

論文内容の要旨

論文題目 シャペロニン GroEL/ES の 細胞内における役割の解明

氏名

藤原 慶

1 章 研究の背景と目的

タンパク質のフォールディングを助けるシャペロンは、全ての生物に存在する。シャペロンと基質タンパク質には相性があり、特定のシャペロンの助けがないとフォールディングできないタンパク質(依存基質)が存在することが知られている。それゆえ、個々のシャペロンと依存基質の関係が明確になれば、なぜ全ての生物にシャペロンが存在するかを明らかにするのみならず、いまだ一般的なメカニズムが謎であるタンパク質のフォールディング機構解明の足がかりになる可能性がある。

シャペロニン GroEL/ES は全ての生物に保存されたシャペロンの中で、唯一生存に必須のシャペロンである。数百もの依存基質候補が同定されており重要なシャペロンということにはちがいないが、細胞内での役割はあいまいである。そこで本研究では、大腸菌の GroEL/ES 依存基質を表現型から明らかにし、その情報を手がかりに依存基質を網羅的に同定することで、タンパク質のフォールディングにおいてシャペロン特異性が生じるメカニズムを解明することを目的とした。

2 章 GroEL/ES が細胞分裂に関わるメカニズムの解明

30 年以上前より、GroEL/ES の機能が抑制された大腸菌は、細胞分裂に失敗し、フィラメント状になることが知られているが、どのように GroEL/ES が細胞分裂に関わるかは明らかになっていなかった。そこで、表現型から細胞内での GroEL/ES 特異的基質を同定するために、この GroEL/ES 機能欠損に伴う細胞分裂の異常を解析した。

このフィラメント状形質の原因を探るために、まず、GroEL/ES を発現抑制したとき、細胞分

裂に関わるタンパク質群(Fts タンパク質群)の局在がどうなるかを観察した。Fts タンパク質群は FtsZ, FtsA/ZipA, FtsE/X, FtsK... というように、順に細胞分裂面にリクルートされることが知られているが、FtsE/X より後にリクルートされるタンパク質の局在に異常が生じていることが明らかとなった。そこで、ウエスタンブロット法にて調べると、GroEL/ES の濃度減少とともに、FtsE/X の細胞質側のサブユニットである FtsE の細胞内濃度が減少していた。次に、FtsE を GroEL/ES 正常状態で過剰に発現させたあと、GroEL/ES の発現を抑制した。この方法では、発現抑制により GroEL/ES の細胞内濃度が閾値以下になっても、あらかじめ多量に基質が存在しているため、基質の細胞内濃度は閾値以下にならない。この解析の結果、FtsE だけで細胞分裂の失敗を相補できることが分かった。最後に、再構築型の無細胞タンパク質合成系である PURE system を用いた GroEL/ES 依存性の解析を行った。結果、FtsE のフォールディングは確かに GroEL/ES に依存することが明らかとなった。

以上の結果より、GroEL/ES の発現を抑制すると細胞分裂できないのは「基質である FtsE がフォールディングできなくなるため」であることを明らかにした。(Fig. 1)。

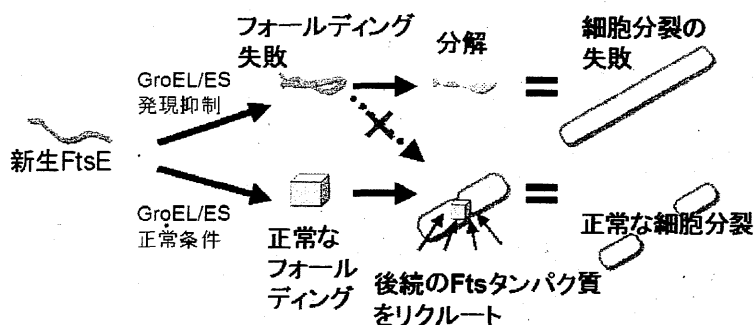


Fig. 1. 本研究で明らかになった GroEL/ES が細胞分裂に関わるメカニズム

3 章 GroEL/ES 依存基質の網羅的同定と解析

3-1. GroEL/ES 特異的基質同定法の構築

表現型による解析から、GroEL/ES と細胞分裂の関係は、FtsE だけのフォールディングを助けることであることが分かった。では、この結果と先行研究のプロテオーム解析のデータを合わせると、GroEL/ES 依存基質かどうかを判断できる系が構築できないだろうか。

GroEL/ES 依存基質の同定を目指したプロテオーム解析の 1 つに、Hartl らのグループによる基質結合ユニットである GroEL と結合するタンパク質の網羅的同定がある。このプロテオーム解析によって GroEL/ES の基質は、自発的フォールディングができる基質を含む『弱い結合のグループ(クラス 1 基質)』、他のシャペロンでもフォールディングが助けられる基質を含む『中程度の結合のグループ(クラス 2 基質)』、それまでに同定されていた GroEL/ES 依存基質(MetK, DapA, MetF)を全て含む『GroEL との結合がもっとも強いグループ(クラス 3 基質)』、の 3 つに分類された。この分類によると、FtsE はクラス 3 基質である。しかし、欠損により細胞分裂が失敗することが知られている ParC もクラス 3 基質である。そこで、この FtsE と ParC の差を指標に、GroEL/ES 依存基質を同定できる系を構築した。

GroEL/ES を発現抑制しても、他のシャペロンの量は減少しないことが知られている。それゆえ、GroEL/ES を発現抑制した後にタンパク質を過剰発現すると、GroEL/ES 依存の場合はフォールディングできないが、そうでなければフォールディングできることが予想された。そこで、GroEL/ES を発現抑制した後、FtsE、ParC を過剰発現させた。結果、FtsE のみ GroEL/ES の発

現抑制特異的に凝集した(Fig. 2)。続いて、現在までに *in vitro* でのリフォールディング実験から GroEL/ES 依存基質であることが報告されている DapA、MetK、MetF を同様に解析した結果、GroEL/ES の発現抑制特異的に不溶となった(Fig. 2)。このことから、『GroEL/ES の発現が通常の状態と抑制された状態で基質候補を過剰発現し、可溶性を比べる方法』が GroEL/ES 依存基質同定に有効であることが示された。

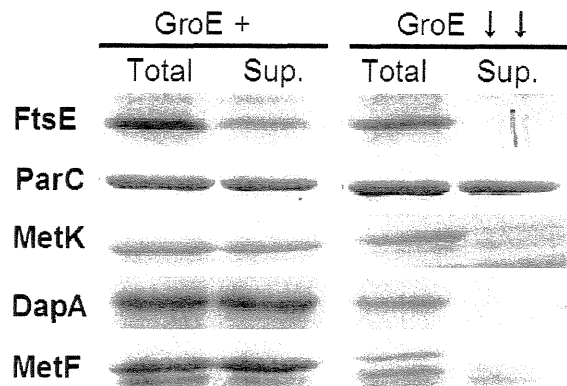


Fig. 2. GroEL/ES の発現状況による可溶性の変化

3-2. GroEL/ES 依存基質の網羅的同定

GroEL/ES 依存基質の網羅的同定に向け、クラス 1~3 の基質それぞれを過剰発現法により解析した。GroEL/ES が必須遺伝子であるので、まずは各クラスの必須遺伝子に絞って解析を行った。結果、過剰発現に成功した 31 遺伝子(クラス 1 が 13 個、クラス 2 が 12 個、クラス 3 が 6 個)中、クラス 3 基質の 3 つのみが GroEL/ES 発現抑制特異的に凝集した。残りは全て、GroEL/ES 発現抑制によっても可溶性に変化がなかった。この結果から、GroEL/ES 依存基質は GroEL との結合が強いこと(つまり、依存基質の大多数はクラス 3 にしか存在しないであろうこと)、逆は成り立たないこと(クラス 3 の中の一部だけが依存基質であること)が示された。そこで、クラス 3 基質全て(84 個)に関して、過剰発現による解析を行った。結果、GroEL/ES 発現抑制特異的に凝集もしくは発現が大きく減少する基質、すなわち GroEL/ES 依存基質が 47 個(必須遺伝子は 5 つ)、GroEL/ES を発現抑制しても可溶性に変化がないものが 37 個であった。

GroEL/ES 依存基質の特徴を解析すると、立体構造ファミリー分類 (SCOP) における、TIM バレル構造のものは、全て GroEL/ES 発現抑制特異的に凝集していた(Fig. 3)。一方、他の立体構造ファミリーのものは、細胞内での GroEL との結合の強さと、細胞内での GroEL/ES 特異的依存性は必ずしも対応しなかった。このことは、TIM バレル構造に限り、GroEL との結合の強さと GroEL/ES への依存性が同じであることを強く示唆した。また、フォールディングに GroEL/ES は必須ではないが、細胞内で GroEL との結合が強い基質(GroEL/ES 優先基質)が存在することが明らかとなった。以上を踏まえ、クラス 3 基質を 2 つに分け、『GroEL/ES 優先基質をクラス 3 基質』、『GroEL/ES 依存基質をクラス 4 基質』と再定義した。

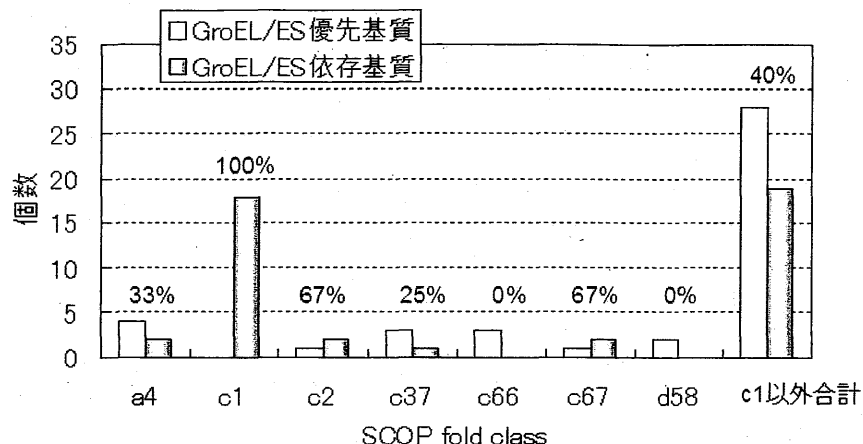


Fig. 3. GroEL/ES 依存基質と GroEL/ES 優先基質の立体構造ファミリー分類。c1 が TIM バレルフォールドである。図中の%は旧クラス 3 基質中の GroEL/ES 依存基質の割合をあらわす。

3-3. さらなる GroEL/ES 依存基質の探索

クラス 4 基質が通常の発現レベルでも GroEL/ES 依存基質であることを確認するため、ショットガンプロテオミクスにより、GroEL/ES 正常時と発現抑制時において、上清に存在するタンパク質の量を網羅的に測定した。結果、検出できた 1958 個のタンパク質の量の平均を基質クラスごとに取ると、クラス 4 のみが GroEL/ES 発現抑制特異的に大きく減少していた。また、クラス 4 以外で、GroEL/ES の発現抑制特異的に上清から消えるタンパク質を 11 個選び、過剰発現法を行った。結果、過剰発現できた 7 個のうち、5 個が GroEL/ES 依存基質であった。この結果より、クラス 4 の定義と同定が正しく細胞内の状況を反映しているとともに、GroEL との結合が強力でもなくても依存基質となるタンパク質があることが分かった。この結果は、GroEL/ES 発現抑制状態の代謝物の網羅的定量解析(メタボローム解析)によっても裏付けられた。また、GroEL/ES 依存基質同士でホモログが存在することを利用し、新たに 2 つの GroEL/ES 依存基質が同定した。

4 章 結論と展望

本研究により、GroEL/ES の細胞内での役割は、約 50 個のタンパク質のフォールディングに必須であることが明らかとなった。また、GroEL/ES の発現抑制にともなう、細胞分裂、溶菌、代謝異常のような表現型は、シャペロン機能の欠損にともなうフォールディング異常だけで説明がつくことが示された。以上により、あるシャペロンの機能欠損の表現型を調べることで、依存基質を明らかにする手法(フォールディング遺伝学的手法)は、非常に有効であることが示された。

これまでの研究ではシャペロン依存基質が数十個単位で同定された例はなく、本研究の結果は『1つのシャペロンの依存基質の性質を解析する』には現在もっとも優れたデータセットである。また、立体構造ファミリーにより、GroEL との結合の強さと GroEL/ES 依存性の間に違いがあることが明らかとなった。先行研究では、結合の強さは依存性と等しいと考えられていた上に、立体構造ファミリーごとに結合の強さと依存性に差があるとは全く知られていなかった。それゆえ、本結果は GroEL/ES 依存性の解明に大きな寄与をすると考えられる。さらに、ホモログ間で GroEL/ES 依存性が異なるタンパク質をいくつか同定したことで、一次配列でも議論ができる。今後、本研究で得られたデータを、生化学的手法や、バイオインフォマティクス技術に基づいて詳細に解析することで、GroEL/ES 依存性のメカニズムが明らかになるであろう。また、本研究のようにフォールディング遺伝学的手法と、プロテオーム解析、過剰発現に基づく解析を組み合わせることにより、他のシャペロンに関しても依存基質や、依存性のメカニズムが明らかになることが期待される。