シャペロニンの構造と作用機構

田口英樹・吉田賢右

細胞の中は，蛋白質が折れたたむには過酷な環境である。蛋白質濃度が非常に高いので，折れたたむ途中で凝集しやすいのである。しかし，細胞の中には，凝集を防ぎ，正しい折れたたみを助ける蛋白質がある。そのなかでも，最も多量に存在するのがシャペロニンである。シャペロニンは1次構造も高次構造も千差万別の多数の蛋白質の折れたたみを援助することができる。なぜ，そんなことが可能なのだろうか。

Key words 【分子シャペロン】【シャペロニン】【GroEL】【蛋白質の折れたたみ】

はじめに　生命のセントラルドグマの最終段階，すなわち新生ポリペプチドの折れたたみは自発的に進行して正しい立体構造に至るものと長い間信じられていた[1]。しかし最近，細胞内での蛋白質の折れたたみは，分子シャペロン［→今月のKey Words (p. 916)］と総称される蛋白質群によって助けられていることが明らかになってきた（図1）[2,3]。さらには，折れたたみ（誕生）だけではなく，膜をこえての輸送(移動)，熱などのストレスに対する防御（病気），蛋白質の分解（死）など，蛋白質の一生の要所要所において分子シャペロンは何かと世話をしているらしい[3~6]。

分子シャペロンのなかでも，シャペロニンとよばれる蛋白質ファミリーは，蛋白質折れたたみを援助する活性を試験管内でわりと簡単に見ることができる，(いまのところ) 唯一の分子シャペロンである[7,8]。シャペロニンは，分子量約60 Kのサブユニット(シャペロニン60*1) とその補助役の10 Kのサブユニット (シャペロニン10*2) からなる蛋白質複合体で，そのアミノ酸配列は進化的によく保存されている[9,10]*3。多くの場合，ほかの分子シャペロンと同様に，ストレスに応答して増産される蛋白質であるが，もともと通常の生育をしている細胞においても量の多い蛋白質である[10]。

シャペロニン研究に蛋白質の折れたたみの研究者が次々と参入していることからもわかるように，シャペロニンは蛋白質折れたたみ機構という不落の難問に深くかかわる重要な蛋白質といえる。シャペロニンは，い

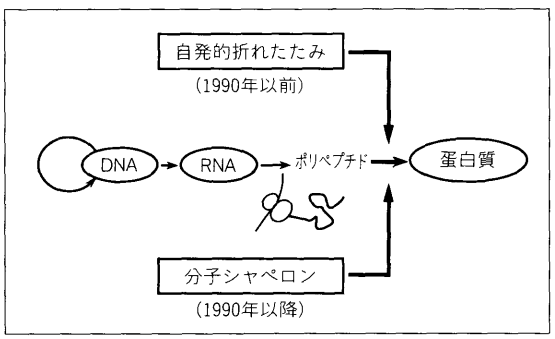

図1　セントラルドグマと分子シャペロン
以前は，新生ポリペプチドの折れたたみは勝手に進行して所期の立体構造が形成されると考えられていた。現在では，この折れたたみ過程には分子シャペロンがかかわっていると考えられている。

Hideki Taguchi, Masasuke Yoshida, 東京工業大学資源化学研究所（〒226 横浜市緑区長津田町4259）[Tokyo Institute of Technology, Research Laboratory of Resources Utilization, Nagatsuta, Midori-ku, Yokohama 226, Japan]

Chaperonin ; Structure and Function

まだ謎のベールにつつまれた“折れたたみ中間体”の真の姿を知っているかもしれないし，第一，すべての蛋白質に君臨する“アミノ酸配列が蛋白質の立体構造を決定する”というAnfinsenのドグマ[1]ですら，シャペロニンの存在によって挑戦を受けているのである。本稿では，シャペロニンの作用機構，とくにシャペロニン自身がどのように折れたたみに関与しているのかに焦点をあて，基本的な内容から始めて，現在までの知見を整理してみたい。

I. シャペロニン研究の流れ

まず，どのようにシャペロニン研究が進んできたか紹介しよう。シャペロニン研究を俯瞰したとき，次の3つのステージに分けて考えることができよう。

1. シャペロニンとよばれるまで（1973〜1988年）

現在最も研究の進んでいるシャペロニン，大腸菌のGroELとGroESは，最初，ファージの形態形成ができなくなる宿主大腸菌側の遺伝子として同定された[10,11]。蛋白質としては，大腸菌のRNAポリメラーゼ精製中に混入してくる巨大なATP加水分解酵素として，石浜らによって精製されたのが最初である[12]。その後，その蛋白質はGroELだとわかった[13,14]。一方，葉緑体中で炭酸固定にかかわる重要酵素，リブロースビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ（RuBisCO）が活性のある構造を形成するには，RuBisCO結合蛋白質とよばれる蛋白質が必要であることが知られていた[15]。そして，1988年，RuBisCO結合蛋白質の遺伝子からアミノ酸配列が決まってみると，それはGroELと非常に高い相同性をもつことが判明し，ここに分子シャペロンの概念が確立，両蛋白質はその典型例として“シャペロニン”とよばれることとなった[9]。さらにミトコンドリアのストレス応答蛋白質hsp60［→今月のKey Words (p. 916)］もシャペロニンファミリーに属することが判明し[16]，シャペロニンはすべての生物に普遍的に存在することがわかった。シャペロニン研究は一気に加速をはじめる。

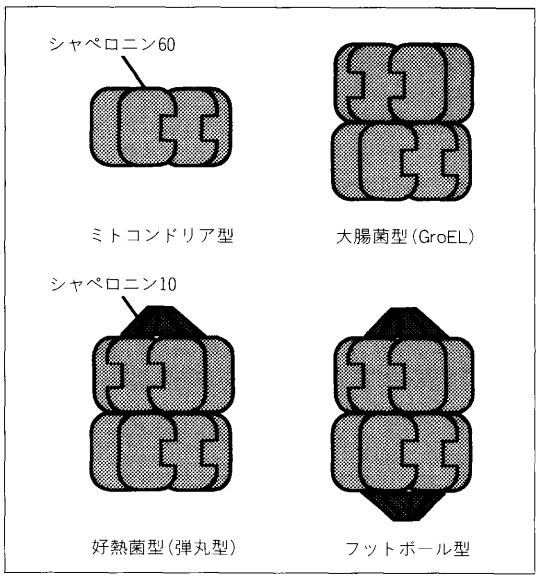

図2　さまざまなシャペロニンの4次構造
生物種によって，精製されてくるシャペロニンの形が異なる。

2. 試験管内でのシャペロニン研究法の確立（1989年〜）

現在行なわれているシャペロニンの作用機構の研究は，1989年に発表された試験管内でのRuBisCO再構成実験にさかのぼることができる[17]。Lorimerらのこの先駆的な研究は，Anfinsenが行なった蛋白質折れたたみの古典的な実験系を応用したものであり，シャペロニンとATPによって蛋白質の折れたたみを制御できることを示した[17]。この直後から，シャペロニンの作用機構の研究は関連分野（蛋白質の折れたたみ，蛋白質輸送など）の多数の研究者を巻きこみ，激しい競争が開始された。

3. シャペロニンの立体構造決定（1994年〜）

シャペロニンは巨大蛋白質複合体であることから，電子顕微鏡による構造の観察が広く行なわれてきたが，1994年，X線結晶解析によりGroELの立体構造が明らかになった[18]。さらについ最近，補助役のシャペロニン10の立体構造もわかった[19,20]。ついにシャペロニン

＊1　ほかにもGroEL，hsp60，cpn60などの名称が使われる。
＊2　GroES，hsp10，cpn10などともよばれる。
＊3　本稿ではGroEL型（真正細菌型）のシャペロニンに話を絞る。ほかにもTCP-1・TF55型（真核細胞・古細菌）のシャペロニンファミリーがある。

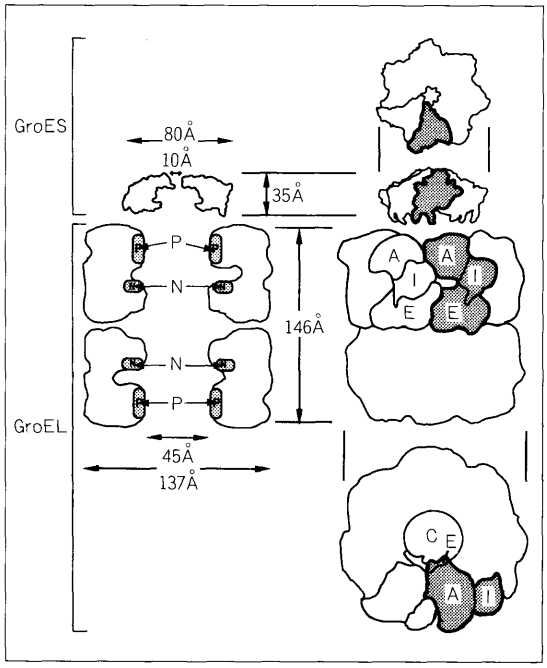

図 3　シャペロニンの立体構造の概形
下 3 つはシャペロニン 60 (GroEL)，上 3 つはシャペロニン 10 (GroES とライ菌のシャペロニン 10) の立体構造。左 2 つは側面からの断面図。最上部と最下部の図は真上からみた図。右の列の太線で囲んだ部分はサブユニット 1 つを示している。いずれもサブユニットが 7 つ会合したリング構造からなる。GroEL は 7 量体リングが 2 つ重なった 2 層のリングである。A：頂点ドメイン，I：中間ドメイン，E：赤道ドメイン，C：中央の空洞。P は折れたたみ中間体および GroES 結合に関与する領域，N はヌクレオチド結合や加水分解にかかわる領域。[文献 18〜20 をもとに作図]

の立体構造を参照しながら研究を進めることができるようになったわけである。GroEL の立体構造解析と同時に，50 個以上の GroEL 突然変異体の解析が発表され，構造-機能相関の研究に先鞭がつけられた[21]。

II. シャペロニンの構造——リング，リング，リング

シャペロニンの作用機構の説明の前に，シャペロニン自身のユニークな形についても言及しておこう。シャペロニンの特徴のひとつとして，その分子量の巨大さがある。多くの場合，大腸菌シャペロニン 60 (GroEL) のように 7 量体のリングが 2 つ重なった 2 層のリングとして精製されてくるが[13,14,18]，ミトコンドリアのシャペロニン 60 は 1 層のリングとして単離される[22] (図 2)。また，筆者らが扱っている好熱菌 *Thermus thermophilus* のシャペロニンは，シャペロニン 10 がシャペロニン 60 の 2 層リングの一方に結合した“弾丸型”で精製される[23,24]*4。このように，精製されてくるシャペロニンの形 (4 次構造) は，生物種によって異なっている。また，ATP 存在下においては，シャペロニン 10 が両側に結合した，まるで“フットボール”のようなシャペロニンも観察される[25,26]。シャペロニンの 4 次構造が作用機構のサイクルのなかでどう変化するかについては，激しい論争がくり広げられている (後述)。

X 線結晶構造解析から明らかになったシャペロニンの立体構造の概略を図 3 に示した[18〜20]。シャペロニン 60 (GroEL) の 1 つのサブユニットは，赤道 (equatorial) ドメイン，頂点 (apical) ドメイン，その両者をつなぐ中間 (intermediate) ドメインの 3 つのドメインからなる[18]。赤道ドメインは α ヘリックスに富み，ATP 結合領域を含んでおり，GroEL 構造の土台を形成している。このドメインの底面どうしが結合して GroEL は 7 量体のリングが 2 つ合わさった 14 量体となる。なお，N 末端の 5 残基と C 末端の 24 残基は揺らぎが大きく，構造決定されていないが，ともに赤道ドメインからリングの内側に張り出しているものと予想されている。中間ドメインはヌクレオチド結合や加水分解に伴う構造変化におけるヒンジの役割を果たしている可能性が高い。頂点ドメインは結晶学的に揺らぎの大きい領域で，とくに穴の周辺と頂上のあたりの構造の揺らぎが大きい。GroEL の部位特異的変異体の解析から，このフレキシブルな頂点ドメインには折れたたみ中間体や GroES の結合に関与する残基が集中していることがわかっている (興味深いことに両者はかなりオーバーラップしている)[21]。以前から，折れたたみ中間体はシャペロニンの表面に結合するのか，それともリングの内部深くに入りこむのかが議論されていたが，この結果からは，折れたたみ中間体はリング空洞の入口付近に結合するようである。また，このような構造の揺らぎがシャペロニンの幅広い基質蛋白質認識能[27,28] の原因となっている可能性も示唆されている[18]。

一方，シャペロニン 10 については，大腸菌[19] とライ菌[20] 由来のものの立体構造がほぼ同時に発表された。ど

*4　ちなみに，この弾丸型シャペロニンは ADP を含んでいる。ほかのシャペロニンでも，ATP や ADP 存在下でシャペロニン 60 とシャペロニン 10 を混合したときに弾丸型シャペロニンが形成されることがわかっている。

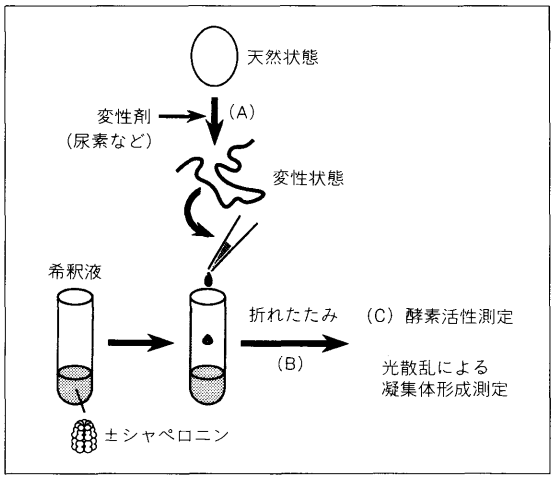

図 4　シャペロニン依存蛋白質折れたたみ実験の原理
(A) 変性：基質蛋白質を変性剤，酸などで変性させる。(B) 希釈→折れたたみ：変性した蛋白質をシャペロニンの入った希釈液中に加える。希釈率は通常 20～100 倍程度である。変性剤が希釈され，蛋白質は折れたたみ可能な状態になる。(C) 折れたたみ効率などの測定：その後，回復した酵素活性を調べたり，凝集体形成の様子を光散乱で調べたりする。

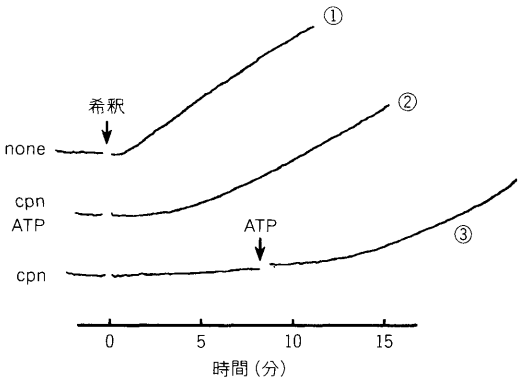

図 5　シャペロニン依存蛋白質折れたたみ実験の例[23]
① 塩酸グアニジンで変性させた好熱菌イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素 (IPMDH) を時間 0 で希釈し，酵素活性を測定。② 塩酸グアニジンで変性させた IPMDH を好熱菌のシャペロニン(シャペロニン 60 とシャペロニン 10 の複合体；cpn) と ATP が入っている緩衝液に希釈。③② で ATP を入れない場合。矢印のところで ATP を加える。温度はすべて 50℃。IPMDH の酵素活性は，NAD^+ の還元を 340 nm の吸光度増大で測定する。グラフの傾きが，その瞬間までに回復した IPMDH の量を示す。

ちらの場合も，1 つのサブユニットは逆平行の β バレル構造からなり，それが 7 つ集まって中空のドーム状の構造を形成している。上部には直径約 10 Å の穴が開いている。NMR を使った研究から，シャペロニン 10 には，シャペロニン 60 と結合したときに固定される可変ループ部位があることが知られていた[29]。実際，ほとんどのサブユニットの可変ループは結晶構造中できちんとした構造をとっていなかったが，1 つだけは構造決定された[19]。それによると，可変ループはドームの底からさらに下部に張り出していて，シャペロニン 60 と相互作用できそうな位置にある。

III. シャペロニンの作用機構——どのようなメカニズムで折れたたみを制御するのか?

シャペロニンによる蛋白質の折れたたみを促進する反応は，2 つのステップに大きく分解できる。まず第 1 のステップは，折れたたみ中間体の捕捉である。蛋白質が変性状態 (denatured；D) から天然状態 (native；N) へ折れたたむ途中に出現する折れたたみ中間体*5 (folding intermediate；I) を，シャペロニンはすばやく捕まえるのである。不安定な折れたたみ中間体どうしの不可逆な凝集体形成 (aggregation；Agg) を阻止すること，これがシャペロニンの働きの本質と考えられている[30]。このステップにはシャペロニン 60 だけあればよい。第 2 のステップは，捕まえた折れたたみ中間体の放出である。放出には，ATP やシャペロニン 10 の助けが必要で，放出された折れたたみ中間体はさらに折れたたみ過程が進行して，天然状態の構造に至るものが出現する。以下に具体的に実験を解説しながら詳しくみてみよう。

1. 折れたたみ中間体の捕捉——迅速保護

シャペロニン依存蛋白質折れたたみの実験のやり方を図 4 に，その結果の一例を図 5 に示した[23]。図 5 の実

*5　シャペロニンに認識されて捕捉される折れたたみ中間体の実体は，まだ明らかではない。完全変性に近い状態，モルテン・グロビュール状態，もっと天然状態に近い状態，など多数の主張がある。そもそも，本当に折れたたみ中間体に結合するという確証があるわけではない。確かなことは，シャペロニンは天然状態の蛋白質とは結合しない，ということであり，したがって，シャペロニンは“非天然” (non-native) 状態の蛋白質に結合する，と表現すれば間違いがない。しかし，本稿のなかではわかりやすさを優先して“折れたたみ中間体”の名を使う。

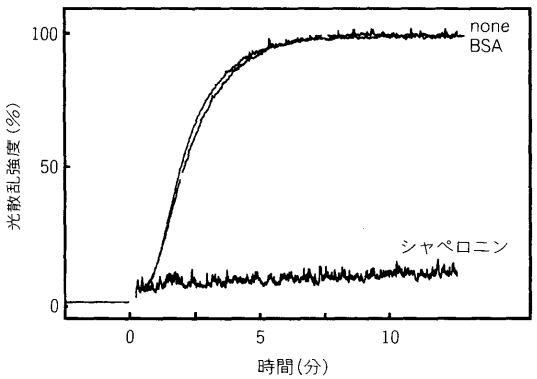

図 6　シャペロニンによる凝集体形成の抑制[31]
塩酸グアニジンで変性させたロダネーゼを時間 0 で希釈。none：希釈液に他の蛋白質が入っていない場合。BSA：ウシ血清アルブミンをシャペロニンの代わりに入れた場合(ATP は入っていない)。シャペロニン：好熱菌のシャペロニンを入れてある場合。温度はすべて 30℃。凝集体形成は光散乱強度の増大で追跡できる。シャペロニンがあると，凝集体形成が抑えられている。

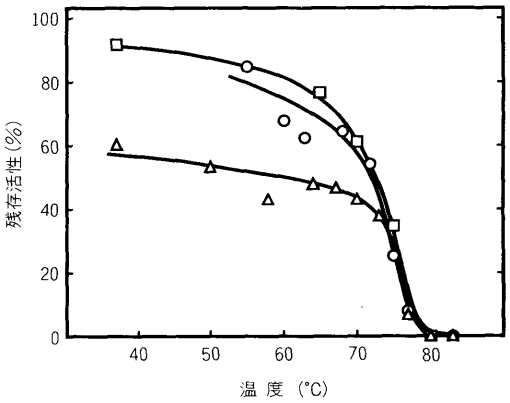

図 7　シャペロニンに捕捉された折れたたみ中間体の熱安定性[35]
好熱菌のシャペロニンと各酵素の折れたたみ中間体の複合体を，横軸に示した温度で 30 分保温したのち，不可逆的失活から免れた酵素活性を測定した。△：大腸菌イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素(この条件で天然状態の酵素が半分失活する温度は 58℃)，○：好熱菌乳酸脱水素酵素(同 65℃)，□：ロダネーゼ(同 53℃)。各酵素固有の熱安定性に関係なく，捕捉された折れたたみ中間体はシャペロニン自体が熱変性する温度(75℃付近)まで安全に保護されている。

験では，好熱菌のイソプロピルリンゴ酸脱水素酵素(IPMDH)をシャペロニンに対する基質蛋白質として使っている。また，希釈液は IPMDH の基質類をすべて含んでいるために，希釈後に折れたたんで IPMDH の酵素活性が出現してくる様子を分光器で連続的に追跡できる。まず，この条件下では，シャペロニンなしでも IPMDH は自発的に折れたたむことができる（図 5 ①)*6。希釈液中にシャペロニンと ATP があると，折れたたみは少し時間がたってから開始される(②)。希釈液中にシャペロニンだけを入れておくと，自発的に折れたたみできるはずの蛋白質でも，まったく折れたたみが進まなくなる(③)。シャペロニンによって折れたたみ中間体が捕捉され，そのままになっているのである。たとえていうなら，ここでのシャペロニンの作用は，自分で自立できる（折れたためる）ものまで抑え込んでしまう過保護な親のようなものであろう。

逆に自分で折れたためないときにはどうなるか。図 6 は，変性-希釈後に自発的に折れたたむことができず凝集体形成が起こりやすいロダネーゼを使った実験例である[31]。希釈液に何も入れないときやウシ血清アルブミンが入っているときには，変性ロダネーゼを希釈すると凝集体が生じるために光散乱の強度が上がっていく。しかし，ロダネーゼに対して等モル以上のシャペロニンがあるときには凝集体形成がほぼ完全に防がれる。

なお，相互作用はするのに安定に捕捉されないものもある。たとえばバルナーゼという酵素では，シャペロニンによって折れたたみの速度が遅くなるが捕捉はされない[32]。一般に分子量の小さな蛋白質(約 10 K 以下）の場合には完全に捕捉できなくなる傾向が強いようである。なお，シャペロニンが折れたたみ中間体の何を認識しているのか，という重要な問題に関しては本特集の桑島の項を参照されたい。

2．シャペロニンと折れたたみ中間体との複合体の性質——シェルター

シャペロニンは熱ショックなどで誘導されるストレス応答蛋白質である[3,4,10]。実際，シャペロニンは蛋白質の熱変性中間体を捕らえて，不可逆的な凝集体形成を防ぐことができる[33~35]。シャペロニンと共存させると，ある蛋白質の熱失活点を超えた温度でも失活しない例があるが，これはシャペロニンが蛋白質の熱力学的な

*6　自発的な折れたたみの速度や効率は用いる蛋白質，溶液の条件によって大きく異なる。一般に，温度や蛋白質濃度を高くすると，自発的な折れたたみが起こりにくくなる。たとえば IPMDH の場合 60℃以上では自発的に折れたためない。

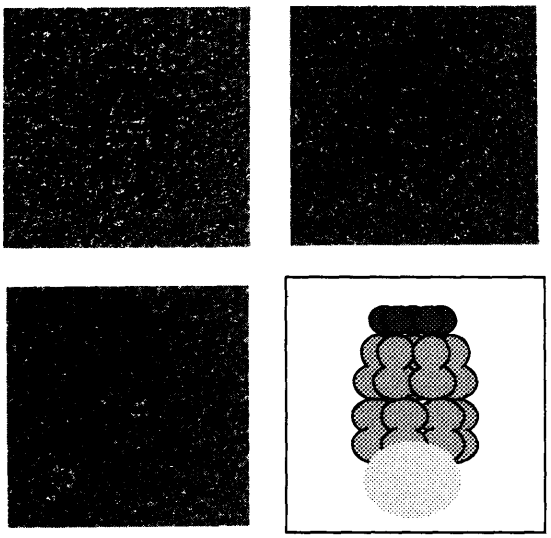

図 8　シャペロニン-折れたたみ中間体複合体に抗体（基質蛋白質に対するもの）を結合させたものの電子顕微鏡像[36]
ゲル濾過で単離した好熱菌シャペロニン-IPMDH の折れたたみ中間体に，IPMDH に対する抗体を結合させる。さらにゲル濾過でその複合体を単離し，電子顕微鏡で観察。抗体が弾丸型をしたシャペロニンの底部に結合していることがわかる。右下は電子顕微鏡像を模式的に表わした図。

安定性を高めたわけではない。図 7 は，熱安定性が異なる種々の酵素の折れたたみ中間体をシャペロニンに捕捉させたのちに，各温度で 30 分間保温し，残存活性を調べた実験である[35]。シャペロニンに捕らえられている間，折れたたみ中間体の安定性は，自分自身の固有の安定性とは無関係になり，シャペロニンの熱安定性にだけ依存するようになる。つまり，蛋白質の折れたたみ中間体はシャペロニンに捕捉されることによって，高温環境下でも生きのびることができたのである。

“シャペロニン-折れたたみ中間体”複合体はゲル濾過などで単離することも可能である。図 8 は，ゲル濾過で単離したそのような複合体に，基質蛋白質に対する抗体を結合させてから電子顕微鏡で観察した像である[36]。シャペロニンの弾丸型構造の下の部分にロケット噴射ガスのように見えるモヤモヤっとしたものが抗体で，弾丸の底のリング入口部分に折れたたみ中間体が結合していることを意味している。この場合，折れたたみ中間体はシャペロニンリングの奥深くにしまいこまれているわけではないことになる（追記参照）。

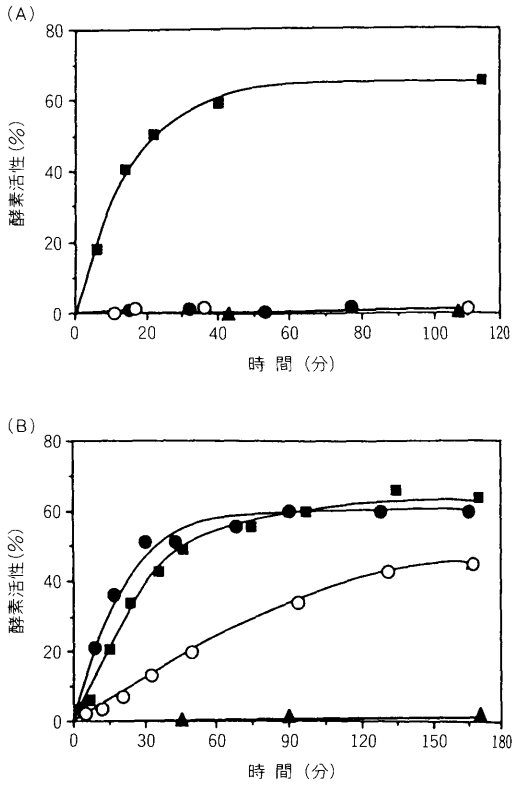

図 9　クエン酸合成酵素のシャペロニン依存折れたたみ
変性させたクエン酸合成酵素を希釈したのち，横軸に示した時間で一部を取って折れたたんだ酵素の活性を測定。(A) クエン酸合成酵素が自発的に折れたためない条件(35℃)。(B) クエン酸合成酵素が自発的に折れたためる条件(20℃)。●：自発的折れたたみ，○：GroEL＋ATP，■：GroEL＋GroES＋ATP，▲：GroEL。35℃では，GroEL，GroES，ATP がそろった場合のみ折れたたみができる。20℃では，GroES がなくても捕捉した折れたたみ中間体を遊離し，折れたたみが進行している。[文献 38 より改変]

3．捕捉した中間体の放出——自助幇助，自己実現補助[5]

折れたたみ中間体を捕捉しているシャペロニン 60 に，ATP とシャペロニン 10 を加えると，捕捉されていた中間体は遊離して折れたたみが再開される。たとえば，図 5 の③で，ATP を遅れて加えると，その時点から折れたたみ中間体が遊離し，酵素活性が回復してくる。図 5 の②のように，はじめから ATP が含まれている場合でも，折れたたみ中間体は，いったんシャペロニンに捕捉され，次に ATP による遊離が起こるものと考えられている。図 5 で用いている好熱菌のシャペロニンは，最初からシャペロニン 60 とシャペロニン 10 が一緒に

なっているため，シャペロニン10の独自の役割を調べることはできない。しかし，GroELとGroESを別々に用いた一連の研究から，基質として用いる蛋白質によっては，GroESなしでATPだけでよい場合，またATPの代わりにADPでも折れたたみが起こる場合などさまざまなケースがあった[37]。しかし，Viitanenらはこの一見バラバラのATP，シャペロニン10要求性は，基質蛋白質の側の問題であることを突き止めた[38]。図9は，クエン酸合成酵素の折れたたみを35°Cと20°Cで行なったものである。この酵素は35°Cでは自発的に折れたためないが，20°Cでは折れたためる。そして，自分で折れたためない条件(彼らはnon-permissiveな条件とよんでいる)では，GroELとATPとGroESのすべてが折れたたみに必須だが*7，自分で折れたためる条件(permissiveな条件)ではGroESは必ずしも必要ないことを証明した。これまで，さまざまな蛋白質でシャペロニン依存の折れたたみ実験が行なわれてきたが，そのほとんどはある特定の狭い条件下での実験であり，そのためヌクレオチドやシャペロニン10の要求性もみかけ上複雑になっていたのであろう。

4．作用機構仮説——カンガルーの袋か調整池か，はたまたやり直しモデルか?

上述のように，シャペロニンは蛋白質のnaive(未熟)な状態を守ってnative（天然状態）にする。どのようなメカニズムでシャペロニンは蛋白質の折れたたみを助けているのだろうか。さまざまなモデルがあり，まだ定説というものはない。筆者らは混乱しているシャペロニンの作用機構の仮説を3つに分けて考えている[39](図10)。

A．カンガルーの袋モデル

このモデルではシャペロニンの中で蛋白質の折れたたみが進行する。シャペロニンから遊離するときの折れたたみ中間体の構造(I_2)はシャペロニンに捕らえられたとき(I_1)とは違う状態になっている。I_2は，もう凝集体にはならず，シャペロニンに再結合もしないで，一路，天然状態に折れたたむだけである。

B．調整池モデル

シャペロニンは，凝集体になりやすい折れたたみ中間体の濃度を単に下げるだけでよい，と考える。凝集体形成はn次反応で濃度依存性が非常に高い。したがって，シャペロニンがATP加水分解に伴って中間体を徐々に放出すれば，溶液中のフリーの中間体濃度は上昇せず，凝集体形成は抑えられ，天然状態になりやすくなる。このモデルでは，シャペロニンと結合した中間体の折れたたみは，進行も後戻りもせず，停止している。buffer(緩衝液)モデルとよばれることもある。

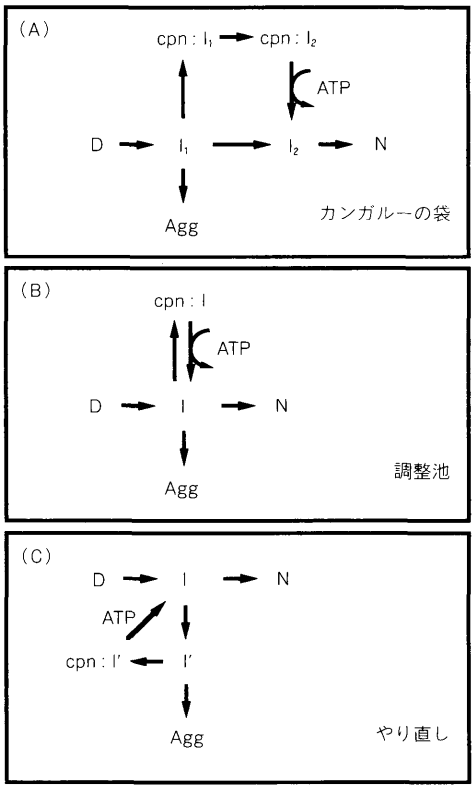

図10　シャペロニンの作用機構の3つのモデル
D：完全変性，I：折れたたみ中間体，N：天然状態，cpn：シャペロニン，Agg：不可逆的凝集体。シャペロニンに結合した状態で，折れたたみは，進行（A），停止（B），退行（C），する。

C．やり直しモデル

本来の折れたたみのルートから違うところに別種の中間体（kinetic trap：I′）があり，シャペロニンはそのI′を捕らえる。そして，そのI′を少しときほぐして変性させてもとの中間体(I)に戻してやる。言い換え

*7　どんな蛋白質の折れたたみにもシャペロニンは効果があるのか，とよく問われる。しかし，permissiveな条件が見つからない場合，すなわちどんな条件でも自発的な折れたたみができない（見つからない）蛋白質に関してはシャペロニンが効いた試しはおそらくない。“シャペロニンは自ら助くるものを助く”なのである。

ると，シャペロニンは違う方向に行きかけた折れたたみを後戻りさせて，もう1回折れたたみをやり直すチャンスを与える。このモデルは，シャペロニンから放出された中間体が再びシャペロニンに捕らえられるという点では調整池モデルに近い。

当初，カンガルーの袋モデルが華々しく唱えられていた[40]。しかし，シャペロニンから遊離した折れたたみ中間体は再びシャペロニンに捕らえられることを，複数のグループが証明した[39,41,42]。たとえば，筆者らは*N*-エチルマレイミド処理したGroEL（折れたたみ中間体を結合できるが，その後ATP，GroESを加えてもその中間体を放出しない）が，正常なGroELから放出された中間体を不可逆的に再結合することにより，折れたたみを阻害できることを示した[39]。少なくともシャペロニンの中で最後まで折れたたみが進行することはないであろう（追記参照）。

では，“調整池”と“やり直し”モデルではどうか。この両者を実験的に区別することは非常にむずかしい。“やり直し”モデルでは，シャペロニンが中間体を捕らえるとき，あるいは捕らえている間に，中間体の“変性”（I′→I）を伴う可能性が示唆されている[42,43]。しかし，シャペロニンに捕らえられた中間体の構造がさらにときほぐされるかどうかに関しては，まったく相反する報告がいくつもあり[32,44,45]，どうなっているかわかっていない。また，この問題はシャペロニンが蛋白質の何を認識しているのかという重要な問題とも密接に関係している。なお，前述した基質蛋白質が自分で折れたためる条件（permissiveな条件）では調整池モデルで説明可能であることが示唆されている[38]。

5．シャペロニンの4次構造と作用機構の関連——フットボールは必要か？

シャペロニン自身は，蛋白質の折れたたみを助ける際にどのような構造変化を起こしているのだろうか。上記の種々の作用機構仮説とも密接に関連しているが，この部分は現在最も激しい論争になっているところである。まず，いまの時点でもっともわかりやすい争点は，シャペロニンが機能する反応サイクルの途上でフットボール型の構造のステップを通るとするか[42]，いや，フットボール型シャペロニンは特殊な条件下でのみできるもので必須ではないと考えるか[46,47]，という点であろう。

フットボール仮説はLorimerらのグループが，シャペロニン（GroEL）のATP加水分解活性を詳細に解析した結果と電子顕微鏡解析をもとに提唱しているものである[42]。それによると，GroELの反応サイクルにGroESが入ると，GroELの折れたたみ中間体に対する親和性が協同的に切り替わり，途中にGroESがGroELの両側に結合したフットボール型シャペロニンを経由する。基質蛋白質は，シャペロニンのATP加水分解を伴う反応サイクルに途中乗車と下車をするだけで，何回もシャペロニンと結合-解離をくり返しながらやり直しモデルにしたがって天然状態に折れたたむ。

一方，Hartlらは，フットボール型シャペロニンは非生理的条件下でしか観察されないもので，シャペロニンの機能に必須ではない，と反論している[46,47]。さらに，本質的なところでのLorimerらとの違いは，折れたたみ中間体は

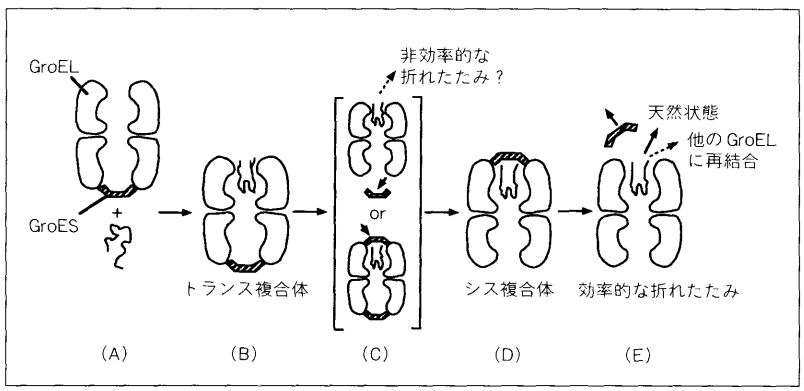

図11　シス複合体を含むシャペロニンの作用機構の仮説

弾丸型シャペロニン（A）が折れたたみ中間体を捕らえると，トランス複合体（B）ができる。そこにATPが加わると，シス複合体（D）ができる。シス複合体からはずれた折れたたみ中間体（E）は，効率的に折れたたむことができるが，他のGroELに再結合することも可能であろう。トランス複合体からシス複合体ができる過程はよくわからないが，途中にGroESが両側に結合したフットボール型シャペロニン（Cの下）を経由する可能性もある。トランス複合体から，そのままはずれた折れたたみ中間体（Cの上）は，うまく折れたたむことができない。［文献48より改変］

シャペロニンの反応サイクルを回すのに必須のもの，と考えているところである[40,47]。ATPだけを消費する空回りはないというわけである。

最近発表されたHorwichらの報告は，上記の論争を止揚する可能性を含む[48](図11)。シャペロニンと折れたたみ中間体の複合体は，従来，トランス複合体[GroESと折れたたみ中間体がGroELの反対側に結合している[36](図8)]のみ知られていたが，彼らはシス複合体(GroELの片方の同じリングにGroESと折れたたみ中間体が同時に結合)もできることを見いだした。シス複合体では，ドーム状のGroESが蓋のようになって折れたたみ中間体がGroELの外に出ないよう守っているらしい*8。さらに，そのシス複合体にATPを加えると，速くかつ効率的に折れたたみが起こること，トランス複合体からの折れたたみ効率は貧弱であることも示した。今後，このシス複合体の機能上の意味，蓋の下に入りきらないような大きな蛋白質の場合どうするのか，など再び議論が沸騰しそうである。

先にシャペロニンの形（4次構造）が生物種によって異なっていると述べた。この違いとシャペロニンの作用機構との関連も一つの焦点になっている。

最近筆者らは，好熱菌の弾丸型シャペロニンが，生理的な条件下でATPの加水分解に伴ってシャペロニン60の2層リングの真ん中から2つに分割することを見いだした（表紙参照）[49]。この分割現象とシャペロニンの作用機構サイクルとの関連は現在解析中であるが，少なくともこの現象が可逆的，すなわち分割-会合のサイクルのなかにあることはわかった。この分割現象は，そのダイナミックな構造変化の興味深さのみならず，種をこえたシャペロニンの作用機構を考えるうえでも大事かもしれない。なぜなら，2層リングのシャペロニン60（GroEL型）と1層リングのもの（ミトコンドリア型）を機能のうえで結びつけることが可能だからである。実際，最近Toddらは1層リングとして精製される嫌気性菌（*Thermoanaerobacter brockii*）のシャペロニン60がADP(またはATP)，シャペロニン10存在下で2層リングになることを見いだした[50]。シャペロニンの作用機構サイクルとその4次構造との関連は今後さらにおもしろい局面を迎えるだろう。

おわりに　*Nature*，*Science*，*Cell*誌などに続々と魅力的な仮説が登場するシャペロニンの世界は，シャペロニンの研究に直接かかわっていない第三者からみても興味深いものであるに違いない。これからの課題として，おもなものをあげてみよう。①どの作用機構モデルが真実なのか。4次構造との関係。②シャペロニンが認識する折れたたみ中間体の特徴は何か。③シャペロニン60とシャペロニン10の複合体，折れたたみ中間体を結合したままのシャペロニン60，ヌクレオチド結合型シャペロニン，などの構造解析。④細胞内でのシャペロニンの役割——細胞内においてシャペロニンの世話になっている蛋白質はどのくらいあるのか，熱ショック時に行なっていること，シャペロニンと共同作業している分子シャペロン，試験管内で見ている現象が細胞内での働きを反映しているのか，といった問題。いずれにしても今後の展開が楽しみである。

追　記　脱稿後に重要な論文が2つ出たので補足したい。いずれも，シャペロニンの作用機構におけるシス複合体（図11参照）の必要性を調べたものである。以下に述べるように，GroELの穴の中で折れたたみが進行する，ということは確定的になったといえよう。

Horwichらは，1層リングのGroEL突然変異体(SR1)を用いて，シス複合体が，実際にシャペロニンの作用機構のなかで重要であることを直接説明した[51]。SR1は折れたたみ中間体を結合することができて，さらに，ヌクレオチド存在下でGroESを結合できる。しかし，通常の2層リングは形成できない。また，結合したGroESはATPを加えても，もう解離しない。したがって，シス複合体に相当するものを安定に調整することができる。SR1にあらかじめ折れたたみ中間体を結合させておいたあとGroESとATPを加えると，すぐに折れたたみ中間体の構造の揺らぎが増大した。これは，シャペロニンの空洞の中で基質蛋白質がシャペロニンから遊離して，折れたたみが再開される様子を反映しているものと思われる。さらに数分のうちに，シャペロニンの空洞の中で完全に折れたたみが終了して，完成品になる。それは，基質蛋白質がシャペロニンに捕獲されたままの状態で酵素活性が出現したり，天然

*8　このとき分子量の大きい蛋白質だとシス複合体を形成できないらしい。

型の蛍光が回復したりすることから確認された。ただし，蛍光の偏光解消の解析からシャペロニンの空洞内にある天然状態の蛋白質は自由回転が制限されているらしい。

Hartl らの論文も基本的には上記のものと同様の内容で，やはり，シャペロニンの空洞の中で折れたたみが進行し完成するという結果を報告している[52]。

いずれにしても，シャペロニンの空洞はカンガルーの袋モデルとして働いている可能性が高くなってきた。では，図10で示した3つの作用機構のモデルのうち，カンガルーの袋以外は間違いなのであろうか？　ここで紹介した2つの論文では，他の作用機構モデルを否定しているわけではない。シス複合体を経由しない折れたたみ促進ルートももちろん存在している。ただ，シス複合体を経由するルートのほうが折れたたみの効率が断然よいようである。また，細胞内でのシャペロニン依存の折れたたみがどの経路でいくのかは，まだわかっていない。

シャペロニンの中で進行する折れたたみ経路は，自発的な折れたたみの場合と変わらないといわれている[53]。しかし，シス複合体経由の折れたたみが確認されたのはつい最近のことであり，今後，シャペロニンに依存した折れたたみの場合には，折れたたみ経路が自発的なものと違うケースも見つかるかもしれない。そうなったときには，Anfinsen のドグマの修正（訂正？）という“重大事態”になろう。

文　献

1) Anfinsen, C. B.：*Science,* **181**, 223-230 (1973)
2) Ellis, R. J., Hemmingsen, S. M.：*Trends biochem. Sci.,* **14**, 339-342 (1989)
3) Gething, M.-J., Sambrook, J.：*Nature,* **355**, 33-45 (1992)
4) Parsell, D. A., Lindquist, S.：*Annu. Rev. Genet.,* **27**, 437-496 (1993)
5) 伊藤維昭：蛋白質 核酸 酵素, **38**, 1089-1099 (1993)
6) 田口英樹・吉田賢右：生物物理, **33**, 11-14 (1993)
7) Gatenby, A. A., Viitanen, P. V.：*Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.,* **45**, 469-491 (1994)
8) Hartl, F. U., Hlodan, R., Langer, T.：*Trends. Biochem. Sci.,* **19**, 20-25 (1994)
9) Hemmingsen, S. M., Woolford, C., van der Vies, S. M., Tilly, K., Dennis, D. T., Georgopoulos, C. P., Hendrix, R. W., Ellis, R. J.：*Nature,* **333**, 330-334 (1988)
10) Zeilstra-Ryalls, J., Fayet, O., Georgopoulos, C.：*Annu. Rev. Microbiol.,* **45**, 301-325 (1991)
11) Georgopoulos, C. P., Hendrix, R. W., Casjens, S. R., Kaiser, A. D.：*J. Mol. Biol.,* **76**, 45-60 (1973)
12) Ishihama, A., Ikeuchi, T., Yura, T.：*J. Biochem.,* **79**, 917-925 (1976)
13) Hohn, T., Hohn, B., Engel, A., Wurtz, M., Smith, P. R.：*J. Mol. Biol.,* **129**, 359-373 (1979)
14) Hendrix, R. W.：*J. Mol. Biol.,* **129**, 375-392 (1979)
15) Barraclough, R., Ellis, R. J.：*Biochim. Biophys. Acta,* **608**, 19-31 (1980)
16) Reading, D. S., Hallberg, R. L., Myers, A. M.：*Nature,* **337**, 655-659 (1989)
17) Goloubinoff, P., Christeller, J.T ., Gatenby, A. A., Lorimer, G. H.：*Nature,* **342**, 884-889 (1989)
18) Braig, K., Otwinowski, Z., Hegde, R., Boisvert, D. C., Joachimiak, A., Horwich, A. L., Sigler, P. B.：*Nature,* **371**, 578-586 (1994)
19) Hunt, J. F., Weaver, A. J., Landry, S. J., Gierasch, L., Deisenhofer, J.：*Nature,* **379**, 37-45 (1996)
20) Mande, S. C., Mehra, V., Bloom, B. R., Hol, W. G. J.：*Science,* **271**, 203-207 (1996)
21) Fenton, W. A., Kashi, Y., Furtak, K., Horwich, A. L.：*Nature,* **371**, 614-619 (1994)
22) Viitanen, P. V., Lorimer, G. H., Seetharam, R., Gupta, R. S., Oppenheim, J., Thomas, J. O., Cowan, N. J.：*J. Biol. Chem.,* **267**, 695-698 (1992)
23) Taguchi, H., Konishi, J., Ishii, N., Yoshida, M.：*J. Biol. Chem.,* **266**, 22411-22418 (1991)
24) Ishii, N., Taguchi, H., Sumi, M., Yoshida, M.：*FEBS Lett.,* **299**, 169-174 (1992)
25) Azem, A., Kessel, M., Goloubinoff, P.：*Science,* **265**, 653-656 (1994)
26) Schmidt, M., Rutkat, K., Rachel, R., Pfeifer, G., Jaenicke, R., Viitanen, P., Lorimer, G., Buchner, J.：*Science,* **265**, 656-659 (1994)
27) Viitanen, P. V., Gatenby, A. A., Lorimer, G. H.：*Protein Sci.,* **1**, 361-369 (1992)
28) Horwich, A. L., Low, K. B., Fenton, W. A., Hirshfield, I. N., Furtak, K.：*Cell,* **74**, 909-917 (1993)
29) Landry, S. J., Zeilstra-Ryalls, J., Fayet, O., Georgopoulos, C., Gierasch, L. M.：*Nature,* **364**, 255-258 (1993)
30) Buchner, J., Schmidt, M., Fuchs, M., Jaenicke, R., Rudolph, R., Schmid, F. X., Kiefhaber, T.：*Biochemistry,* **30**, 1586-1591 (1991)
31) Taguchi, H., Makino, Y., Yoshida, M.：*J. Biol. Chem.,* **269**, 8529-8534 (1994)
32) Gray, T. E., Fersht, A. R.：*J. Mol. Biol.,* **232**, 1197-1207 (1993)

33) Höll-Neugebauer, B., Rudolph, R., Schmidt, M., Buchner, J.：*Biochemistry,* **30**, 11609-11614 (1991)
34) Martin, J., Horwich, A. L., Hartl, F.-U.：*Science,* **258**, 995-998 (1992)
35) Taguchi, H., Yoshida, M.：*J. Biol. Chem.,* **268**, 5371-5375 (1993)
36) Ishii, N., Taguchi, H., Sasabe, H., Yoshida, M.：*J. Mol. Biol.,* **236**, 691-696 (1994)
37) Lorimer, G. H., Todd, M. J., Viitanen, P. V.：*Phil. Trans. R. Soc. Lond. B,* **339**, 297-304 (1993)
38) Schmidt, M., Buchner, J., Todd, M. J., Lorimer, G. H., Viitanen, P. V.：*J. Biol. Chem.,* **269**, 10304-10311 (1994)
39) Taguchi, H., Yoshida, M.：*FEBS Lett.,* **359**, 195-198 (1995)
40) Martin, J., Mayhew, M., Langer, T., Hartl, F. U.：*Nature,* **366**, 228-233 (1993)
41) Weissman, J. S., Kashi, Y., Fenton, W. A., Horwich, A. L.：*Cell,* **78**, 693-702 (1994)
42) Todd, M. J., Viitanen, P. V., Lorimer, G. H.：*Science,* **265**, 659-666 (1994)
43) Burston, S. G., Sleigh, R., Halsall, D. J., Smith, C. J., Holbrook, J. J., Clarke, A. R.：*Ann. NY Acad. Sci.,* **672**, 1-9 (1992)
44) Lilie, H., Buchner, J.：*Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* **92**, 8100-8104 (1995)
45) Ranson, N. A., Dunster, N. J., Burston, S. G., Clarke, A. R.：*J. Mol. Biol.,* **250**, 581-586 (1995)
46) Engel, A., Hayer-Hartl, M. K., Goldie, K. N., Pfeifer, G., Hegerl, R., Müller, S., Silva, A. C. R. D., Baumeister, W., Hartl, F. U.：*Science,* **269**, 832-836 (1995)
47) Hayer-Hartl, M. K., Martin, J., Hartl, F. U.：*Science,* **269**, 836-841 (1995)
48) Weissman, J. S., Hohl, C. M., Kovalenko, O., Kashi, Y., Chen, S., Braig, K., Saibil, H. R., Fenton, W. A., Horwich, A. L.：*Cell,* **83**, 577-587 (1995)
49) Ishii, N., Taguchi, H., Sasabe, H., Yoshida, M.：*FEBS Lett.,* **362**, 121-125 (1995)
50) Todd, M. J., Walke, S., Lorimer, G., Truscott, K., Scopes, R. K.：*Biochemistry,* **34**, 14932-14941 (1995)
51) Weissman, J. S. *et al.*：*Cell,* **84**, 481-490 (1996)
52) Mayhew, M. *et al.*：*Nature,* **379**, 420-426 (1996)
53) Gray, T. E. *et al.*：*EMBO J.,* **12**, 4145-4150 (1993)

お知らせ

第1回 病態と治療におけるプロテアーゼとインヒビター研究会シンポジウム
プロテアーゼとインヒビターの最前線

日　時：平成8年8月20日(火) 9：30～17：30
会　場：愛知県医師会館（名古屋市）
代表世話人：友田　豊（名大医）
研究会事務局：名古屋市昭和区鶴舞町65
名古屋大学医学部産婦人科学教室
FAX 052-744-2268

お知らせ

第6回 日本動物細胞工学会大会

日　時：平成8年7月4日(木)・5日(金)
会　場：東京農工大学（〒183 東京都府中市幸町3-5-8）

◆7月4日（木）
特別講演　昆虫脳神経ペプチド類の化学
鈴木昭憲（東大）
シンポジウム：バイオ医薬品の発見から特許取得・生産まで
オーガナイザー：進　和男(明治乳業)・飴谷章夫(東大)
in vivo 細胞増殖法による医薬品開発――大量生産と新規生理活性物質へのアプローチ
谷本忠雄（林原生化研）
ヒトナトリウム利尿ペプチドの製造プロセスの開発
大島武博（サントリー）
動物細胞による医薬品大量生産の実際
菅谷真二（キンリンビール）
流動床技術を用いた動物高密度細胞培養法とクロマト分離法　杉浦治彦（ファルマシアバイオテク）
バイオ医薬品と特許戦略　清水初志（清水国際特許）

◆7月5日（金）
シンポジウム 2：細胞の機能・老化・寿命の食品・生体成分による調整
オーガナイザー：矢ケ崎一三（東農工大)・白畑實隆（九大）
アミノ酸による細胞機能の修飾　矢ケ崎一三（東農工大）
小腸上皮細胞と脂肪酸との相互作用　伏木　亨（京大）
食細胞機能と食品成分　山崎正利（帝京大）
細胞の老化・不死化・癌化とテロメラーゼ
井出利憲（広島大）
細胞分化とテロメラーゼ活性制御　片倉喜範（九大）
要旨提出締切：6月7日（予定）
参加費：会員無料，非会員3,000円
申込先：〒305 つくば市観音台2-1-2
農水省食品総合研究所微生物制御研究室　一色賢司
FAX 0298-38-7996　Tel.0298-38-8067