

論文審査の結果の要旨

氏名 横尾 匡

本論文は1編5章からなり、第1章は序論、第2章は材料、第3章は方法、第4章は結果、第5章は考察となっている。

第1章では本論文で行われた研究の背景と目的について述べられている。細胞内のタンパク質のフォールディングには、分子シャペロニンと呼ばれる一群のタンパク質が関与している。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いるため、細胞中のようにタンパク質濃度が高いと非可逆的な会合を起こしてしまう。分子シャペロニンはこのようなタンパク質に結合して会合を防ぐことによりタンパク質のフォールディングを助けている。分子シャペロニンの機能にはヌクレオチドが深く関与していることが知られているが、論文提出者は大腸菌の分子シャペロニンである GroEL と α -lactalbumin(α LA)の巻き戻り中間体を標的タンパク質とする系ですでにこのことを明らかにしている。両者の相互作用はATP存在下で大きく低下し、ADPおよびATPアナログであるAMP-PNPの存在下ではあまり変化がない。これらの研究結果を踏まえ、本論文の研究ではATPがGroELと標的タンパク質との相互作用の低下を引き起こす分子機構を明らかにするとともに、ATPとADPで親和性低下の様子が異なる原因を突き止めることを行っている。

第2章および第3章では、本論文の研究で使用された実験材料と実験方法について述べられている。論文提出者は、GroELと標的タンパク質との相互作用の低下がATPの結合そのものにより引き起こされるのか、それともATPの加水分解によって引き起こされるのかを明らかにするために、野生型GroELの398番目のアスパラギン酸をアラニンに置換したD398A変異体を調製した。この変異体は野生型と同様にATPと結合するが、野生型に比べてATPの加水分解は大きく抑えられている。したがって、この変異体を用いると、ATPの加水分解が起こる前のATP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。

GroELと標的タンパク質である α LAとの相互作用の強さは、酸変性された α LAが中性環境下で2状態転移的に巻き戻る過程の緩和時間の変化から決定された。ストップ・フロー装置を用いてpHジャンプを行い、トリプトファン蛍光強度変により α LAの巻き戻り緩和を観測している。 α LAがGroELに結合すると、見かけ上の巻き戻り緩和時間は長くなる。この緩和を α LAの巻き戻りとGroELへの結合の両方が存在する反応式に当てはめて解析することにより、 α LAのGroELへの結合定数が決定された。ヌクレオチドの濃度を変えて結合定数を測定した結果はMWCモデルで解析されている。これらの解析においてパラメータの値を決定する際には非線形最小二乗法が使用された。

第4章では第2章および第3章で述べられている実験材料と方法を用いて得られた結果が詳細に述べられ、第5章では結果についての考察が行われている。様々な濃度のATP存在下で、野生型GroELおよびD398A変異体と α LA巻き戻り中間体との相互作用を調べたところ、すべてのATP濃度において両者の α LA巻き戻り中間体との結合定数は同じであった。またD398A変異体についてATP

において両者の α LA 巻き戻り中間体との結合定数は同じであった。また D398A 変異体について ATP を加えてからの時間を変えて α 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 サイクルよりはるかに短い時間で両者の相互作用が変化していることがわかった。これらのことから 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た。

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報告されている。そこで本論文の研究においても、GroEL と標的タンパク質の結合定数の ATP 濃度依存性を MWC モデルで解析することが行われた。このモデルでは GroEL のモノマーは G^T と G^R の 2 つの状態をとることができる。 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。一方、 G^R 状態は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。GroEL のリングを構成するすべてのモノマーが同時に G^T 、 G^R のどちらかの状態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転移が起こることになる。解析の結果、ATP による G^T から G^R への転移は協同的であることがわかった。また、 G^T から G^R への転移が起こる ATP 濃度領域は他の研究から得られた協同的構造変化の起こる ATP 濃度領域と一致した。これらのことから、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わかった。

ADP についても ATP のときと同様の解析が行われ、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 濃度を上げてても標的タンパク質に対する親和性の高い G^T 状態が ATP の場合に比べ顕著に残ることがわかった。一方、D398A 変異体については野生型 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。

以上のように、論文提出者は標的タンパク質である α LA 巻き戻り中間体と野生型 GroEL およびその変異体 D398A との相互作用を比較することにより、ATP が GroEL と標的タンパク質との相互作用の低下を引き起こす分子機構を明らかにするとともに、ATP と ADP で親和性低下の様子が異なる原因を突き止めることに成功した。本論文の研究により、分子シャペロニン GroEL による標的タンパク質認識の分子機構に対する理解がより深まったと考えられる。

なお、本論文は、高須悦子、新井宗仁、桑島邦博との共同研究であるが、論文提出者が主体となって研究を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。したがって、博士(理学)の学位を授与できると認める。