

## 論文の内容の要旨

論文題目 Molecular Mechanism of Target Recognition by the Chaperonin GroEL

(シャペロニン GroEL による標的認識の分子機構)

氏名 榎尾 匡

細胞内のタンパク質のフォールディングには、分子シャペロンと呼ばれる一群のタンパク質が関与していることが知られている。構造形成途上にあるタンパク質は疎水的なアミノ酸を露出しており細胞中のような高濃度のタンパク質環境では非可逆的な会合を起こしてしまうが、分子シャペロンはこのようなタンパク質を認識し、結合することによりタンパク質の会合を防いでいる。分子シャペロンの中で最もよく研究されてきたのは大腸菌のシャペロニン GroEL である。GroEL は ATP を加水分解し、コ・シャペロニンである GroES と結合、解離を繰り返しながらタンパク質のフォールディングを助けていることが知られており、ヌクレオチドとの関わりが GroEL の機能に重要な役割を果たしている。これまでにヌクレオチド存在下で GroEL の標的タンパク質との親和性が低下することが知られているが、その分子メカニズムについてはいまだに明らかになっていない。私は以前の研究で、GroEL と  $\alpha$ -lactalbumin( $\alpha$ LA)巻き戻り中間体との相互作用の様子を様々なヌクレオチド存在下で調べた。両者の相互作用は ATP の存在下で大きく低下したが、ADP や、ATP アナログである AMP-PNP の存在下ではあまり変化しなかった。ATP による標的タンパク質との相互作用の低下が ATP の結合、加水分解どちらによって引き起こされているのか。もし、ATP の結合のみで標的タンパク質との親和性の大きな低下が起こるのだとしたら、ATP と ADP で親和性低下の様子が異なるのはなぜか。このような疑問に答えるためには、ヌクレオチド存在下における GroEL の標的タンパク質との親和性低下の分子メカニズムに対する理解が不可欠である。

私は GroEL の変異体 D398A を作成し、標的タンパク質の認識の様子を野生型 GroEL と比較した。D398A 変異体は ATP を野生型 GroEL と同様結合するものの、ATP の加水分解が大きく抑えられている(加水分解の1サイクルに 6 分以上かかる)。D398A 変異体では、ATP 加水分解サイクルにおいて中間体が蓄積していると考えられる。このような変異体を用いることで、ATP の加水分解を伴わない、ATP の結合のみによる GroEL の標的タンパク質との親和性変化を調べることができる。私は  $\alpha$ -lactalbumin( $\alpha$ LA) の巻き戻り反応を野生型 GroEL や D398A 変異体、そして様々な濃度の ATP、ADP 存在下で測定し、数値解析により GroEL と  $\alpha$ LA 巻き戻り中間体との相互作用の変化について研究した。

様々な濃度の ATP 存在下での野生型 GroEL や D398A 変異体と  $\alpha$ LA 巻き戻り中間体との相互作用について調べたところ、すべての ATP 濃度にわたって両者の  $\alpha$ LA 巻き戻り中間体との結合定数は同一となった。また D398A 変異体については、ATP を加えてからの時間を変えて  $\alpha$ LA 巻き戻り中間体との相互作用を測定した。結果、定常状態での ATP 加水分解の 1 サイクルより顕著に早く (15 秒以内) 両者の相互作用が変化していることが分かった。このことから GroEL の標的タンパク質との相互作用の低下には定常的な ATP 加水分解は必要でないことが示唆される。

ヌクレオチド存在下での GroEL と標的タンパク質との親和性低下は、ヌクレオチド結合に伴う GroEL の標的タンパク質との親和性の高い状態から低い状態への転移によるものであると考えられる。これまでの研究において GroEL の ATP 加水分解速度の ATP 濃度依存性等が MWC モデルによって解析され、GroEL に協同的な構造変化の存在することが示唆されている。そこで今回の研究においても ATP によって引き起こされる転移の分子メカニズムとして MWC モデルを考えた。GroEL のモノマーが  $G_T$ 、 $G_R$  の二つの状態をとることができるとする。 $G_T$  状態は標的タンパク質との親和性が高く、ヌクレオチドとの親和性が低い。 $G_R$  状態は逆に、標的タンパク質との親和性が低く、ヌクレオチドとの親和性が高い。リングを構成するすべてのモノマーが同時には  $G_T$ 、 $G_R$  のどちらかしかとれないとすると、ヌクレオチドの濃度にしたがって協同的な転移が起こることになる。ATP によって標的タンパク質との結合の強い状態( $G_T$ )から弱い状態( $G_R$ )への転移が起き、標的タンパク質とそれぞれ  $K_b^T$  と  $\beta K_b^T$  なる結合定数で相互作用し ATP とはそれぞれ  $K_S^R/\gamma$  と  $K_S^R$  なる結合定数で相互作用するとすると、見かけの結合定数は

$$\begin{aligned} K_b^{\text{app}}([\text{ATP}]) &= \frac{[\text{AG}]}{[\text{A}][\text{G}]} \\ &= K_b^T \frac{L(1 + K_S^R[\text{ATP}]/\gamma)^7 + \beta(1 + K_S^R[\text{ATP}])^7}{L(1 + K_S^R[\text{ATP}]/\gamma)^7 + (1 + K_S^R[\text{ATP}])^7} \end{aligned} \quad (1)$$

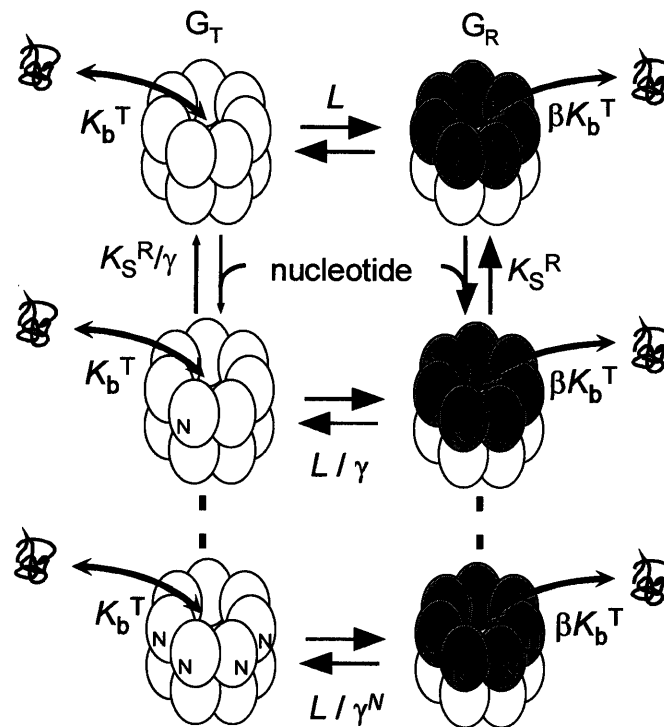
となる。ここで  $L$  は ATP の存在しないときの  $G_T$  と  $G_R$  の比である。フィッティングの結果得られたパラメータの値を表 1 に、理論曲線を図 1(A) に示す。ATP による  $G_T$  から  $G_R$  への転移は協同的になった。また、 $G_T$  から  $G_R$  への転移の起こる ATP 濃度領域が他の研究から得られた協同的な構造変化の起こる ATP 濃度領域と一致した。GroEL は ATP による協同的な構造変化に伴って標的タンパク質との親和性を低下させていることが分かった。

同様に様々な濃度の ADP 存在下での野生型 GroEL や D398A 変異体と  $\alpha$ LA 巻き戻り中間体との相互作用について調べた(図 1(B) (C))。ATP のときと同様の解析を行うと、野生型 GroEL の転移については協同性が低く、また、どんなに ADP 濃度を上げてても  $G_T$  状態が ATP の場合に比べ顕著に残ることが分かった(表 1)。一方、D398A については野生型 GroEL に見られたものと同様の非協同的な転移に加えて、非常にゆっくり起こる協同的な転移も見られた(図 1(C))。

まとめると、

1. 野生型 GroEL や D398A 変異体存在中の  $\alpha$ LA の巻き戻り反応を様々な濃度の ADP、ATP 中で測定し、数値解析により GroEL と  $\alpha$ LA 巻き戻り中間体の結合定数を求めた。
2. 定常的に起こる ATP 加水分解は GroEL と標的タンパク質との親和性低下と関係ない。
3. 測定したすべての ATP 濃度範囲において標的タンパク質との親和性は野生型 GroEL と D398A 変異体とで同一だった。これから、D398A の  $G_R$  状態は GroEL の  $G_R$  状態と同等であると示唆される。
4. ATP により引き起こされる野生型 GroEL の  $G_T$  から  $G_R$  への転移は協同的だった。
5. ADP により引き起こされる野生型 GroEL の転移は非協同的だった。しかし D398A においては、野生型に見られたものと同様の転移に引き続いてゆっくりとした協同的な転移も見られた。
6. GroEL は ATP による協同的な構造変化に伴って標的タンパク質との親和性を低下させている。

## MWC model



\*: fixed

		$K_S^R$ ( $10^3 \text{ M}^{-1}$ )	$\beta$	$\gamma$	$L/\gamma^N$
GroEL	ATP	137±9	0.152*	4.06±0.14	0.028±0.007
	ADP	44±4	0.152*	2.58±0.02	0.66±0.04
	ADP (incubation)	60±11	0.152*	2.43±0.02	1.00±0.06
D398A	ATP	154±13	0.237*	4.20±0.17	0.022±0.006
	ADP	22±2	0.237*	3.40±0.08	0.10±0.02
	ADP (incubation)	24±3	0.144±0.008	6.5±1.0	0.001±0.001

表 1 式(1)を図 1 の実験データにフィッティングして得られたパラメータの値

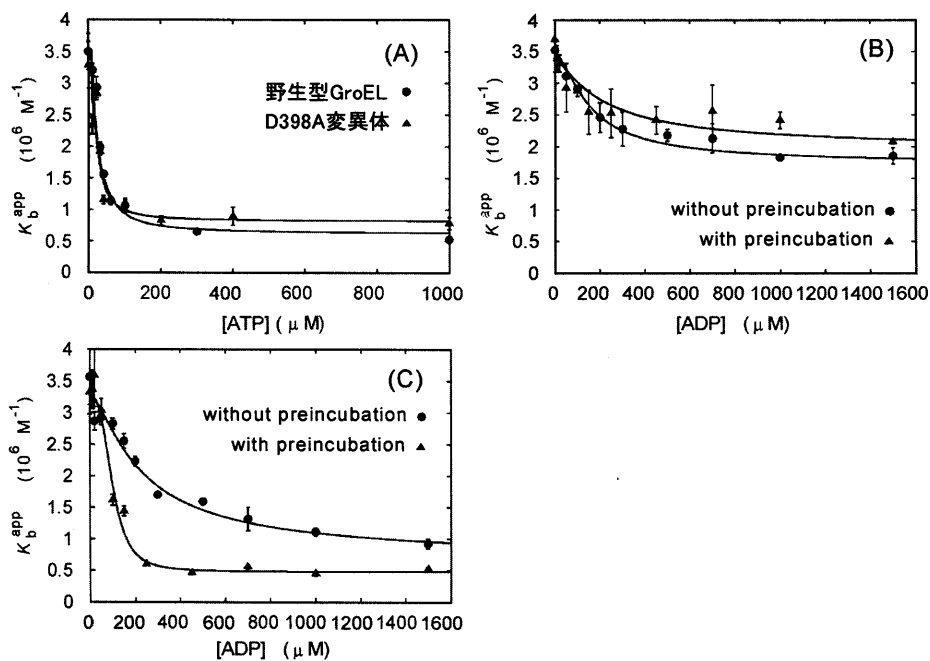


図 1 ヌクレオチド濃度を変えたときの GroEL と  $\alpha$ LA 巻き戻り中間体との結合定数の変化 (A)ヌクレオチドとして ATP を用いた場合。(B)(C)ヌクレオチドとして ADP を用いた場合。GroEL と  $\alpha$ LA 巻き戻り中間体との相互作用の測定より前に GroEL と ADP を混合しておいたもの(with preincubation)と、測定時に ADP を加えたもの(without preincubation)を重ねている。(B) は GroEL として野生型 GroEL を、(C)は D398A 変異体を用いた。