

論文内容の要旨

論文題目

Equilibrium and Kinetics of the Allosteric Transition of GroEL

Induced by Adenine Nucleotides

アデニンヌクレオチドにより引き起こされる GroEL のアロステリック転移の平衡論と速度論

氏名

伊野部 智由

細胞内でのタンパク質の立体構造の形成には、様々な分子シャペロンによる介助が必要である。分子シャペロンがどのようにタンパク質の巻き戻りを介助しているのか、その研究が最も進んでいるのは大腸菌シャペロニン GroEL である。GroEL は 14 量体の巨大なタンパク質装置で、7 量体の二つのリングが背中合わせに重なった構造をとっている。この GroEL に介助されたタンパク質が効率的に立体構造を形成するには、GroEL への ATP の結合と加水分解が必須である。ATP による GroEL の大きな構造変化が、ターゲットタンパク質の効率的な巻き戻りを促進しているものと考えられている。このような GroEL の構造転移を説明するモデルとして、ヌクレオチドの結合が GroEL の協同的構造変化をもたらすというアロステリックモデルが広く受け入れられている。

しかしながら、どのようなヌクレオチドでも GroEL のアロステリック転移を引き起こすわけではない。これまでの研究で ATP は GroEL のアロステリック転移を引き起こすものの、ADP や非加水分解性 ATP アナログ (ATP γ S と AMP-PNP) の結合は GroEL のアロステリック転移は引き起こさない、ということが明らかになっている。このことは、GroEL はアロステリック転移する際に、高いヌクレオチド選択性を持っていることを示している。

しかしながらこれまでの GroEL のアロステリック転移の研究では、ATP 選択的に起こる GroEL のアロステリック転移の、構造的かつ実時間の測定はなされてきていない。また ATP や様々な ATP アナログに対する、GroEL のアロステリック転移の選択性に関して詳しく調べた研究もない。

このような現状から、本論文では、①ATP による GroEL のアロステリック転移は、構造的、速度論的にどのようなに起こっているのか？ ②何故 GroEL はアロステリック転移のために、高いヌクレオチド選択性を持つのか？ という疑問に対する研究を行った。

第一の疑問に対して、X 線小角散乱法 (SAXS) とストップフロー蛍光スペクトル法を用いて、ATP による GroEL のアロステリックな構造転移を調べた。X 線散乱法により GroEL の 3 つのアロステリック状態を明確に区別することができ (図 1a)、またストップフロー X 線散乱法により、85 μM ATP により引き起こされた GroEL のアロステリック転移の速度過程をはじめて直接観測することができた (図 1b, 1c)。そのアロステリック転移の速度定数は 5°C において $3\sim 5\text{ s}^{-1}$ であり、ストップフロー蛍光スペクトル法で観測したトリプトファン挿入変異体 GroEL の ATP による蛍光強度変化の第二相に対応することが明らかとなった (図 1b, 1d)。

速度論的蛍光変化の第二相がアロステリック転移の過程であるという SAXS の結果をもとに、蛍光変化の ATP 濃度依存性を調べた。その結果、蛍光変化の第一相は ATP が GroEL へ非協同的 2 分子反応で結合する過程であると結論された。この 2 分子反応の結合速度定数は $5.8 \times 10^5\text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ であり、共に大きな負の電荷を持った GroEL (pH7.5 で一つのサブユニットあたり -18 の電荷) と ATP の間の静電的反発を考慮すると、この結合反応は拡散律速的な二分子反応であると考えられる。アロステリック転移に対応する第二相の ATP 濃度依存性は、遷移状態理論と Monod-Wyman-Changeux (MWC) アロステリックモデルを組み合わせた、速度論的 MWC (kinetic MWC) モデルでよく説明できた。このモデルに基づいた解析により、遷移状態の GroEL への ATP 結合定数を含め、アロステリック転移の平衡論的及び速度論的パラメーターを見積もることができた。

また GroEL による ATP 加水分解反応の実時間測定により、今回観測された SAXS 及び蛍光で観測された ATP による GroEL のアロステリック転移は、ATP の加水分解が起こる前の、ATP の結合により起こされていることも確認された。

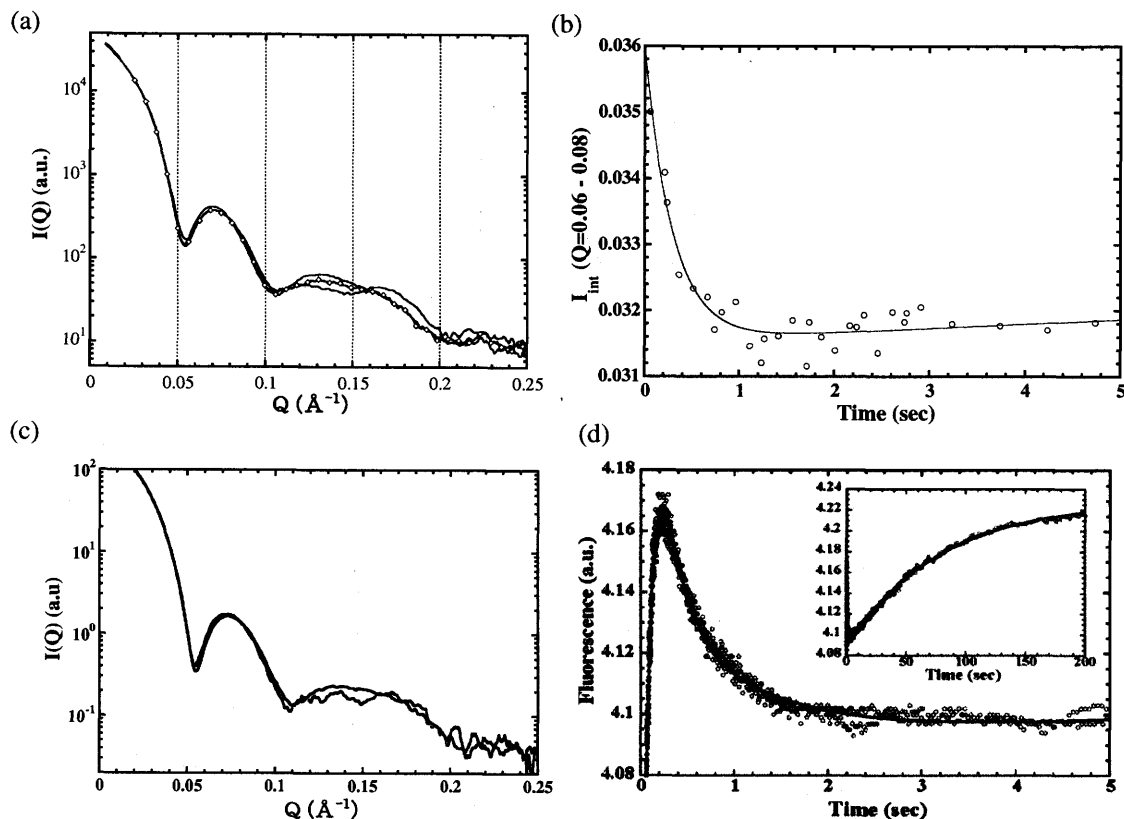


図 1、GroEL の SAXS パターンと構造変化の kinetics. (a) GroEL 各アロステリック状態の SAXS パターン。TT 状態 (黒)、TR 状態 (赤)、RR (青)。 (b) SAXS 積分散乱強度 (I_{int}) でみた 85 μM ATP による GroEL 構造変化の Kinetics. (c) 85 μM ATP を加えた後 10~310 m 秒 (赤) と 1.5~3 秒の GroEL の SAXS パターン。 (d) 蛍光変化でみた 85 μM ATP による GroEL 構造変化の Kinetics.

第二の疑問に対して、種々のリン酸アナログと ADP の複合体よりなる ATP アナログを用いて、GroEL のアロステリック構造転移を調べた。フッ化アルミニウム及びフッ化ベリリウム、フッ化ガリウムと ADP の複合体は、蛍光ラベルした GroEL に速度論的に観測できる蛍光強度の上昇をもたらした。これに対し、フッ化スカンジウム及びバナジン酸と ADP の複合体は、ATP γ S や AMP-PNP と同じく速度論的な蛍光上昇をもたらさなかった。

速度論的に観測される蛍光強度の上昇の早い過程（バースト相と第一相）は可逆的な反応過程で熱力学的な解析が可能であることが分かったので、バースト相と第一相の蛍光変化のフッ化金属-ADP 複合体濃度依存性を調べた。その結果、バースト相の蛍光変化は非協同的なヌクレオチド結合をあらわしていることが分かった。第一相の蛍光の変化は速度論的 MWC モデルでよく説明することができるアロステリック転移の過程であることが分かった。速度論的 MWC モデルによる解析により、フッ化金属-ADP による GroEL アロステリック転移の遷移状態は、ATP によるアロステリック転移の遷移状態に比べ、相対的安定性が 5~6 kcal/mol も増加していることも分かった。

更に X 線小角散乱により、アロステリック転移を示す蛍光変化を引き起こしたフッ化アルミニウム、フッ化ベリリウム及びフッ化ガリウムと ADP の複合体は、ATP と同じ構造変化を GroEL にもたらすことが分かった。このこともフッ化アルミニウム及びフッ化ベリリウム、フッ化ガリウムと ADP の複合体は GroEL のアロステリック転移を引き起こすことを支持する。

以上の結果をもとに、ATP γ リン酸基及び γ リン酸基アナログのサイズ及び配位ジオメトリーと、アロステリック転移の関係について考察した。その結果、リン酸及びリン酸アナログがテトラヘドラルなジオメトリーをもつこと、フッ素-金属イオン及びリン-酸素原子間の距離が 1.6 Å 前後であることが、GroEL のアロステリック転移には重要であることが分かった (表 1)。ATP γ S や AMP-PNP が GroEL のアロステリック転移を引き起こさない理由も、 γ リン酸基部位のサイズとジオメトリーが ATP との異なっていることに起因するとおもわれる。

表 1、アロステリック転移と γ -リン酸アナログのサイズとジオメトリーの関係

Phosphate analog	AlF _x	BeF _x	GaF _x	Pi	ScF _x	Vi
Structural change	○	○	○	×	×	×
Coordinate	4	4	4	4	6	5
Distance	1.63	1.53	-	1.6	2.06-2.18	2.24
Ion radius	0.53	0.41	0.61	0.31	0.88	0.5