

論文審査の結果の要旨

氏名 伊野部 智由

この論文ではシャペロニン GroEL の機能発現に重要な ATP による GroEL のアロステリック転移のメカニズムに関して、① X線小角散乱及び蛍光法で調べた ATP による GroEL のアロステリック転移の構造的速度論、② アロステリック転移に関する GroEL のヌクレオチド選択性、について二章に分けて述べられている。

細胞内での蛋白質の立体構造の形成には、シャペロニン GroEL をはじめとする様々な分子シャペロンによる介助が必要である。GroEL に介助された蛋白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、ターゲット蛋白質の効率的な巻き戻りを促進している。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、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、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。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。このことは、アロステリック転移の研究には ATP を用いる必要があることを示しているが、ATP 自身 GroEL により加水分解されてしまうのでそのことを考慮しなくてはならない。また上の結果は、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も示しているが、その高いヌクレオチド選択性の原因は謎である。

このような現状から、本論文では、① ATP 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に起こっているのか？ ② 何故 GroEL はアロステリック転移に関して、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ている。

第一の疑問に対して、X線小角散乱法 (SAXS) と蛍光スペクトル法をストップフロー法と組み合わせて、ATP が加水分解する前の ATP 結合による GroEL のアロステリックな構造転移を調べた。ストップフ

ローX線散乱法により、世界で初めて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直接観測することができた。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。このことを踏まえ、蛍光変化のATP濃度依存性を調べた結果、蛍光変化の第一相はATPが結合速度定数 $5.8 \times 10^5\text{ M}^{-1}\text{ s}^{-1}$ で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。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。

第二の疑問に対して、大きさと配位ジオメトリーの異なる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。その結果、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した。これに対し、フッ化スカンジウム及びバナジウムとADPの複合体は、ATP γ SやAMP-PNPと同じくGroELのアロステリック転移を引き起こさなかった。以上の結果は、リン酸及びリン酸アナログが4配位ジオメトリーをもつことと、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を示している。

本論文では、世界で初めてSAXSを用いて構造論、速度論的にATPによるGroELのアロステリック転移を観測している。そしてその結果よりGroELのアロステリック転移の新しいモデルを提唱している。またアロステリック転移における γ -リン酸基の特性を明らかにした点もGroELアロステリック転移のメカニズムの解明に多大な寄与をなすものである。

この論文の第一章は新井宗仁博士、中尾正治氏、鎌形清人氏、槇尾匡博士、伊藤和輝博士、雨宮慶幸教授、木原裕教授、桑島邦博教授との共同研究、第二章は菊島健児氏、槇尾匡博士、新井宗仁博士、桑島邦博教授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、提出者の寄与が十分であると認められる。従って審査員一同、博士(理学)の学位を授与するのにふさわしい研究であると判断した。