

(様式 2)

## 学位論文の概要及び要旨

氏 名 水田 敏史 印

題 目 シャペロニン GroEL の構造変化に伴う動的プロセスに関する研究

### 学位論文の概要及び要旨

シャペロニン GroEL は大腸菌の生存に必要なシャペロニンタンパク質であり、そのアミノ酸配列は他の生物種に由来するシャペロニンにおいてもよく保存されている。GroEL は 7 量体リングが背中合わせに重なった 14 量体ダブルリングを形成し、2 つのリングの中にはかご状の空間が存在する。GroEL は ATP の結合により立体構造を変化させ、コシャペロニン GroES が蓋をすることで外部と隔離された空間を形成し、主にこの空間の中でタンパク質の折りたたみを補助する。次に GroEL が ATP を加水分解すると、GroES が解離し、基質タンパク質が放出される。2 つのリングは協奏的に働き、ATP が結合し反応を行う側のリング（シスリング）、反対側のリング（トランスリング）において、交互に反応が繰り返される。GroEL のサブユニットは基質タンパク質との結合に関与するアピカルドメイン、ATP やリング間の結合に関与するエカトリアルドメイン、ドメイン間を繋ぐインターミィディエイトドメインの 3 つのドメインで構成され、アピカルドメインは 3 つのドメインの中で最もダイナミックにその構造を変化させる。

これまでに、我々の研究グループではアピカルドメインに存在する 231 番目のアルギニン残基をトリプトファンに置換した変異体 (GroEL RW) を用いたストップト・フロー蛍光分析により、GroEL に ATP 及び GroES が作用することで、5 つの素過程からなる構造変化を引き起こすことを確認している。しかしながら、これらの過程が GroEL サブユニットのどのような構造変化を反映しているかは詳細に解明されていない。そこで、本研究では、ストップト・フロー解析で同定された各過程の構造変化、機能的役割を解明することを目的とし、GroEL における「サブユニットを構成するドメイン間の繋がり」、「2 つのリングが形成する四次構造」、そして「ATP 加水分解活性」の各側面に注視した GroEL RW を出発点にして作成した新たな変異体のストップト・フロー蛍光分析を行った。

GroEL の「サブユニットを構成するドメイン間の繋がり」を評価するため、ドメインをつなぐポリペプチド鎖を途中で切断することのできる円順列変異法を用いた。円順列変異体 (GroEL CP86) ではエカトリアルドメインとインターミィディエイトドメインの間にポリペプチド末端を移動させたため、この 2 つのドメインをつなぐ 1 本の主鎖が切断された状態を模している。次に、「2 つのリングが形成する四次構造」を評価するにあたっては、シングルリング変異体 (GroEL SR1) を用いた。GroEL SR1 は本来 2 重リング、14 量体の GroEL が 7 量体のシングルリングを形成し、シスリング、トランスリングの協奏的な働きを欠損させている。野生型がもつダブルリング構造と比較する

ことで、リング間の情報伝達に伴う構造変化について調査した。そして最後に、「ATPase 活性」に注目した評価については、ATPase 活性欠損変異体(GroEL D398A)を用いた。この変異体は ATP 加水分解活性が野生型の 2%程度であり、ATP 結合後の加水分解速度が非常に遅く、ATP 加水分解に関連した構造変化が観測されることが期待される。この構造変化をより詳細に調べるため、ATP と同じように結合するが、加水分解できない ATP アナログを用い調査を行った。

### 1. サブユニットを構成するドメイン間の繋がり

GroEL CP86 を用い、2 種類の変性タンパク質の折りたたみ能力を調査したところ、標的タンパク質の種類によって野生型と同程度の補助を実現する場合と、補助能力が大幅に低下する場合が存在することが分かった。これはポリペプチド末端の開裂が影響し、GroEL の基質特異性が変化したためと考えられた。そして、ジスルフィド結合を用いてポリペプチド鎖末端部位の再連結を試みたところ、ジスルフィド結合を形成した状態では折りたたみ能力が低下した基質タンパク質に対する補助能力が復活する様子が確認された。このため、GroEL のドメイン間の繋がりやシャペロニン機能に密接に関係することが示唆された。さらに、基質の種類によって選択的にフォールディング補助能力の違いが見られたことは、基質タンパク質の折りたたみ経路が複数存在する証拠であると考えられた。

### 2. 2つのリングが形成する四次構造

シングルリングの GroEL SR1 を用いた実験では変性タンパク質が結合した状態において、GroEL のアピカルドメインに起因する、ある構造変化が大幅に抑制された。アピカルドメインは変性タンパク質と GroES が結合した後でこのタンパク質分子を GroEL の中に閉じ込める際にダイナミックに構造を変化させることが知られているので、この実験結果はアピカルドメインの大規模な構造変化に GroEL の 2つのリングが形成する「土台；基礎」が大変重要であることを示唆した。

### 3. ATP 加水分解活性

3 つ目の GroEL D398A 変異体では野生型と比べて観察される素過程の一部が消失する結果が得られていると当初考えられる結果を得た。ところが、より詳細な実験を行った結果、消失していると思われた構造変化は実はその速度が大幅に低下していることが明らかになった。GroEL D398A 変異体では ATP 加水分解活性が野生型の 2%、つまり 50 倍程度の速度低下を示すことが以前の実験で明らかになっていたもので、ストップ・フロー解析で確認されたこの速度低下は ATP 加水分解活性の低下に起因するものと思われたいたが、さらなる実験の結果、この素過程の速度と GroEL D398A の ATP 加水分解速度は一致しなかったため、この速度低下は ATP 加水分解活性の律速段階を反映しないとおもわれた。加水分解されない ATP アナログを用い他実験などをさらに実施した結果、この過程は、398 番目のアミノ酸残基の近辺に存在する  $\alpha$ ヘリックスが、GroEL に ATP が結合した後に配置する分子内イベントと深く関係することが明らかとなった。

以上のように、本研究では、3 種類の特徴的な変異体を用い、シャペロニン GroEL 構造変化に関連する新しい事実を明らかにし、シャペロニン GroEL の複雑な動的メカニズムについて新たな知見を得ることに成功した。