

氏名	谷口雅昭
学位の種類	博士(工学)
学位記番号	甲第175号
学位授与年月日	平成17年 3月18日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	シャペロニン GroEL の機能発現におけるドメイン構造変化の速度論的解析
学位論文審査委員	(主査) 河田康志 (副査) 和泉好計 築瀬英司 溝端知宏

学位論文の内容の要旨

生命の体を構成するタンパク質は、ユニークな立体構造を形成することで様々な機能を発揮することができる。新規に合成されたタンパク質がフォールディングする際、正しい立体構造の形成を導く役割を持つ分子シャペロンと呼ばれるタンパク質が存在することが知られ、タンパク質の一生に深く関わっていることが明らかになっている。この分子シャペロンの一種である大腸菌由来のシャペロニン GroEL は、同一サブユニット7個がリング状に並び、更にこのリング2個が背を向かい合わせた巨大な14量体のダブルリング構造を形成している。GroEL は、リング内部にできる巨大な空間に変性タンパク質分子を結合する。その後、ATP と補助シャペロニン GroES が GroEL に結合することにより変性タンパク質はカプセル化され、安全にフォールディングを完了させる環境が整えられる。GroEL は、数多くのコンフォメーション変化を引き起こすことで様々なタンパク質のフォールディングを補助していることが知られている。しかしながら、GroEL サブユニットを構成する3つのドメイン（エカトリアル、インターメディアイト、アピカル）がどのような動きを見せるのか明らかになっていない。特に、変性タンパク質や GroES と結合する GroEL アピカルドメインは、ATP 結合から加水分解を生じるまでの間に大規模な構造変化を起こしているとされ、シャペロニン GroEL の分子メカニズムにおいて重要な役割を担っていると考えられる。

本研究では、シャペロニン GroEL のアピカルドメインの構造変化を捉える目的で、蛍光プローブとして働くアミノ酸のトリプトファンを遺伝子変異置換により導入した変異体 GroEL R231W を作成し、ストップフローを用いて蛍光強度変化を指標とした速度論的な解析を行った。研究の結果、以下のことが明らかとなった。

1. 変異体 GroEL R231W の特徴

変異体 GroEL R231W の基礎的な特徴を調べるため、様々な基質タンパク質のリフォールディング実験を行った結果、非常に厳密に GroES と ATP を要求する基質タンパク質のリフォールディングを補助することができ、野生型 GroEL と同等の機能を保持していた。また、この変異体 GroEL は大腸菌の生育を補助できたことから、*in vivo* においても野生型と同様に機能発現することが確認できた。

2. ATP 結合によって引き起こされる GroEL の構造変化

蛍光ストップフローによる測定を行ったところ、変異体 GroEL R231W において ATP の結合に伴いアピカルドメインの動きに由来する複数の蛍光強度変化を観測することができた。まず実験開始直後に、非常に速い蛍光強度の増加 (Phase A)、次に蛍光強度の減少 (Phase B)、再びゆっくりとした蛍光強度の増加 (Phase C) が見られ、速度論的に 3 つの反応成分に分けることができた。特に Phase B で見られる構造変化の見かけの反応速度定数は、様々な ATP 濃度での測定を行ったところ 2 つのシグモイド性を示す ATP 濃度依存性が確認された。これは Phase B が、GroEL のリング内及びリング間の協同的な構造変化を反映していると考えられた。更に GroES 存在下では、GroES の結合を反映した新たな蛍光増加を観測することができた。Phase B と GroES 結合による蛍光増加との関係を調べたところ、両者とも GroEL のアピカルドメインという共通の部位において起きている反応であると推定されたにも関わらず、互いに干渉し合わない、独立した現象であることが判明した。

3. シングルリング変異体 GroEL SR1/R231W が示す構造変化

シングルリング変異体 GroEL SR1 に対して R231W の蛍光プローブを導入し蛍光ストップフロー解析を行ったところ、シングルリングにおいても同様に 3 つの反応成分を持つ蛍光強度変化が観測された。更に、シングルリング変異体においても GroES との結合に由来する蛍光強度の増加を観測することができた。再び Phase B と GroES との結合に由来する蛍光強度の増加との関係を調べたところ、互いに独立して起きていることが明らかとなり、GroES の結合機構の複雑さを示唆する実験結果が得られた。興味深いことに、シングルリング変異体において Phase B で見られる構造変化の見かけの速度定数の ATP 濃度依存性を調べたところ、2 つのシグモイド性を示す ATP 濃度依存性を保持していることが明らかとなり、このことから、GroEL の 4 次構造を大規模に変化させても、GroEL のアピカルドメインの動きと GroEL サブユニット同士の協同性に関する性質は、ほとんど影響を受けないことが示された。

以上より本研究では、変異体 GroEL R231W が、アピカルドメインに生じる様々な動きを捉えることができる有効な変異体であることを示し、更に非常に複雑なタンパク質であるシャペロニン GroEL の機能メカニズムを支える重要な構造変化に関する新たな知見を得ることに成功した。

論文審査の結果の要旨

分子シャペロンは生体内の様々な蛋白質の働きを構造的に維持する重要な蛋白質である。シャペロン GroEL/GroES は、大腸菌内に存在する主要な分子シャペロンである。GroEL のアピカルドメインは、基質蛋白質や補助シャペロン GroES と結合し ATP 結合により大規模な構造変化を起こす。GroEL の機能発現機構を理解する上で重要なアピカルドメインの構造変化を捉える目的で、蛍光プローブとしてトリプトファンを導入した変異体 R231W を作成し、ストップフローを用いて速度論解析を行い、以下のことを明らかにした。

1. 変異体 GroEL R231W の基礎的な特徴を調べるため、様々な基質蛋白質の再生実験を行った結果、野生型 GroEL と同等の機能を保持していることが分かった。さらに、この変異体 GroEL は、大腸菌の生育を補助できることから、*in vivo*においても機能発現することが確認できた。
2. 蛍光ストップフロー実験から、ATP の結合に伴ったアピカルドメインの動きに由来する蛍光変化 (Phase A, B と C) を観測することに成功した。特に Phase B の速度定数は、2つのシグモイド性を示す ATP 濃度依存性が確認され、GroEL のリング内及びリング間の協同的な構造変化を反映していると考えられた。更に GroES の結合を反映した新たな蛍光増加を観測することができた。Phase B と GroES 結合との関係を調べたところ、互いに干渉し合わない、独立した現象であることが判明した。
3. シングルリング変異体 GroEL SR1/R231W においても同様の蛍光変化が観測された。更に、GroES との結合に由来する蛍光増加も観測することができた。興味深いことに、シングルリングにおいても Phase B の2つのシグモイド性を示す ATP 濃度依存性を保持していることが明らかとなった。すなわち GroEL の4次構造を大規模に変化させても、GroEL のアピカルドメインの動きとサブユニット同士の協同性に関する性質は、ほとんど影響を受けないことが示された。

上記の結果は分子シャペロンの機能解析を行う上で非常に重要でかつ最初の知見である。よって、本論文は博士 (工学) に値するものと判定する。