

[研究論文] Asp⁷³とAsp⁴²⁰は酵母ミトコンドリア Hsp60 の ATP
加水分解に重要な役割を果たす
— 材料分析室利用研究成果、その XXXI (1) —

増田恵¹・村越のどか²・依田ひろみ¹・小池あゆみ^{1, 2}

1 バイオメディカル研究センター
2 博士前期課程応用化学・バイオサイエンス専攻

Asp⁷³ and Asp⁴²⁰ play a critical role in ATP hydrolysis
of yeast mitochondrial Hsp60

-- Research works accomplished by using materials analysis facilities: XXXI(1)--

Megumi Masuda¹, Nodoka Murakoshi², Hiromi Yoda¹, Ayumi Koike-Takeshita^{1,2}

Abstract

Type I chaperonins (Cpn60/Hsp60) are essential proteins that mediate the correct folding of newly translated and stress-denatured proteins in bacteria, chloroplast and mitochondria. Despite the high sequence homology among chaperonins, there are some critical differences at the mechanistic level between the bacterial and the mitochondrial chaperonins with respect to their oligomeric state and their ability to function with co-chaperonins from different sources. Asp⁵² and Asp³⁹⁸ in *Escherichia coli* chaperonin 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, yeast mitochondria Hsp60 (mHsp60) and *Thermus thermophilus* Hsp60 (TCpn60) were used to investigate the functional commonality of these two well-conserved Asp in ATP hydrolysis. These residues in GroEL correspond to Asp⁷³ and Asp⁴²⁰ in mHsp60 and to Asp⁵¹ and Asp³⁹⁶ in TCpn60, respectively. We found that ATPase activity of mHsp60^{D73A} and mHsp60^{D420A} mutants were ~20% and < 4% of wild type, respectively, indicating that functional commonality of two Asp was shown in yeast mHsp60, despite suggesting different roles of Asp⁵¹ in TCpn60, surprisingly.

Keywords: GroEL, Hsp60, Chaperonin, ATP hydrolysis

1. 緒言

真正細菌の可溶性画分に存在するシャペロニン (GroEL, Cpn60, Hsp60) は、真核生物のミトコンドリア、植物の葉緑体などに存在する Hsp60 とともに I 型シャペロニンファミリーに分類される。その機能は、コシャペロニン (GroES, Cpn10, Hsp10) とともに、新生ポリペプチドや変性タンパク質の凝集を阻止し、正しい立体構造形成 (フォールディング) の介助をすることである。

I 型シャペロニンの構造や反応機構に関する研究の大部分は、安定性が高い大腸菌のシャペロニン (GroEL/GroES) システムを用いて進められてきた。大腸

菌の GroEL/GroES は、細胞内に存在する膜タンパクを除く約 2500 種の可溶性タンパク質の 10~15% を基質とする生命活動に必須のタンパク質である。GroEL は 57 kD のサブユニット 7 つからなるリングが 2 つ重なった安定な 14 量体構造 (総分子量 ~800 kD) をもち、GroEL で囲まれたリング内部にはそれぞれ直径約 45 Å の空洞がある [1]。GroEL が ATP の加水分解を伴って GroES を蓋のように結合すると、閉鎖された空洞内に変性ポリペプチドが閉じ込められてフォールディングする [2]。ATP が ADP に加水分解されると GroES は GroEL から解離し、ADP とポリペプチドも放出され、この一連の反応サイクルが 2 つのリングで繰り返される。反応中間複合体には、1 分子の GroEL に 1 分子の GroES が結合した弾丸型複合体 (GroEL/GroES₁)

と、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 (GroEL/GroES₂) が知られており (Fig. 1A)、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、細胞内の変性タンパク質濃度に応じて使い分けしていると示唆される [3]。GroEL/GroES 弾丸型複合体の結晶構造は大腸菌や *Thermus thermophilus* (Fig. 1B) などで決定されているが、フットボール型複合体は最近になって大腸菌 GroEL/GroES とヒトミトコンドリア Hsp60/Hsp10 で決定された (Fig. 1C) [4, 5]。真核生物のミトコンドリア Hsp60/Hsp10 は、立体構造は大腸菌由来のものによく似ているが、オリゴマー状態やコシャペロニン選択性の高さなど反応機構の違いが指摘されている。

シャペロニンの反応機構では、ATPの加水分解時間が1反応サイクルの時間を制御しており、野生型 GroEL (GroEL^{WT}) では約8秒である。GroELの結晶構造でATPのγリン酸近傍にある 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日に延長され、ATPの加水分解活性は低下するが、ATP結合、GroES結合と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していた [6]。GroELの2つのアスパラギン酸残基のATP加水分解における重要性が、I型シャペロニンに広く共通であるのか検証するために、酵母ミトコンドリア Hsp60 (mHsp60) および *T. thermophilus* Hsp60 (TCpn60) の相当するアミノ酸変異体を作製し (それぞれの GroEL との相同性は 53% および 60%)、シャペロニン活性を解析した。

2. 材料および方法

2.1 Hsp60 変異体発現ベクターの作製とタンパク質精製

各種変異体の作製に用いたプライマー配列および作製した発現ベクターを Table 1 に示した。シグナル配列 (1~21 番目まで) を除去した酵母 mHsp60 の発現ベクター *pET21c(+)* yeast *mtCpn60* (22S-) を鋳型とし、Pfu Turbo DNA Polymerase (Agilent) を用いた QuikChange site-directed mutagenesis 法にて Asp⁷³ と Asp⁴²⁰ を Ala にそれぞれ置換した発現ベクター *pET-mtCpn60* (D73A) および *pET-mtCpn60* (D420A) を作製した。*pET-mtCpn60* (D73A) を鋳型として同様に QuikChange site-directed mutagenesis 法にて Asp⁷³ と Asp⁴²⁰ の二重変異体の発現ベクター *pET-mtCpn60* (D73A/D420A) を作製した。*E. coli* Rosetta (DE3) で発現させたライセート上清から、変異型 mHsp60 を Butyl-Toyopearl (TOSOH)、Sephacryl CL-4B (GE Healthcare) を用いて精製した。

T. thermophilus 由来 TCpn10 遺伝子と TCpn60 遺伝子を含む *pRCC501* [7] を鋳型 DNA として、TCpn60 (D51A) For と TCpn60 (D396A) Rev および TCpn60 (D51A) Rev と TCpn60 (D396A) For のプライマーの組み合わせで PCR を行い、それぞれ 1.0 kbp と 6.2 kbp の増幅断片を得た。In-fusion クローニングキット (TaKaRa) を用いてこれらの

遺伝子断片を連結し、Asp⁵¹ と Asp³⁹⁶ の二重変異体の発現ベクター *pET-TCpn10TCpn60* (D51A/D396A) を作製した。次に、*pET-TCpn10TCpn60* (D51A/D396A) と *pRCC501* の *Xba*I-*Kpn*I 領域を組換えて、Asp⁵¹ と Asp³⁹⁶ の変異をそれぞれもつ *pET-TCpn10TCpn60* (D51A) と *pET-TCpn10TCpn60* (D396A) を作製した。これらの発現ベクターで組換えた *E. coli* BL21 (DE3) を超音波破碎し、可溶性画分を 70°C で 30 分間熱処理し、遠心分離した上清を DEAE-Toyopearl、Butyl-Toyopearl (ともに TOSOH)、Sephacryl S-300HR (GE Healthcare) を用いて精製した。

精製タンパク質は 65% 飽和となるよう硫酸を加えて沈殿させ、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 Healthcare) で脱塩して実験に供した。

精製した TCpn60 を 55°C でインキュベートした後、5 μg/レーンとなるよう 13.5% アクリルアミドゲル (SDS-PAGE) または 5% アクリルアミドゲル (Native-PAGE) にて分離した。CBB 染色したゲルを ImageJ にて解析し、同時に電気泳動した濃度既知の精製 TCpn60 と TCpn10 のバンドから求めた検量線から、タンパク量を算出した。

2.2 ATP 加水分解活性の測定

Hsp60 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 μM Hsp60、0.2 mM NADH、5 mM phosphoenolpyruvate、100 μg/ml pyruvate kinase、100 μg/ml lactate dehydrogenase、5 mM DTT を加え、反応液とした。セルホルダの温度を mHsp60 は 25°C、TCpn60 は 55°C に設定し、攪拌している反応液中に 1 mM ATP を添加して加水分解反応を開始した。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、反応開始から 150 秒後に 0.6 μM Hsp10 を添加した。

2.3 Hsp60/Hsp10 複合体結合ヌクレオチドの定量

mHsp60 変異体に結合したヌクレオチドを分析するために、Hsp60/Hsp10 複合体を形成後に迅速に分離精製した。3 μM mHsp60、9 μM mHsp10、5 mM DTT、1 mM ATP を HKM 緩衝液に加え、5 分間室温で静置した。TSK-GEL G3000SW_{XL} ガードカラム (TOSOH) を 3 連結した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) にて反応液を迅速に分離し、複合体を単離した。分取した Hsp60/Hsp10 複合体溶液を反応開始から一定時間毎に抜き取り、24% PCA を加えた。遠心分離した上清を 0.5 M K₂CO₃ で中和した後、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 を記録した。ヌクレオチド量はピーク面積によって計算し、濃度既知の ATP と ADP を用いて作成した検量線によって定量した。

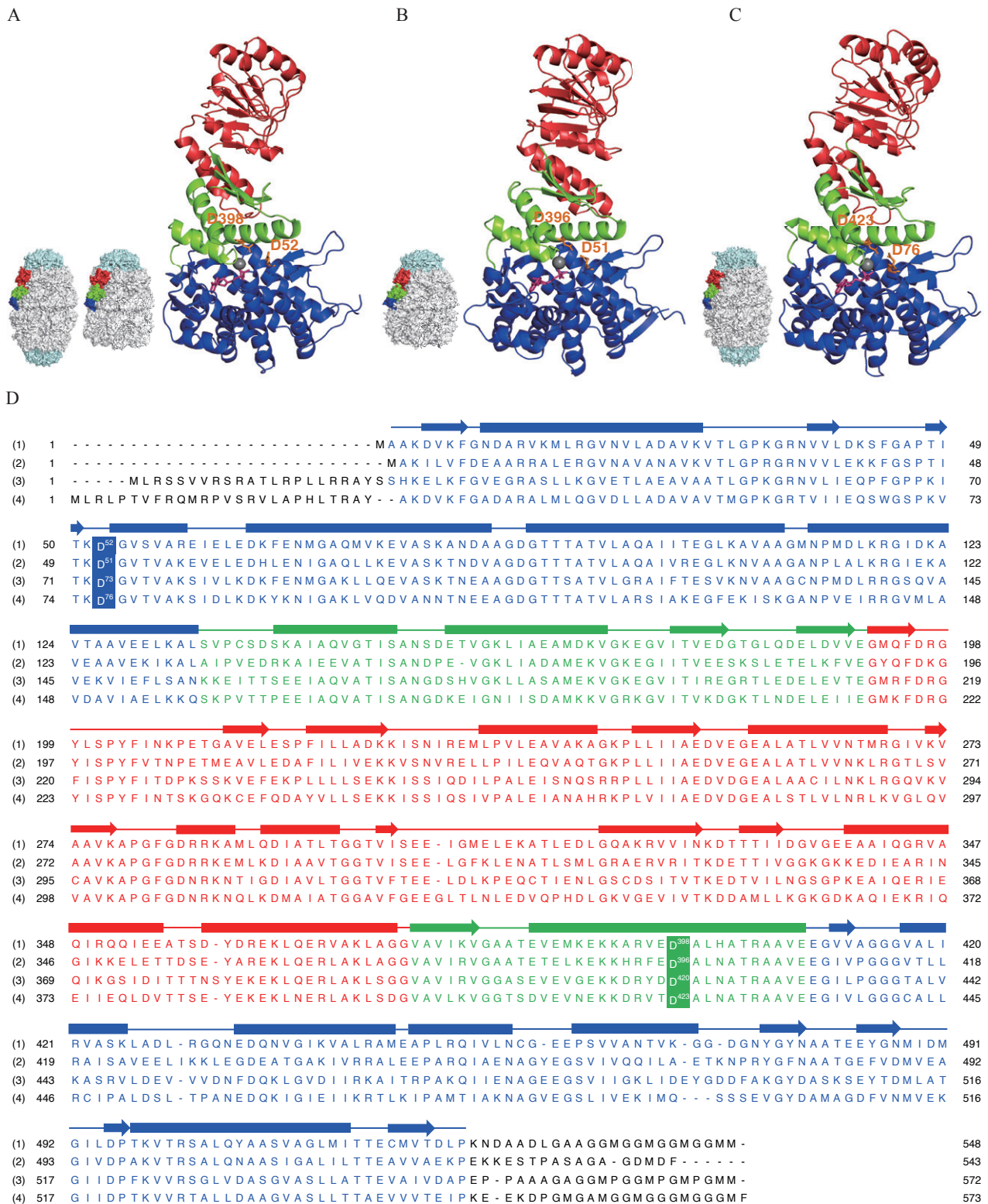


Fig. 1 Crystal structures of chaperonin complexes and sequence alignment between bacterial and eukaryotic Hsp60

Overall structure of Hsp60/Hsp10 complexes and enlarged monomer structure of Hsp60 from *E. coli* (PDB ID: 1AON and 3WVL)(A), *T. thermophilus* (4V4O) (B), and Human mitochondria (4PJ1) (C). (D) Element of the secondary structure are indicated above the amino acid sequence alignment of *E. coli* GroEL (1), *T. thermophilus* Cpn60 (2), Yeast mitochondria Hsp60 (3), and Human mitochondria Hsp60 (4). Arrows indicate β -sheets, and cylinders represent α -helices. Domains are colored in red (apical), green (intermediate), and blue (equatorial).

Mutant	Expression vector	Primer name	Primer sequence ^{†1}
mHsp60 D73A	pET-mtCpn60(D73A)	mtCpn60(D73A)For	CCAAAGATTACTAAGGcTGGTGTACAG
		mtCpn60(D73A)Rev	CTGTAACACCAgCCTTAGTAATCTTTGG
	D420A	pET-mtCpn60(D420A)	mtCpn60(D420A)For
D73A/D420A	pET-mtCpn60(D73A/D420A)	mtCpn60(D420A)Rev	GTAGCGTTCAAAGCAgCATCGTAACGGT
TCpn60 D51A	pET-TCpn10TCpn60(D51A)	TCpn60(D51A)For	CACCAAGGcCGGGGTGACGaTcGCCAA(
		TCpn60(D51A)Rev	CTTGGCgAtCGTCACCCCGcCCTTGGTG
	D396A	pET-TCpn10TCpn60(D396A)	TCpn60(D396A)For
D51A/D396A	pET-TCpn10TCpn60(D51A/D396A)	TCpn60(D396A)Rev	GTTCAGGGCGcCCTCAAAtCGATGCTTC

†1 Mutations are shown in lowercase.

2.4 ゲル濾過による Hsp60 への Hsp10 結合試験

HKM 緩衝液に 0.5 μ M Hsp60、Cy3 ラベルした 0.25 μ M Hsp10 (Hsp10^{Cy3})、5 mM DTT、1 mM ATP を混合して、mHsp60/mHsp10 は 25°C で 5 分間静置、TCpn60/TCpn10 は 60°C で 10 分間インキュベートした後、ゲル濾過 HPLC カラム (G3000SW_{XL}, TOSOH) で分析した。カラム温度を mHsp60 は 25°C、TCpn60 は 55°C に設定し、20 mM HEPES/KOH (pH 7.4)、10 mM KCl、5 mM MgCl₂、100 mM Na₂SO₄ (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) を記録して、Hsp60 と Hsp10 の結合を解析した。

2.5 透過型電子顕微鏡観察

0.5 μ M mHsp60、1 μ M mHsp10、1 mM ATP の混合液を、イオンコーター IB-2 にてプラズマ処理 (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 μ L 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 μ L 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。

2.6 Hsp60 の分子間相互作用解析

Hsp60 と ATP または Hsp10 との分子間相互作用解析のため、恒温セル (mHsp60 は 25°C、TCpn60 は 55°C に設定) に 2.5 μ M Hsp60 のみ、または 2.5 μ M Hsp60 と 1 mM ATP を充填し、滴定シリンジから 1 mM ATP、または 45 μ M Hsp10 と 1 mM ATP の混合液をそれぞれ滴下し、MicroCal PEAQ-ITC Automated (Malvern) で結合熱を測定した。

3. 結果

3.1 Hsp60 の ATP 加水分解活性における 2 つの Asp の重要性

E. coli GroEL の Asp⁵² と Asp³⁹⁸ は、I 型シャペロニンに広く保存されているアスパラギン酸であり、酵母

mHsp60 の Asp⁷³ と Asp⁴²⁰ および *T. thermophilus* TCpn60 の Asp⁵¹ と Asp³⁹⁶ に相当することは Fig. 1 の立体構造とアライメントからも明らかであった。そこで、mHsp60^{D73A}、mHsp60^{D420A}、mHsp60^{D73A/D420A} のそれぞれを精製し、ATP 加水分解活性を測定したところ、mHsp60^{D73A} では mHsp60^{WT} の約 20% の活性を示し、mHsp60^{D420A} と mHsp60^{D73A/D420A} では約 4% の活性を示した (Fig. 2)。このことから、mHsp60 においても Asp⁷³ と Asp⁴²⁰ が ATP 加水分解活性に重要であることが示され、Asp⁷³ が Asp⁴²⁰ と比べて活性の減少に大きな影響をしないことも GroEL の Asp⁵² の結果とよく似ていた。

次に、より正確な加水分解活性を測定するために、ATP を加えて mHsp60/mHsp10 複合体を形成し (t=0)、迅速にゲル濾過クロマトグラフィーで複合体を単離して、結合しているヌクレオチドを経時的に分離し定量したところ、ATP の 50% が加水分解される半減期は、mHsp60^{D420A} が 2~3 時間 (Fig. 3A)、mHsp60^{D73A/D420A} が約 50 時間であった (Fig. 3B)。ATP 再生系によって算出した mHsp60^{WT} の反応サイクル時間 (7 mol of ATP/mol of mHsp60 が ADP に加水分解される時間) は 20 秒であったことから、mHsp60^{D73A/D420A} の反応サイクル時間は mHsp60^{WT} の約 9000 倍に延長されていた。mHsp60^{D73A} の反応サイクル時間は、ATP 再生系によって約 2 分と算出され、複合体結合ヌクレオチド定量法では計測可能な最短時間である 20 分後には結合しているほぼすべてのヌクレオチドは ADP であった。

一方、TCpn60^{D51A}、TCpn60^{D396A}、TCpn60^{D51A/D396A} はいずれも、TCpn60^{WT} の約 20% の活性を示し、TCpn60 の Asp⁵¹ と Asp³⁹⁶ が ATP 加水分解に関わるアミノ酸残基であることが示された (Fig. 2)。また、Hsp10 による ATP 加水分解活性阻害効果が低かった。mHsp60 と同様に、ATP と TCpn10 を加えて作製した複合体に結合しているヌクレオチドの分析を行なう前に、TCpn60^{D51A}、TCpn60^{D396A}、TCpn60^{D51A/D396A} を単独で単離し結合ヌクレオチドを分析したところ、TCpn60^{D51A} と TCpn60^{D396A} は ADP が 2 mol/mol of TCpn60、TCpn60^{D51A/D396A} は ADP が 7 mol/mol of TCpn60 結合しており、55°C で 6 時間の反応後も遊離しなかった。TCpn10 の組換え大腸菌での共発現は TCpn60^{WT} の安定な発現と精製

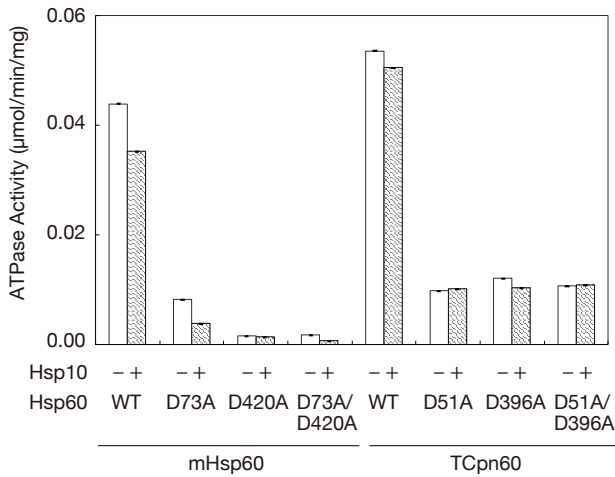


Fig. 2 ATP hydrolysis activity of Hsp60 mutants.

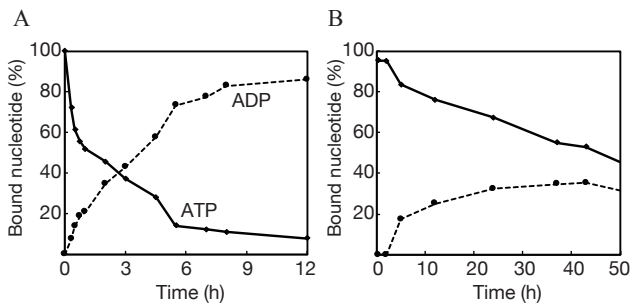


Fig. 3 Time course of ATP hydrolysis by the isolated mHsp60/mHsp10 complexes.

The ratio of ATP or ADP to the total nucleotide bound to the mHsp60/mHsp10 complexes is shown. (A) mHsp60^{D420A}, (B) mHsp60^{D73A/D420A}.

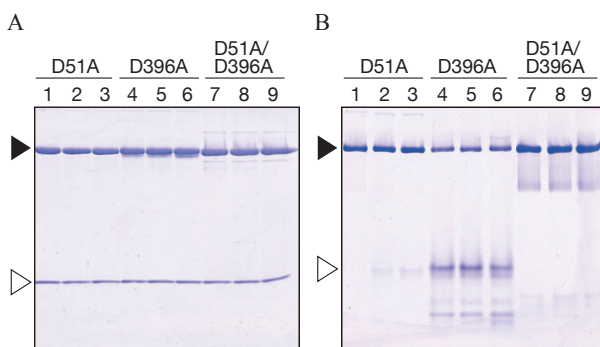


Fig. 4 Maintained binding of purified TCpn60 mutants with TCpn10.

SDS-PAGE (A) and Native-PAGE(B). Purified TCpn60 mutants were incubated for 0 h (lanes 1, 4, and 7), 0.5 h (lanes 2, 5, and 8), or 6 h (lanes 3, 6, and 9) at 55°C. Black and white arrowheads indicate TCpn60 and TCpn10 positions, respectively.

のために有効であるが、変異体では精製後も TCpn60/TCpn10/ADP 複合体として結合したまま外れない可能性が示唆された。そこで、TCpn60^{D51A}、TCpn60^{D396A}、TCpn60^{D51A/D396A}を55°Cで0-6時間まで反応させ電気泳動したところ、SDS-PAGEの結果からTCpn60^{D51A}、TCpn60^{D51A/D396A}が2.1 mol/mol of TCpn60、TCpn60^{D396A}は1.7 mol/mol of TCpn60のTCpn10を結合したまま精製されていることがわかった (Fig. 4A)。Native-PAGEにより、TCpn60^{D396A}は保存中にTCpn10が解離しており、TCpn60^{D51A}は55°Cで反応させることで解離したTCpn10を観察できたが、TCpn60^{D51A/D396A}は4°Cでの保存や55°Cで6時間の反応でTCpn10の解離は観察されなかった (Fig. 4B)。

3.2 ゲル濾過による Hsp60/Hsp10 複合体形成の解析

GroEL^{D52A/D398A}は、ATP加水分解の1サイクルが12日に遅延した変異体だが、ATP結合やGroES結合などを含むその他の活性は野生型と変わらず、Asp⁵²とAsp³⁹⁸がATP加水分解だけに関与すると考えられた[6, 8]。そこで、作製した各種Hsp60変異体のATP結合とHsp10結合の結果である複合体形成能を、HPLCゲル濾過クロマトグラフィーで解析した。mHsp60^{WT}にATPとCy3-mHsp10を混合した反応液を、ゲル濾過クロマトグラフィーで分離しCy3の蛍光を検出すると、溶離液にATPが含まれない場合はほとんどのCy3-mHsp10は遊離して存在するが、ATP存在下ではmHsp60/mHsp10複合体の溶出時間である約13分の位置にCy3の蛍光ピークが検出された。これは、最初に結合したATPあるいは加水分解されてできたADPがmHsp60から外れやすく、周囲にATPがなければ結合していたCy3-mHsp10は解離することを示している (Fig. 5A)。一方、mHsp60変異体では、溶離液中のATPの有無に関わらず、mHsp60/mHsp10複合体に相当する13分にCy3の蛍光によるピークが観察できた (Fig. 5B)。したがって、これらのmHsp60変異体はATP結合とmHsp10結合、複合体形成能は保持しており、加水分解が遅いことによりmHsp60/mHsp10複合体を安定に維持できることが示唆され、TEM観察でもmHsp60^{D73A/D420}/mHsp10₂のフットボール型複合体が観察できた (Fig. 5F)。

一方、TCpn60^{WT}は、溶離液中のATPの有無に関わらず、TCpn60/TCpn10複合体を維持し、12.5分にCy3の蛍光ピークが検出された (Fig. 5C)。これは、最初にTCpn60に結合したATPあるいは加水分解で生成したADPの結合が強くTCpn60/TCpn10複合体を安定に維持できることを示している。これに対しTCpn60^{D396A}は、溶離液にATPを含む場合にのみTCpn60/TCpn10複合体に相当する12.5分に蛍光ピークがあらわれた (Fig. 5D)。TCpn60^{D396A}はTCpn60^{WT}よりもATP加水分解活性が低く、しかし周囲にATPが存在しないとTCpn10の結合を維持できないことから、ATP結合とTCpn10結合、複合体形成能は保持しているが、ヌクレオチドの結合強度が小さいことが考えられた。また、TCpn60^{D51A}とTCpn60^{D51A/D396A}はどの条件でもCy3-TCpn10を結合しなかった。これは、すでに2つのリングにTCpn10

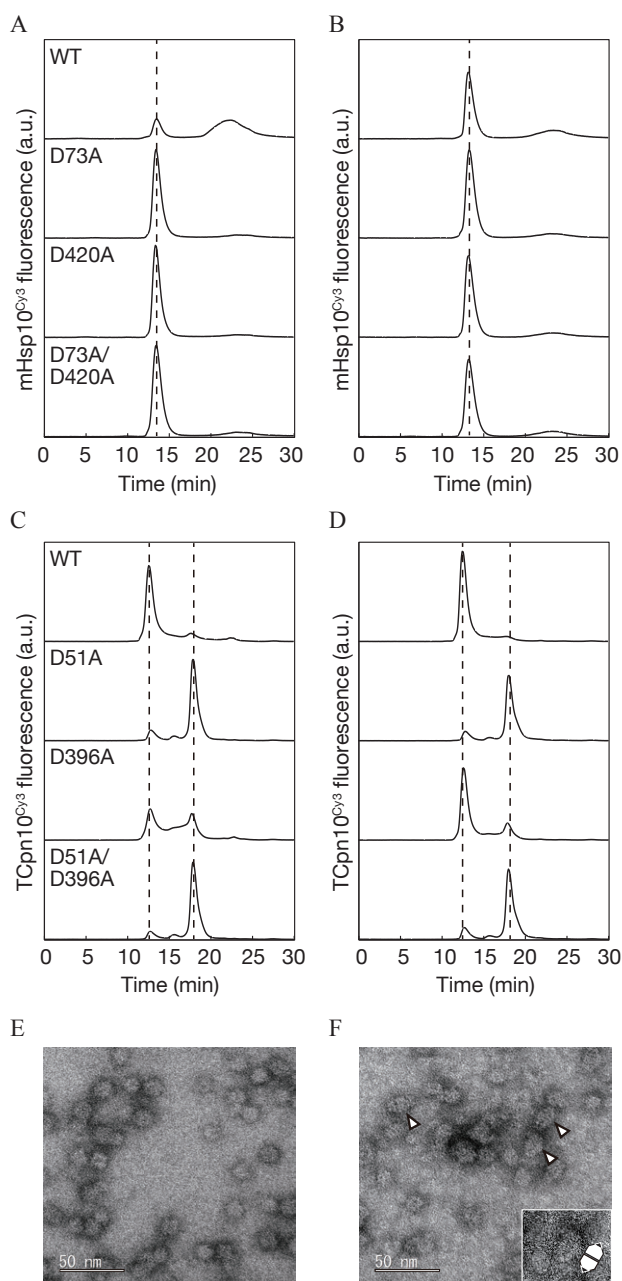


Fig. 5 Binding of Hsp10 to Hsp60 mutants.

Binding of Cy3-mHsp10 to the mHsp60 mutant in the absence (A) or presence (B) of 1 mM ATP. Binding of Cy3-TCpn10 to the TCpn60 mutant in the absence (C) or presence (D) of 1 mM ATP. mHsp60 mutants were mixed with Cy3-labeled Hsp10 and ATP (1 mM) at the indicated case and then separated by gel filtration HPLC with fluorescence detection. *a.u.*, arbitrary units.

Electron micrographs of the negatively stained mHsp60^{WT}/mHsp10 (E) and mHsp60^{D73A/D420A}/mHsp10 (F) complexes in the presence of ATP. Arrowheads show the symmetrical football complexes.

が結合し精製されているためと考えられ (Fig. 4A)、D51A 変異が ATP 加水分解速度だけでなく TCpn10 の解離に影響している可能性が考えられた。

3.3 ATP および Hsp10 と Hsp60 の分子間相互作用解析

変異を導入した2つの Asp が ATP 加水分解だけでなく ATP 結合や Hsp10 結合に作用する可能性を検証するために、mHsp60 変異体および TCpn60 変異体に ATP または Hsp10 を滴下し、等温滴定型熱量測定による解析を行った。mHsp60^{D73A} への ATP 結合は、ATP 加水分解により発生する熱量の変化が重なり解離定数 (K_d) を算出できなかったが、mHsp60^{D420A} と mHsp60^{D73A/D420A} ではそれぞれ K_d が 5.7×10^{-5} M と 1.9×10^{-5} M であり、1 分子の mHsp60 に対して約 10 分子の ATP が結合したと見積もられた。また、全ての mHsp60 変異体への mHsp10 の結合について、1 分子の mHsp60 に対して 2 分子の mHsp10 が結合すると見積もられ、特に mHsp60^{D73A/D420A} では K_d の値 (2.6×10^{-10} M) が劇的に他の変異体よりも低下していた。これらの結果は、ATP 加水分解活性やゲルろ過クロマトグラフィーによる mHsp60/mHsp10 複合体解析の結果とも完全に一致していた (Table 2)。

一方、TCpn60 変異体においては、1 分子の TCpn60^{D396A} に対して 3 分子の ATP 結合が観察され、 K_d は 1.9×10^{-7} M であった。3 種の変異体の中で TCpn60^{D396A} だけがわずかではあるが TCpn10 の結合を確認でき、これはゲル濾過クロマトグラフィーの結果と矛盾しなかった (Table 2)。

4. 考察

真核生物のミトコンドリアの Hsp60 は、ミトコンドリアに輸送されたタンパク質のフォールディングやストレスによるミトコンドリアタンパク質の変性を防ぐ機能のため、生存に不可欠なタンパク質である。また、このタンパク質がヒトにおける重篤な遺伝病の原因タンパクであることもわかってきているため、構造解析や機能解析が期待されるが、タンパク質の安定性や精製のしやすさから、先行研究による知見のほとんどが大腸菌の GroEL/GroES に依存してきた。ミトコンドリアの Hsp60/Hsp10 の結晶構造解析は、ヒト由来のタンパク質でフットボール型複合体、シングルリング複合体 (フットボール型複合体が Hsp60 のリング-リング界面で解離した複合体) として報告されたが、酵母ミトコンドリア mHsp60/mHsp10 ではまだ報告がない [9]。 *E. coli* GroEL の Asp³⁹⁸ 相当のアミノ酸のヒトミトコンドリア mHsp60 における Ala 変異体が、ATP 加水分解活性の低下を示し、フットボール型複合体を安定に形成することが報告されたが [10]、同じように保存されている GroEL の Asp⁵² 相当変異体は報告がなかった。本研究により、酵母ミトコンドリアの mHsp60 の Asp⁷³ と Asp⁴²⁰ は、 *E. coli* GroEL の Asp⁵² と Asp³⁹⁸ 同様に、ATP の γ リン酸の引き抜きに重要なアミノ

		mHsp60			TCpn60		
		D73A	D420A	D73A/D420A	D51A	D396A	D51A/D396A
Nucleotide	K_d (M)	ND	5.7E-05	1.9E-05	1.0E-12	1.9E-07	9.6E-09
	Binding sites	ND	10.0	10.0	1.1	3.1	5.5
Hsp10	K_d (M)	3.4E-09	1.1E-09	2.6E-10	ND	2.7E-08	ND
	Binding sites	2.1	1.9	1.8	ND	0.3	ND

ND : not detected

酸であることがわかった。2つの残基は相補的にはたらくと考えられ、mHsp60^{D73A}とmHsp60^{D420A}の反応サイクル時間と比較して、mHsp60^{D73A/D420A}では劇的に反応サイクル時間が延長された。しかし、ATP結合、mHsp10結合、複合体形成能には影響は無く、ATP加水分解の遅延により複合体が安定となりTEM観察ではフットボール型複合体が多く観察された。これまで、細菌のGroELと真核生物のミトコンドリアmHsp60は構造は類似しているが、反応機構は異なる点が多いと考えられてきた。しかし、シャペロニンの反応サイクルを制御するATP加水分解において大きな共通点を示され、近年GroEL/GroESとmHsp60/mHsp10で相次いでフットボール型複合体の結晶構造が解明されたことも含め、それぞれの系で明らかとなってきた一見相違する知見が互いの詳細な反応機構の理解につながる可能性がある。

一方、*T. thermophilus*のTCpn60においても、Asp³⁹⁶はATP加水分解活性に関与するアミノ酸残基であり、TCpn60^{D396A}は1mM ATP存在下ではTCpn10の結合による複合体形成も可能であった(Fig. 5D)。同様に、Asp⁵¹もATP加水分解活性に関与するアミノ酸残基と考えられるが、この変異をもつTCpn60^{D51A}とTCpn60^{D51A/D396A}はどちらも、TCpn10の解離が困難で(Fig. 4)、1mM ATP存在下であっても新たなTCpn10の結合が見られなかった(Fig. 5D)。このことから、TCpn60のAsp⁵¹はATP加水分解活性に加えて、TCpn10の解離、つまり反応サイクルのターンオーバーに関わっていると考えられた。GroELにおいて、GroESの解離には反対側のリングへのATPの結合が必要であり、リング-リング間の協同性が関与すると考えられる。赤道ドメインに位置するTCpn60のAsp⁵¹が、このリング-リング間の協同性に寄与している可能性がある。

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] R. Iizuka, T. Funatsu: Chaperonin GroEL uses asymmetric and symmetric reaction cycles in response to the concentration of non-native substrate proteins. *Biophysics and physicochemistry*, **13**, 63, (2016).
 [4] 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).
 [5] S. Nisemblata, O. Yanivb, A. Parnasa, F. Frolowb, and A. Azema : Crystal structure of the human mitochondrial chaperonin symmetrical football complex, *PNAS*, **112**, 6044-6049, (2015).
 [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] Y. Watanabe, K. Motohashi, H. Taguchi, and M. Yoshida: Heat-inactivated Proteins Managed by DnaKJ-GrpE-ClpB Chaperones Are Released as a Chaperonin-recognizable Non-native Form, *J. Biol. Chem.*, **275**, 12388-12392, (2000).
 [8] 増田恵, 依田ひろみ, 小池あゆみ, “様々な反応サイクル時間をもつ GroEL 変異体のデザイン”, 神奈川工科大学研究報告 B-43, 21-26, (2019).
 [9] Y. Gomez-Llorente1, F. Jebara, M. Patra, R. Malik1, S. Nisemblat, O. Chomsky-Hecht, A. Parnas, A. Azem, JA. Hirsch and I. Ubarretxena-Belandia : Structural basis for active single and double ring complexes in human mitochondrial Hsp60-Hsp10 chaperonin, *Nat. Commun.*, **11**, 1, 1916, (2020).
 [10] R. Ishida, T. Okamoto, F. Motojima, H. Kubota, H. Takahashi, M. Tanabe, T. Oka, A. Kitamura, M. Kinjo, M. Yoshida, M. Otaka, Ewa. Grave, and H. Itoh : Physicochemical Properties of the Mammalian Molecular Chaperone HSP60, *Int. J. Mol. Sci.*, **19**, 489, (2018).