

氏名	よしみ たつなり 吉見達成
学位の種類	博士（再生医科学）
学位記番号	甲第9号
学位授与年月日	平成18年 3月10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	Multiple structural transitions of the GroEL subunit are sensitive to intermolecular interactions with cochaperonin and refolding polypeptide (GroELサブユニットの複数の構造遷移は GroES や基質蛋白質との分子間相互作用に対して感受性を示す)
学位論文審査委員	(主査) 押村光雄 (副査) 畠義郎 河田康志

## 学位論文の内容の要旨

シャペロニン GroEL は GroES と複合体を形成し、その複合体内部に生じる外部環境と隔絶された空間を基質蛋白質に提供することで、凝集体形成を抑制する。GroEL は基質蛋白質の結合・内腔内への放出・解離といった一連のプロセスを、複数のアロステリックな構造遷移によって成していると報告されている。しかし、GroES や基質蛋白質と直接相互作用する GroEL 頂上メインの構造遷移に関する知見は極めて少ない。そこで頂上ドメインにトリプトファン(Trp)残基を導入した変異体 GroEL R231W を用いて、頂上ドメインの構造遷移と機能発現機構との相関関係を Stopped-flow 測定により速度論的に解析した。本研究の成果は以下の3点である：1) GroES および基質蛋白質が GroEL のアロステリックな構造遷移に及ぼす影響を調べた。2) 化学修飾により基質蛋白質解離反応を抑制した GroEL R231W を作製し、1)と比較することで、解離反応に対応する構造遷移を同定した。3)頂上ドメインに結合した基質蛋白質の解離過程を蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) 測定により観察し、GroEL の複数の構造遷移それぞれの機能的意味付けを行った。

## 方法

GroEL 頂上ドメインの構造遷移の検出は、GroEL R231W 変異体の導入した Trp 残基の蛍光を指標にした Stopped-flow 蛍光測定により行った。得られたデータは1次速度式で解析し速度定数を導いた。各構造遷移のより詳細な特徴は、ATP 濃度滴定実験を行い、協同性を評価するヒル式により解析した。基質蛋白質にはリフォールディングに GroEL/GroES/ATP が必須な蛋白質である pig-heart MDH を用いた。実験1)では、基質蛋白質および GroES の存在・非存在下で測

定を行った。実験 2)では、GroEL R231W を N-ethylmaleimide(NEM)で化学修飾することにより作製した、GroEL R231W の基質蛋白質解離反応抑制型改変体を用いた。実験 3)では、ドナー分子に GroEL R231W に導入した Trp 残基を、アクセプター分子には AEDANS 修飾した酸変性 wild-GroEL を用いて FRET を測定した。

## 結 果

GroEL R231W により観察される GroEL 頂上ドメインのアロステリック構造遷移は、ATP 結合により 4 相(反応速度定数の大きい順に Phase A, B, C, D)、GroES の結合によって引き起こされる 1 相(Phase S)の計 5 相が観測された。この内、Phase C および D のみが基質蛋白質の結合による影響を受けた。また、Phase C では Rate のみ 25%減速されたが、Phase D では Rate /Amplitude 両方が完全に抑圧された、という異なる効果が認められた。興味深いことに、基質蛋白質の結合による Phase C への影響は、GroES の結合により解消された。

NEM 修飾により基質蛋白質の解離反応が抑制されるよう改変した GroEL では、Phase B に対応する構造遷移が極めて抑制され、また、温度感受性を示すようになった。

GroEL R231W-AEDANS 修飾基質蛋白質間の FRET 測定において、設計通り、基質蛋白質の解離に伴う素過程が観測された。さらに ATP 濃度滴定実験を行ったところ、この過程は ATP 濃度に対し協同性を示した( $K_{1/2 \text{ fast}}=131 \pm 6.6 \mu\text{M}$ ,  $n_{\text{fast}}=2.0 \pm 0.2$ )。

## 考 察

GroEL 頂上ドメインへの基質蛋白質結合の影響を受けた 2 種の構造遷移の内、Phase D は apo-GroEL のみが示す構造遷移であり、GroEL の反応サイクルとは直接関係ないことが示唆された。また、もう 1 つの Phase C は GroES の結合により抑制が解かれたことから、GroES は GroEL-GroES 複合体において基質蛋白質を隔離する蓋の役割を果たすだけでなく、GroEL の構造遷移に積極的に関与し、GroEL と基質蛋白質間の分子間相互作用を調節・補助していると考えられた。

FRET で観測した解離反応の素過程の協同的な振舞いは、5 相の頂上ドメイン構造遷移の内、唯一協同性を示す Phase B の値( $K_{1/2 \text{ fast}}=154 \pm 42 \mu\text{M}$ ,  $n_{\text{fast}}=1.6 \pm 0.4$ )と極めて類似していた。また、NEM 修飾を用いた実験結果からも、基質蛋白質の解離過程と Phase B に関連性が認められた。これらの結果から、基質蛋白質放出過程に先立つ、頂上ドメインの基質蛋白質結合部位から内腔内側への転置過程に、Phase B に対応するサブユニット再配置を反映した構造遷移が関与していることが示唆された。

## 結 論

GroEL の複数のアロステリック構造遷移と機能発現機構との相関関係、ならびに GroES や基質蛋白質との分子間相互作用の影響についての新たな知見を得た。本研究により、GroEL の分子動態の概観がより詳細に明らかになったことで、シャペロン機能改変を目的とした変異体設

計に向けて、より直接的な戦略を取り得るようになると期待される。

## 審 査 結 果 の 要 旨

本研究は大腸菌由来シャペロニン GroEL の機能発現機構を構造変化の側面から理解すべく、GroEL の構造変化に及ぼす GroES や基質蛋白質との分子間相互作用の影響を、Stopped-flow 装置を用いた速度論的手法により検討したものである。その結果、GroEL 頂上ドメインに生じる一連の構造変化が基質蛋白質解離機構に則して特徴付けられ、そしてまた、複数の構造変化が GroES や基質蛋白質の結合によって敏感に変化することが明らかとなった。本論文の内容はシャペロニン機能学において、GroEL の分子動態における分子間相互作用の重要性を示すものであり、明らかに学術水準を高めたものと認める。