

平成22年2月

野井健太郎 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

A potentially versatile nucleotide hydrolysis activity of group II chaperonin monomers from *Thermoplasma acidophilum*

(*Thermoplasma acidophilum* 由来単量体グループII型シャペロニンの潜在的な多種ヌクレオチド加水分解活性)

(著者：野井健太郎、平井秀憲、本郷邦広、溝端知宏、河田康志)

平成21年 Biochemistry 48巻 9405頁～9415頁

学 位 論 文 要 旨

A potentially versatile nucleotide hydrolysis activity of group II chaperonin monomers from *Thermoplasma acidophilum*

(*Thermoplasma acidophilum* 由来単量体グループII型シャペロニンの潜在的な多種ヌクレオチド加水分解活性)

古細菌シャペロニンであるサーモソームはグループII型シャペロニンに分類されるが、詳細な機能メカニズムの多くはまだ解明されていない。著者らは α 、 β サブユニット2種類から構成される古細菌*Thermoplasma acidophilum*由来シャペロニンをモデル蛋白質とし、グループII型シャペロニンの機能発現メカニズムの解明を試みた。シャペロニンは、オリゴマー構造がATP加水分解に伴う構造変化により基質蛋白質をfoldingすることが報告されている。著者らはオリゴマー構造だけでなく、単量体のシャペロニンでもATP加水分解活性を有していることを明らかにした。また、ATP以外の様々なヌクレオチド、さらにAMPの加水分解活性も有することを初めて明らかにした。ヌクレオチド加水分解にとって重要なアミノ酸であるAsp残基をAla残基に置換した変異体の解析や、ヌクレオチド加水分解活性の特徴について様々な方法を用いて解析することにより、単量体シャペロニンも Co^{2+} 、 Mn^{2+} 存在下でヌクレオチド加水分解活性を有することを証明した。また、古細菌*T. acidophilum*菌体内においても単量体シャペロニンが存在すること、さらにこの単量体シャペロニンがAMP加水分解活性を有することを明らかにした。

方 法

α 、 β サブユニットを各々クローニングし、大腸菌を用いた大量培養系を作製した。各サブユニットの精製を行い、単量体シャペロニンを得た。遊離リン酸を検出するマラカイトグリーン法を用いてヌクレオチド加水分解活性測定を行った。次にATP加水分解に重要なAsp残基をAla残基に置換した変異体を作製した。変異体のヌクレオチド加水分解活性の測定を行った。次に単量体シャペロニンのヌクレオチド加水分解機構を明らかにするために、陰イオン交換カラムを用いて生成されるヌクレオチドの同定を行った。*T. acidophilum*菌体内の単量体シャペロニンの有無を検出するために、各サブユニットの基質認識機構に関与するアピカルドメインの抗体を作製した。この抗体を用いて単量体シャペロニンを検出し、さらにこの単量体シャペロニンの精製を行い、AMP加水分解活性測定を行った。

結 果

マラカイトグリーン法を用いた測定により、 α 、 β サブユニット単量体シャペロニンと共に、全てのヌクレオチド加水分解活性測定において Co^{2+} 存在下、測定温度 55°C で最も高い活性を示すことを明らかにした。次に加水分解活性に重要なAsp残基をAla残基に置換した変異体のヌクレオチド加水分解活性測定を行ったところ、変異体のヌクレオチド加水分解活性は、野生型と比較して大幅に低下した。したがってこれらのヌクレオチド加水分解は、単量体シャペロニン由来であることが明らかになった。さらに単量体シャペロニンのヌクレオチド加水分解活性機構を解明するため、反応中に生成するヌクレオチドを直接HPLCで同定した。各ATP、ADP、AMPピークは、測定時間の経過と共に減少し、逆にアデノシンのピークが増加した。この結果、各ヌクレオチドは最終的にアデノシンまで加水分解されることが分かった。また、ATP、ADPのアナログを用いた測定により、単量体シャペロニンはATPの γ 位のリン酸から α 位の方向に順に加水分解するエキソ触媒活性を有していることを明らかにした。さらにアピカルドメインの抗体を用いて、古細菌菌体内に単量体シャペロニンが内在的に存在していること明らかにし、その分子種を含む画分のAMP加水分解活性測定を行ったところ、AMP加水分解活性を検出することができた。この結果、古細菌*T. acidophilum*菌体内の単量体シャペロニンがAMP加水分解活性を有していることを初めて明らかにした。

考 察

グループII型単量体シャペロニンがヌクレオチド加水分解活性を有していることは、グループI型単量体シャペロニンのこれまでの研究とは大きく異なる結果であった。グループII型シャペロニンは、真核生物・古細菌に幅広く存在が確認されており、バクテリアやミトコンドリア内に存在しているグループI型シャペロニンよりも多機能性を有しているのではないかと考えられる。またヌクレオチドの種類に限定されず、様々なヌクレオチドを加水分解したことから、単量体シャペロニンはリン酸を多く産出するために加水分解を行っているとも考えられる。*T. acidophilum*は強酸下で生育しているが、その菌体内の多くの蛋白質・酵素の至適pHは中性付近であることがわかっている。従って、単量体シャペロニンはヌクレオチドを加水分解し、多量のリン酸を産出することで菌体内のpH環境を整えているとも考察できる。

結 論

古細菌由来単量体シャペロニンは、これまで考えられてきたシャペロニンの機能とは大

大きく異なったヌクレオチド加水分解活性を有していた。これらの結果は、グループII型の単量体シャペロニンの存在意義の重要性を裏付けるものである。