

平成 21年 2月

町田幸大 学位論文審査要旨

主 査 畠 義 郎
副主査 押 村 光 雄
同 河 田 康 志

主論文

Hydrophilic residues ⁵²⁶KNDAAD⁵³¹ in the flexible C-terminal region of the chaperonin GroEL are critical for substrate protein folding within the central cavity

(シャペロニンGroELの柔軟性の高いC末端領域に存在する親水性残基⁵²⁶KNDAAD⁵³¹がGroEL空洞内での基質タンパク質の立体構造形成において重要である)

(著者：町田幸大、岡田茜、本郷邦広、溝端知宏、河田康志)

平成20年 The Journal of Biological Chemistry 283巻 6886頁～6896頁

学 位 論 文 要 旨

Hydrophilic residues ⁵²⁶KNDAAD⁵³¹ in the flexible C-terminal region of the chaperonin GroEL are critical for substrate protein folding within the central cavity

(シャペロニンGroELの柔軟性の高いC末端領域に存在する親水性残基⁵²⁶KNDAAD⁵³¹がGroEL空洞内での基質タンパク質の立体構造形成において重要である)

GroELはATP存在下において補因子であるGroESと結合することで、立体構造の壊れたタンパク質を選択的に包括化するセントラルキャビティと呼ばれる親水性の空洞を形成する。GroELはこの空洞の中でタンパク質の立体構造形成を介助・促進する機能を保持している。この機構において構造的自由度の高いアミノ酸23残基 (⁵²⁶KNDAADLGAAGGMGGMGGMGGMM⁵⁴⁸) で構成されるGroELのC末端が担う役割を明らかにするために十数種類のC末端欠損変異体を作成した。それらの詳細な機能解析により、⁵²⁶KNDAAD⁵³¹配列が示す親水性が注目された。そこで、526-531番目の配列のみを中性 (⁵²⁶GGGAAG⁵³¹) あるいは疎水性 (⁵²⁶IGIAAI⁵³¹) を示すアミノ酸に置換した変異体を作成した。これら変異体は*in vitro*、*in vivo* の両方においてタンパク質の立体構造形成を介助・促進する能力が野生型 GroELよりも大幅に低下していた。さらに、526-531番目のアミノ酸の配列を並び替えた (⁵²⁶NKADDA⁵³¹) 変異体とこの配列を別のアミノ酸に置換した (⁵²⁶RQEGGE⁵³¹) 変異体を作成し (どちらも野生型 GroELと同等の親水性を示す) 詳細に機能解析を行った結果、⁵²⁶KNDAAD⁵³¹配列の重要性はその領域が示す親水性にあることが明らかになった。すなわち、野生型 GroELのC末端に存在する⁵²⁶KNDAAD⁵³¹配列にはタンパク質の立体構造形成の場であるセントラルキャビティ内部の環境を親水性に保つ役割があり、これによりGroELは様々なタンパク質の立体構造形成を介助・促進する能力を発揮できることを初めて明らかにした。

方 法

GroELのC末端欠損変異体はQuikChange法を利用し、任意の部位のアミノ酸コドンをストックコドンに置換することにより作成した。まずC末端アミノ酸の欠損が、GroELが基質タンパク質の立体構造形成 (フォールディング) を介助する「機構」に与える影響を調べるためにその原動力であるATP加水分解活性の測定を行った。次にC末端アミノ酸の欠損がGroELのフォールディング介助能力「発現」に与える影響を調べるために、分子の大きさ・

フォールディング速度・フォールディング反応のGroELへの依存性に明らかな違いがある5種類の基質タンパク質を選択しリフォールディング実験を行った。さらにGroELのフォールディング介助能力発現における⁵²⁶KNDAAD⁵³¹配列が示す親水性の重要性を明らかにするために、この配列を中性 (⁵²⁶GGGAAG⁵³¹) や疎水性 (⁵²⁶IGIAAI⁵³¹) アミノ酸に置換した変異体、及び、それぞれ野生型と同等の親水性を示すがアミノ酸配列を並び替えた (⁵²⁶NKADDA⁵³¹) 変異体と別のアミノ酸に置換した (⁵²⁶RQEGGE⁵³¹) 変異体を作成し、C末端欠損変異体と同様の *in vitro* 機能解析実験に加えてGroEL欠損株を利用した *in vivo* 機能解析実験を行った。

結 果

様々な基質タンパク質のリフォールディング実験により、dC531 (17残基欠損変異体) まで保持されていた野生型と同等のフォールディング介助能力がdC525 (23残基欠損変異体) では大幅に低下することが明らかになった。C末端欠損変異体dC531とdC525の違いはアミノ酸⁵²⁶KNDAAD⁵³¹配列の有無であり、アミノ酸の疎水性・親水性指標からこの配列は高度に親水性を示すことが明らかになった。そこで野生型 GroELの⁵²⁶KNDAAD⁵³¹配列のみを中性 (⁵²⁶GGGAAG⁵³¹) と疎水性 (⁵²⁶IGIAAI⁵³¹) に置換した変異体を作成した。これら変異体のフォールディング介助能力は、それぞれdC525と同等か完全に失われており⁵²⁶KNDAAD⁵³¹配列が示す親水性の重要性が明らかになった。最後に、⁵²⁶KNDAAD⁵³¹配列を構成するアミノ酸残基それ自体や並び順、或いはその領域が示す親水性のどちらが重要なのかを明らかにするために、アミノ酸残基を並び替えた (⁵²⁶NKADDA⁵³¹) 変異体と別のアミノ酸に置換した (⁵²⁶RQEGGE⁵³¹) 変異体を作成した。これらのフォールディング介助能力、及び、*in vivo* におけるGroEL補完能力は野生型 GroELと全く同等であった。すなわち、C末端アミノ酸23残基の中でも特に⁵²⁶KNDAAD⁵³¹配列には基質タンパク質のフォールディングの場であるセントラルキャビティ内部の環境を親水性に保つ役割があり、その親水性が大腸菌由来シャペロニンGroELの基質タンパク質フォールディング介助能力発現において最も重要な因子であることを初めて明らかにした。

考 察

C末端欠損変異体dC541、dC531、dC525のATP加水分解活性 (GroELがフォールディング介助能力を発現するための原動力) が野生型の半分に低下したことから、C末端、特に532番目以降に存在するアミノ酸17残基 (⁵³²LGAAGGMGGMGMGM⁵⁴⁸) の役割はGroELのフォールディング介助能力発現機構を調節することであると示唆された。一方、フォールディングがセントラルキャビティ内部への包括化に強く依存する基質タンパク質のリフォールディン

グ実験から、526-531番目に存在する⁵²⁶KNDAAD⁵³¹配列の重要性はアミノ酸それ自体や並び順ではなく、その領域が示す親水性にあることが示唆された。言い換えると、526-531番目に存在する⁵²⁶KNDAAD⁵³¹配列がフォールディングの場であるセントラルキャビティ内（底部）に親水性の環境を提示することで変性タンパク質のフォールディング反応を介助・促進していると考えられる。

結 論

GroELのC末端アミノ酸23残基（⁵²⁶KNDAADLGAAGGMGGMGGMGM⁵⁴⁸）は、ある決まった立体構造を形成していないにも関わらず、前半部分6残基（⁵²⁶KNDAAD⁵³¹）と後半部分17残基（⁵³²LG AAGGMGGMGGMGM⁵⁴⁸）に分かれてそれぞれ特有の役割を保持していると考えられ、それらが高次構造を形成するGroEL全体の機能発現や機構調整を行っているという非常に興味深い知見を得た。