL の反応機構では、空洞の入り口付近に変性ポリペプチドが結合し、続いて、各リングに 7 つの ATP が結合すると、オープン型に構造変化した GroEL に GroES が結合し、ポリペプチドはリングの空洞内に落とし込まれる。ATP が ADP に加水

分解されると、GroES は解離し、それと同時に ADP と中に閉じこめられていたポリペプチドも放出される。1 分子の GroEL に 1 分子の GroES が結合した弾丸型複合体を反応中間体とした反応サイクルでは、GroEL の 2 つのリングは交互にはたっているが (Fig. 2A)、1 分子の GroEL に 2 分子の GroES が結合したフットボール型複合体を経由する反応サイクルでは、GroEL の 2 つのリングが同時にはたらく (Fig. 2B)^[4,5]。変性タンパク質存在下でフットボール型複合体の形成が促進されることから、シャペロニンが細胞内で 2 つの反応経路を使い分けていると示唆される^[6]。

ATP が加水分解して ADP になるまでの時間 (野生型 GroEL では約 8 秒) が 1 反応サイクルの時間を制御しているため、ATP の γ リン酸近傍に配置しており ATP 加水分解に重要な Asp52 と Asp398 を共に Ala に置換した GroEL^{D52A, D398A} 変異体では、GroEL/GroES 複合体の半減期が約 6 日になっていた^[5]。そこで、Asp52、Asp398 に加え、ATP 結合部位近傍に位置する Lys51、Asp87、Asp495 の GroEL 変異体を作製し (Fig.

1B)、シャペロン活性を解析して各アミノ酸残基の ATP 加水分解反応における役割を考察した。GroEL/GroES 複合体は、不安定な分子を内包して保護し、一定時間後に放出することが可能なタンパク質性ナノカプセルであるため、ドラッグデリバリーシステム (DDS) のキャリアとして応用が期待できる^[7,8]。内包物の放出時間を変えるために様々な反応サイクル時間をもつ GroEL 変異体をデザインすることを目的としている。

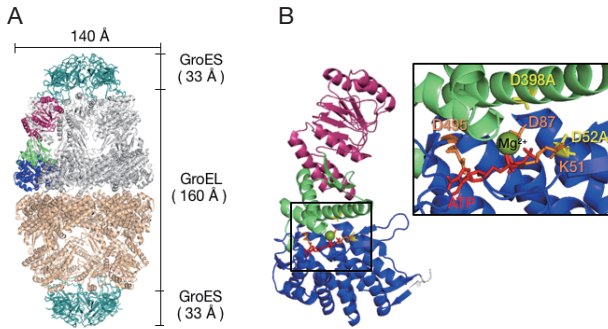


Fig. 1 Crystal structure of the symmetric *E. coli* GroEL^{D52A, D398A}/GroES₂ complex.

(A) Overall structure (PDB code: 3WVL), (B) The structure around the nucleotide binding site of the GroEL subunit from GroEL^{D52A, D398A}/GroES₂-ATP₁₄ complex.

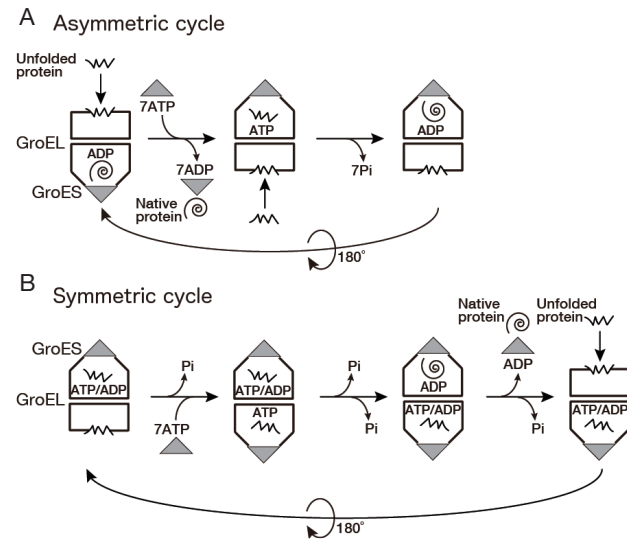


Fig. 2 Schematic model for the GroEL/GroES reaction cycle.

Models of the asymmetric (A) and symmetric (B) reaction cycle.

2. 材料および方法

2.1 GroEL 変異体発現ベクターの作製とタンパク質精製

GroEL 遺伝子への部位特異的変異導入およびクローニングには、*E. coli* JM109 または DH5 α を使用した。GroEL (D87A) 変異体遺伝子の作製ではまず、GroEL 遺伝子内部の NheI 認識部位に相同な F primer (5' - AGAAGGAGATATACATATGGCTAGC) と D87A 変異を含む D87A R

primer (5' -GGTGGTACCGcGCCTGCAGCGTC)、D87A F primer (5' -GACGCTGCAGGCGcCGGTACCACC) と GroEL 遺伝子内部の ClaI 認識部位下流に相同な R primer (5' - ATTGCAGCTTCTTACCCAGCCATC) のそれぞれの組合せで、PCR により遺伝子断片を増幅した。各 PCR 産物の混合物を鋳型に、F primer と R primer で PCR を行い、GroEL (D87A) 変異体遺伝子断片を得た。野生型 GroEL の発現ベクターである *pET-EL*^[4] の NheI-ClaI 領域を GroEL (D87A) 変異体遺伝子断片の NheI-ClaI 領域と組み換えて、*pET-EL (D87A)* を作製した。その他の各種 GroEL 変異体遺伝子の作製は、QuikChange site-directed mutagenesis 法を用いた。*pET-EL* を鋳型として、目的変異をもつ各種 F primer と R primer で Pfu Turbo DNA Polymerase (Agilent) で PCR を行った。また、二種の変異をもつ GroEL 遺伝子は、それぞれの変異体遺伝子発現ベクターの HindIII-ClaI 領域を組み換えて作製した。各種 GroEL 変異体は、既報に従い、培養菌体から Butyl-Toyopearl (TOSOH)、SephacroseCL-4B (GE Healthcare) を用いて精製した。精製タンパク質は 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 MgCl₂ (HKM 緩衝液、pH 7.5) に溶解し、PD-10 Desalting Columns (GE ヘルスケア・ジャパン) で脱塩して実験に供した。

各種変異体の作製に用いたプライマーを表 1 に示した。

2.2 ATP 加水分解活性の測定

GroEL からの ADP の放出を、ATP 再生系を用いて分光学的に測定した。HKM 緩衝液 (20 mM HEPES-KOH (pH 7.5)、100 mM KCl、5 mM MgCl₂) に、0.2 μ M または 1 μ M GroEL、0.2 mM NADH、5 mM phosphoenolpyruvate、100 μ g/ml pyruvate kinase、100 μ g/ml lactate dehydrogenase、5 mM DTT を加え、反応溶液とした。攪拌している反応溶液中に ATP (終濃度 1mM) を添加して加水分解反応を開始し、NADH の減少に起因する 340 nm での吸光度の減少を、分光光度計を用いて連続的に測定した。反応開始から 150 秒後に、0.6 μ M GroES を添加した。

2.3 GroEL/GroES 複合体結合ヌクレオチドの定量

GroEL 変異体の複合体に結合したヌクレオチドを分析するために、2 μ M GroEL、6 μ M GroES、5 mM DTT、1 mM ATP を HKM 緩衝液に加え、5 分間静置した。反応液を、TSK-GEL G3000SW_{XL} ガードカラム (TOSOH) の 3 連結ゲルろ過クロマトグラフィー (25 mM HEPES/KOH (pH 7.0)、100 mM Na₂SO₄、5 mM MgSO₄) を用いて迅速に分離し、複合体を単離した。分取した GroEL 複合体を含む溶液を一定時間毎に抜き取り、24% PCA を加えた。その上清を 0.5 M K₂CO₃ で中和し、TSK-GEL ODS-80Ts (TOSOH) 逆相クロマトグラフィー (100 mM リン酸ナトリウム (pH 6.9)) で ATP と ADP に分離し、Abs₂₆₀ のピークを解析した。ヌクレオチドの量はピーク面積によって計算し、濃度既知のヌクレオチドを用いて校正した。

Table 1 Mutants generated in this study and primer sequences.

変異名	発現ベクター名	プライマー名	プライマー配列 (小文字は変異)
K51A	pET-EL(K51A)	ELK51A For ELK51A Rev	CCGACCATCACCgcAGATGGTGTTCGG CGGAAACACCATCTgcGGTGTGGTCGG
K51D	pET-EL(K51D)	ELK51D For ELK51D Rev	CCGACCATCACCgAcGATGGTGTTCGG CGGAAACACCATCgTcGGTGTGGTCGG
D52A	pET-EL(D52A)	D52A F D52A R	CCATCACCAAAGcTGGTGTTCGG CGGAAACACCAgCTTTGGTGTGG
D52E	pET-EL(D52E)	ELD52E For ELD52E Rev	CCGACCATCACCAAAGaGGTGTTCGG CGGAAACACCAcTCTTTGGTGTGGTCGG
D52K	pET-EL(D52K)	ELD52K For ELD52K Rev	CCATCACCAAaAaGGTGTTCGG CGGAAACACCAcTtTTTGGTGTGG
D52N	pET-EL(D52N)	ELD52N For ELD52N Rev	CCATCACCAAaATGGTGTTCGG CGGAAACACCAcTtTTTGGTGTGG
D52S	pET-EL(D52S)	ELD52S For ELD52S Rev	CCATCACCAAagTGGTGTTCGG CGGAAACACCAcTtTTTGGTGTGG
D87A	pET-EL(D87A)	D87A F D87A R	GACGCTGCAGGCGcCGGTACACC GGTGTACCGgCGCCTGCAGCGTC
D398E	pET-EL(D398E)	ELD398E-For2 ELD398E-Rev2	AAAAGCACGCGTTGAAGAgGCCtTGCACG CGTGCAaGGCcTCTTCAACGCGTGCTTTT
D398N	pET-EL(D398N)	ELD398N-For ELD398N-Rev	AAAAGCACGtGTTGAAaATGCCCTGCACG CGTGcAGGGcATtTTCAACaCGTGCTTTT
D398S	pET-EL(D398S)	D398S F D398S R	GCACGCGTTGAAtcTGCCCTGCACGCG CGCGTGcAGGGcAgaTTCAACGCGTGc
D495A	pET-EL(D495A)	ELD495A-For ELD495A-Rev	GGGTATCCTGGcgcCCAACCAAG CTTTGTTGGcgcCCAGGATACCC

2.4 基質フォールディング活性の測定

1 μM GroEL、2 μM Rhodanese、20 mM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 、1 mM DTT、220 mM Glucose を HKM buffer に添加し、60°C で 15 分間加熱した。2 μM GroES と 1 mM ATP を加えて反応を開始し、一定時間毎に反応液 5 μL を分取して、100 mM KH_2PO_4 、150 mM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 、1 mM EDTA を含む 750 μL の溶液に添加した。Rhodanese 活性の回復率は、 Fe^{3+} のチオシアン酸化合物が示す 460nm の吸光度によって比色測定した^[4]。

2.5 ゲル濾過による GroES 結合試験

HKM Buffer に 0.5 μM GroEL、Cy3 ラベルした 0.25 μM GroES (GroES^{Cy3})、5 mM DTT、1 mM ATP を混合して、25°C で 5 分間静置した後、ゲル濾過 HPLC カラム (G3000SW_{XL}、TOSOH) で分析した。20 mM HEPES/KOH (pH 7.4)、10 mM KCl、5 mM MgCl_2 、100 mM Na_2SO_4 (記載がある場合は、1 mM ATP を含む) で平衡化したカラムに反応液を注入し、Cy3 の蛍光強度 (Ex. 550 nm/Em. 570 nm) のスペクトルから、GroEL と GroES の結合を解析した。

2.6 GroEL 変異体の透過型電子顕微鏡観察

0.5 μM GroEL を、イオンコーター IB-2 (EIKO) にてブ

ラズマ処理 (1400 V、3 mA、30 秒) した透過型電子顕微鏡 (TEM) 用コロジオン支持膜付グリッドに 5 μL 滴下した。グリッド上で 1 分間保持後、超純水で 2 回洗浄し、5 μL の 0.5% リンタンングステン酸/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、透過型電子顕微鏡 JEM2100 (日本電子) にて加速電圧 100 kV で観察した。

3. 結果

3.1 ATP 加水分解に重要な新たなアミノ酸残基の探索

E. coli GroEL の ATP 結合部位近傍 (Fig. 1B) に位置する Lys51、Asp87、Asp495 を Ala に置換した GroEL 変異体 (GroEL^{K51A}、GroEL^{D87A}、GroEL^{D495A}) を作製し、タンパク質を精製した。各種変異体のシャペロニン活性を測定し、ATP の加水分解活性は低下するが、ATP は結合し、GroES 結合や基質タンパク質のフォールディング活性は野生型と同等に保持することが既知の GroEL^{D52A}、GroEL^{D398A}、GroEL^{D52A, D398A} と比較した^[5]。

GroEL^{K51A}、GroEL^{D87A}、GroEL^{D495A} はいずれも ATP 加水分解活性が低下し、それぞれ野生型 GroEL の約 25%、2%、2%

の活性を示したことから (Fig. 3)、Lys51、Asp87、Asp495 が GroEL の ATP 加水分解にとって重要なアミノ酸残基であることを示している。しかし、GroEL^{K51A} の ATP 加水分解活性は、GroEL^{D52A} のおよそ 2 倍であり、その他の変異体と比較して劇的な活性の減少はみられなかった。

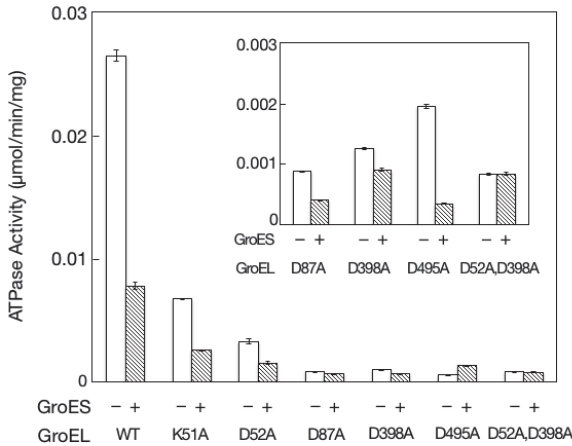


Fig. 3 ATP hydrolysis activity of GroEL mutants.

Inset, mutants with particularly low activity were measured in assay solutions containing 5 volumes of GroEL.

次に、ATP による GroEL 変異体と Cy3-GroES の複合体形成を HPLC ゲル濾過クロマトグラフィーで解析した。溶解液に ATP を含まない場合には、GroEL^{D52A, D398A} では GroEL/GroES 複合体に相当する 12.5 分に Cy3 の蛍光によるピークが観察できるのに対し、GroEL^{K51A}、GroEL^{D87A}、GroEL^{D495A} は、7 量体 GroES の分子量に相当する 17 分の位置に蛍光シグナルを検出した (Fig. 4A)。しかし、溶解液に 1 mM ATP を加えた場合には、GroEL^{K51A} では GroEL/GroES 複合体のピークが現れた。一方、GroEL^{D87A} と GroEL^{D495A} は GroES を結合しなかった。透過型電子顕微鏡 (JEM2100) の観察像では、すべての変異体で 14 量体オリゴマー構造を上から観察したリング構造を示していたことから (Fig. 4B)、GroEL^{D87A} と GroEL^{D495A} が GroES を結合しないのは ATP の結合ができないからだと予想した。

そこで、GroEL 依存性の高いフォールディングを行うことが知られている Rhodanese を基質タンパク質に用いて、GroEL 変異体のシャペロン活性を測定した。GroEL^{K51A} は、GroEL^{WT} の約 75% のフォールディング活性を維持していたが、GroEL^{D87A} と GroEL^{D495A} はフォールディング活性を全く示さなかった (Fig. 5)。これらの結果から、GroEL^{K51A} は ATP の結合は弱い、ATP を介して GroEL/GroES 複合体内への基質タンパク質の閉じ込め機能が正常であることが示された。一方、GroEL^{D87A} と GroEL^{D495A} は ATP 結合ができず、GroES が結合しないためにシャペロン活性をもたなくなっていることが示唆された。従って、Asp87 と Asp495 は ATP 結合に重要なアミノ酸残基であるといえた。

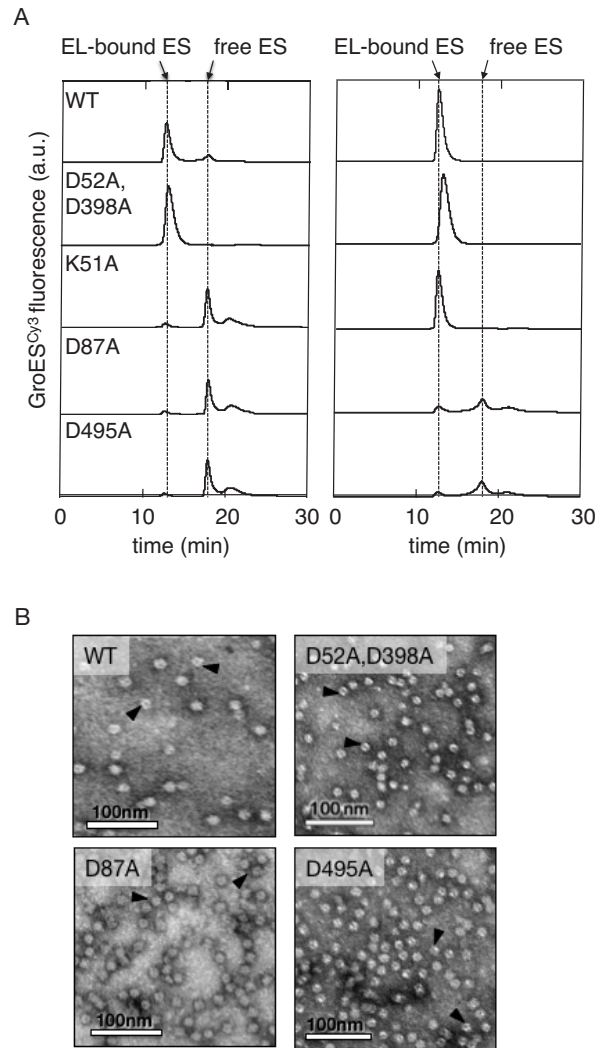


Fig. 4 ATP-dependent formation of GroEL/GroES complex using GroEL mutants.

(A) Binding of Cy3-GroES to the GroEL mutant/ATP analyzed by gel filtration HPLC in the absence (*left*) or presence (*right*) of ATP. (B) Electron micrograph of the GroEL mutant arranged in heptamer ring.

3.2 様々な反応サイクル時間をもつ GroEL 変異体

GroEL への ATP の結合には影響せず、ATP の加水分解に重要な Asp52 と Asp398 を様々なアミノ酸に置換し、さらにそれらを組み合わせた二重変異体を作製して、シャペロン活性を測定した。作製した Asp52 と Asp398 の変異体のすべては ATP 加水分解活性を示し、GroES を結合し、Rhodanese のフォールディング活性を GroEL^{WT} と同等に保持していた (Table 2)。ただし、ATP 加水分解が非常に遅い変異体 (GroEL^{D52A, D398N}、GroEL^{D52S, D398N}、GroEL^{D52N, D398A}、GroEL^{D52K}) の場合には、ATP 再生系を用いた ATP 加水分解活性測定では、精製タンパク質中にわずかに含まれる夾雑タンパク質の ATP 加水分解活性の影響が大きく、真の加水分解活性は測定できない。そこで、GroEL/GroES 複合体を分取し、結合ヌクレオチド中の ATP と ADP の比率の変化を経時的に分析し、定量した (Fig. 6)。ATP 加水分解活性

Table 2 Functional analysis of GroEL mutants

Mutant	ATPase activity		Nucleotide binding	GroES binding	Folding activity (%)	Cycle time
	ES (-) (U/mg)	ES (+) (U/mg)				
WT	2.64E-02	7.79E-03	-	+	100	17 s
K51A	6.78E-03	2.60E-03	↓	↓/+*	74	-
K51D	1.80E-03	3.63E-03	↓	↓/+*	4	-
D52A	3.27E-03	1.52E-03	-	+	100	70 s
D52E	2.39E-03	5.55E-04	+	+	80	3.3 h
D52K	1.52E-03	9.37E-04	+	+	96	> 288 h
D52N	6.42E-04	1.63E-03	+	+	100	40 m
D52S	1.56E-03	1.32E-03	-	+	100	150 s
D87A	8.23E-04	6.89E-04	↓	↓/↓*	2	-
D398A	1.00E-03	6.73E-04	+	+	88	60 m
D398E	3.44E-04	3.87E-04	+	+	79	4 h
D398N	1.74E-03	2.06E-04	-	+	78	270 s
D398S	9.00E-04	2.50E-04	+	+	95	> 60 m
D495A	5.90E-04	1.29E-03	↓	↓/↓*	4	-
D52A,D398A	8.16E-04	7.82E-04	+	+	100	288 h
D52A,D398N	4.95E-04	3.38E-04	+	+	76	5.6 h
D52E,D398N	3.20E-05	4.02E-04	+	+	98	2.6 h
D52N,D398A	3.68E-04	4.97E-05	+	+	100	160 h
D52N,D398N	4.57E-04	5.21E-04	+	+	93	5 h
D52N,D398S	9.30E-04	2.98E-04	+	+	81	240 h
D52S,D398A	4.99E-04	4.63E-04	+	+	83	168 h
D52S,D398N	2.69E-04	6.73E-05	+	+	95	30 h

+ : normal; ↓ : reduced; - : not detected; * : presence of 1 mM ATP. In Cycle time column, *s* (sec), *m* (min), *h* (hour).

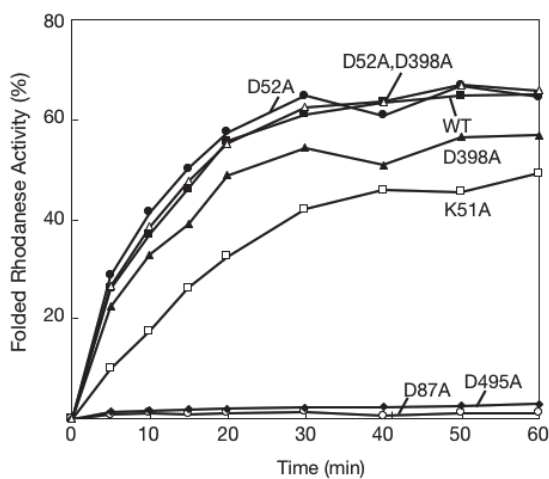


Fig. 5 GroEL-assisted folding of rhodanese.
Time course of recovery of rhodanese activities is shown. Activity is expressed as the fraction of the native rhodanese activity.

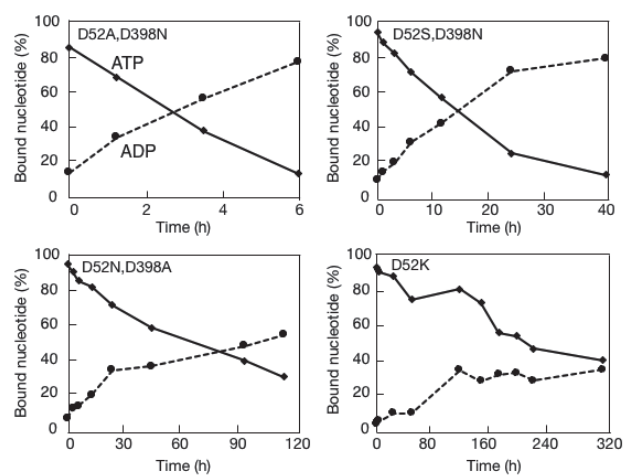


Fig. 6 Time course of ATP hydrolysis by the isolated GroEL/GroES complex.
The ratio of ATP or ADP to the total nucleotide bound to the GroEL/GroES complexes is shown.

から反応サイクル時間を計算したところ、多くの変異体は1サイクルが6時間以内であったが、GroEL^{D52S, D398N}は1日、GroEL^{D52N, D398A}とGroEL^{D52S, D398A}は6日、GroEL^{D52N, D398S}は10日、GroEL^{D52K}は12日以上、GroEL/GroES複合体を維持することが明らかとなった (Fig. 6, Table 2)。

4. 考察

GroELのアミノ酸残基がシャペロニン活性に果たす役割はこれまでも解析されてきており、Asp52とAsp398がATPのγリン酸の引き抜きに重要なアミノ酸であることは知られている^[5]。Asp52とAsp398は相補的に働くと考えられ、片方だけの変異では反応サイクル時間はより遅いGroEL^{D398A}でも～2時間である。その二重変異体GroEL^{D52A, D398A}は反応サイクル時間が著しく延長されるが(約12日)、興味深いことにATP結合、GroES結合、基質フォールディングなどのシャペロニン活性には影響は無い。本研究で作製したGroEL^{D52K}は、1カ所の変異で反応サイクル時間が12日以上であることが明らかになったが、そのほかのシャペロニン活性はやはり影響がなかった。それに対し、Asp87とAsp495はATPの結合に重要であるため、その変異体はATPの結合に寄って始まるすべてのシャペロニン活性を失うことがわかった。これまでのシャペロニンの研究で、Asp87変異体は基質を結合して解離しない“Trap mutant”として使用されてきたが^[9]、その性質の理論的な説明はされてこなかった。Lys51は、ATP結合に関わるがAsp87、Asp495よりは重要性が低い (Fig. 7)。

本研究により、様々な反応サイクル時間でATP加水分解が終了し、GroESが解離する(蓋が開く)GroEL変異体ライブラリーを作製することができた (Fig. 8)。タンパク質性ナノカプセルとしてDDSへの応用が期待できる。

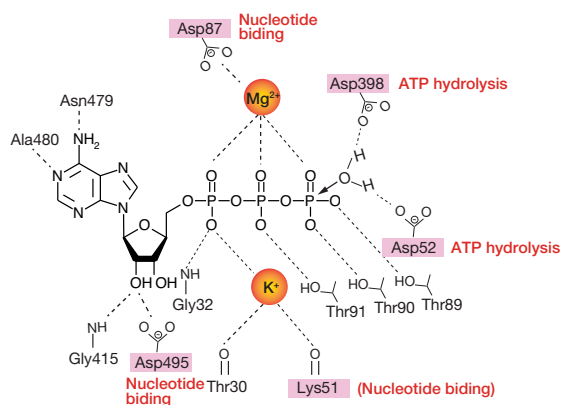


Fig. 7 Role of amino acid residues arranged around ATP.

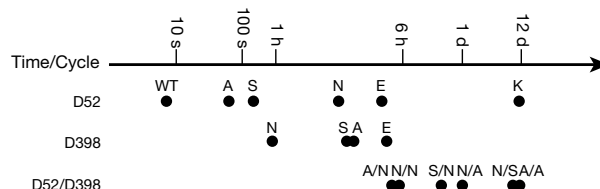


Fig. 8 GroEL mutant library with various reaction cycle time.

In Time/Cycle, *s* means second, *h* means hour and *d* means day.

参考文献

- [1] 小池あゆみ、田口 英樹: 「分子シャペロン」, 『タンパク質科学-構造・物性・機能』後藤祐児・桑島邦博・谷澤克行 (編), 化学同人, 291-302, (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] A. Koike-Takeshita, T. Arakawa, H. Taguchi and T. Shimamura: Crystal structure of a symmetric football-shaped GroEL:GroES₂-ATP₁₄ complex determined at 3.8 Å reveals rearrangement between two GroEL rings. *J. Mol. Biol.*, **426**, 3634, (2014).
- [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, 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).
- [6] R. Iizuka, T. Funatsu: Chaperonin GroEL uses asymmetric and symmetric reaction cycles in response to the concentration of non-native substrate proteins. *Biophysics and physicobiology.*, **13**, 63, (2016).
- [7] 小池あゆみ、田口英樹, “シャペロニン変異体およびこれをコードするDNA”, 特許第 5540367 号, 2010.
- [8] 小池あゆみ、山本修、依田ひろみ, “シャペロニン複合体及びその製造方法”, 特許 6099069 号, 2013.
- [9] F. Motojima, Y. Motojima-Miyazaki, M. Yoshida: Revisiting the contribution of negative charges on the chaperonin cage wall to the acceleration of protein folding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **109**, 15740, (2012).