

# 分子シャペロンを利用した機能性動的ナノ空間の開発

Fabrication of dynamic functional nanospace using chaperon proteins

研究代表者 東京大学大学院工学系研究科 講師

金原 数

Lecturer, School of Engineering, The University of Tokyo

和文アブストラクト

分子シャペロンと呼ばれる一群のたんぱく質は、中心に直径 4~5 nm ほどの円筒状の空孔を有しており、この空孔内で変性タンパク質のリフォールディングを行ない、ATP の作用により空孔の構造を変化させることで、リフォールディングされたタンパク質を放出することが知られている。本研究は、分子シャペロンの特徴的な空孔と ATP 応答性に着目し、これらの特性を利用した新しい概念のナノデバイスの構築を目標としている。具体的には、1) 分子シャペロンに発光性の半導体ナノクラスターを導入し、ATP の添加により半導体ナノクラスターを放出することで消光する、刺激応答性のナノデバイスの構築、2) 分子シャペロンの空孔に化学的処理により触媒活性部位を導入し、分子シャペロンの卓越した基質取込み能と ATP 応答性を利用して化学反応を制御する、高活性「分子シャペロン触媒」の構築を目指し検討を行った。

Abstract

A family of proteins called molecular chaperons are known to have cylindrical structures with nano-scale cavities, and to assist refolding of the denatured proteins through the conformational change of the cavity promoted by ATP. The refolded proteins are readily released from the cavity. The objects of this research are (1) fabrication of stimuli-responsive nano devices by introducing luminescent semiconductor nanoparticles into the cavity of chaperonin, and (2) fabrication of highly active “chaperonin catalysts” by introducing catalytic active sites into the cavity of chaperonin by chemical modification.

## 1. 研究目的

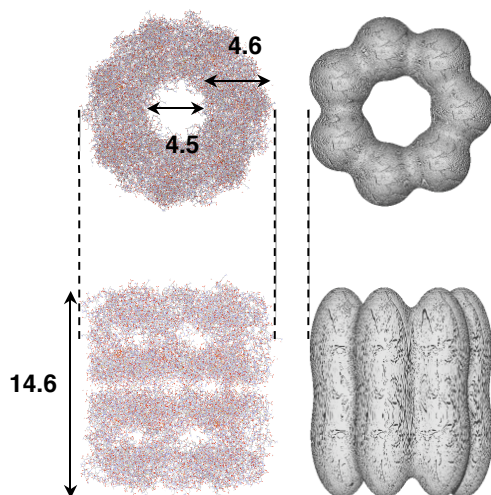
分子シャペロンと呼ばれる一群の筒

状タンパクは ATP の存在下細胞中で変性

タンパクのリフォールディングを促すこ

とが知られている。本研究は、この分子シャペロンのゲスト取り込み能および ATP 応答性を利用し、これまでに前例のない刺激に応答するナノデバイスを構築することを目的としている。これまでに、量子サイズ効果によって特異な物性を示すことが知られている半導体ナノクラスターを分子シャペロンに取り込ませることにより、分子シャペロン・ナノクラスターハイブリッドを形成させ、その動的な機能を活かして、新規ナノデバイスを構築することに成功している。

シャペロニンは、サブユニットの 14 量体であり、化学的刺激により、それらが解離・変性してしまう。このため、シャペロニンをさらに機能性材料として利用するためには、化学的安定性の向上が



Chaperonin GroEL

図 1 シャペロニン GroEL の結晶構造<sup>1</sup>。

必須である。そこで今回、シャペロニンの化学修飾による機能化を試みた。

## 2. 研究経過

### 2. 1 グルタルアルデヒドによるシャペロニンの安定化

まず、グルタルアルデヒドによる架橋反応を利用したシャペロニンの安定化を試みた。グルタルアルデヒドは、Lys のアミノ基と Schiff 塩基を形成することが知られており、これを利用してタンパクの高次構造の固定化に利用されている。実際、シャペロニンを固定化した例も知られていたが<sup>2</sup>、詳細な検討はされていなかった。そこで、まず GroEL について、グルタルアルデヒドによる安定化を検討した。

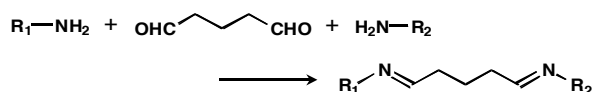


図 2 グルタルアルデヒドによる架橋反応。

架橋反応は、SEC によって精製した GroEL の TEA バッファー水溶液中にグルタルアルデヒドを添加し、37℃で2時間おくことで行なった。未反応のホルミル基をクエンチするために過剰量のグリシンを添加し、SEC によって精製を行うことで、架橋された GroEL (Gluta-

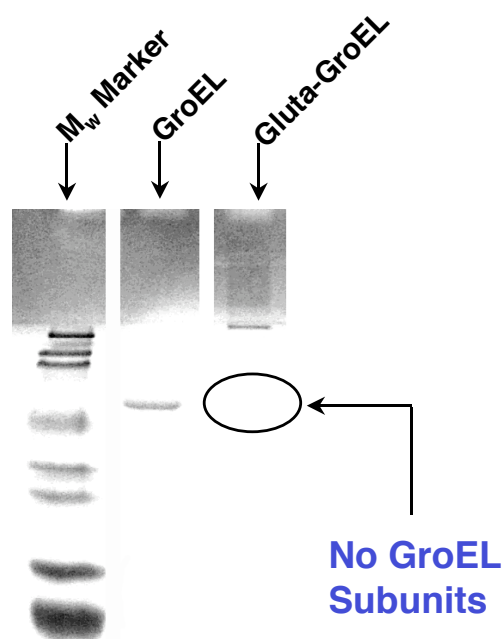


図3 GroEL および Gluta-GroEL の SDS-PAGE。

GroEL) を得ることができた。

架橋後の GroEL について、SDS-PAGE により分析を行ったところ、サブユニットには解離せず、14量体と思われる位置にフラグメントが確認された。このことから、グルタルアルデヒドにより Lys 間を架橋することで、SDS-PAGE という強力な変性条件下でも GroEL の高次構造を維持できることが示唆された。さらに、Gluta-GroEL は耐熱性も GroEL より向上していることが分かった。GroEL では、70℃で40分加熱すると、ほとんどが変性してしまうのに対し、Gluta-GroEL

では、ある程度変性を抑えられることが分かった。これらの結果から、グルタルアルデヒドによる架橋がシャペロニンの安定化に大きく寄与することが分かった。

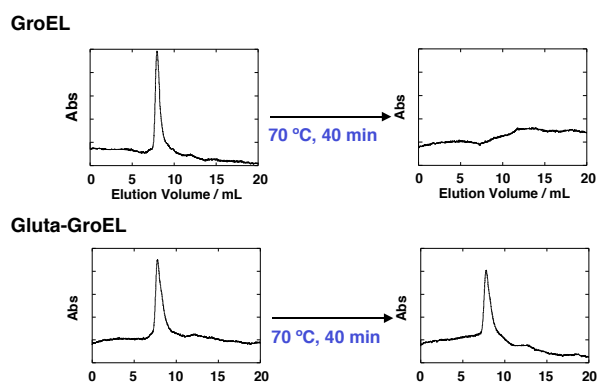


図4 GroEL および Gluta-GroEL の加熱処理前後の SEC クロマトグラム。

## 2. 2 水溶性架橋剤の開発

前述したグルタルアルデヒドの問題点として、架橋反応により、GroEL が凝集してしまうことが分かった。このため、Gluta-GroEL の化学収率はあまり高くなかった。そこで、架橋による凝集を防ぐことを目的として、親水性の架橋剤の開発を目指した。

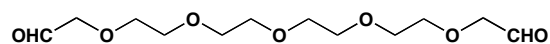


図5 PEG-型親水性架橋剤

図5に示すような親水性の架橋剤を合成し、GroEL の化学修飾を試みた。その

結果、グルタルアルデヒドを用いた場合とは対照的に、架橋反応の過程でほとんど凝集を起こさないことが分かった。また、興味深いことに、架橋後のGroEL(PEG-GroEL)がATPase活性を維持していることが分かった。Gluta-GroELはほとんどATPase活性を示さないことが報告されており、PEG型架橋剤の大きな特徴の一つと言える。

表 GroEL および修飾体のATPase活性

	ATPase Activity (mmol•mg <sup>-1</sup> •min <sup>-1</sup> )
GroEL	0.1
PEG-GroEL	0.1
Gluta-GroEL	~0 <sup>2</sup>

### 3. 研究成果

以上のように、化学的にやや不安定である分子シャペロンを、アルデヒド型の架橋剤で安定化できることが分かった。特に、親水性の高いPEG型の架橋剤では、架橋処理中にタンパクの凝集が起これないため、高い収率で目的とする修飾シャペロンが得られることが分かった。さらに、修飾後のシャペロンがATPase活性を維持していることが明らかになった。

### 4. 今後の課題と発展

今回、シャペロンの化学修飾により、

触媒機能を付与する段階には至らなかったが、その前段階である、高次構造の安定化については極めて有用な知見を得ることに成功した。PEG型の架橋剤を用いると、ATPase活性を維持できることが大きな成果の一つである。シャペロニンを初めとするATP加水分解性タンパク質の多くは、機械的な運動を通して生体機能を実現していることが知られている。このようなタンパク質の生物学的機能を利用する上で、今回の架橋剤が重要な役割を果たすことが期待される。

### 5. 発表論文リスト

1. Chaperonins mediated stabilization and ATP-triggered release of semiconductor nanoparticles, D. Ishii, K. Kinbara, Y. Ishida, N. Ishii, M. Okochi, M. Yohda, and T. Aida, *Nature* **2003**, *423*, 628-632

#### 参考文献

1. Braig K. et al. *Nature* **1994**, *371*, 578.
2. A. Azem et al., *Biochemistry* **1994**, *33*, 6671.