

[別紙2]

## 審査の結果の要旨

氏名 鮫島 知哉

シャペロニンとは、あらゆる生物において生存に不可欠な分子シャペロンである。シャペロニンは2つの樽型のリングが背中合わせに向かい合わせになった構造をしており、細胞内では自発的に折れたたむことが出来ないタンパク質の折れたたみを介助する役割を担っている。中でも大腸菌のシャペロニン GroEL の反応サイクルは約 20 年に及び詳細に解析されてきており、反応サイクルのモデルが世界中の生化学の教科書に記述されている。そのモデルは「GroEL の 2 つのリングに補因子の GroES が交互に結合することで機能する」というものであり、GroEL の 2 つのリングに GroES が同時に結合した状態（フットボール型複合体）は存在しないと考えられてきた。一方、電子顕微鏡の観察、および化学架橋の実験から GroEL と GroES が 1:1 で結合した弾丸型複合体のほかに、1:2 の割合で結合したフットボール型複合体の存在が確認されている。しかし、フットボール型複合体を確認した実験は反応サイクルを停止させて測定しているため、多くの研究者は GroEL の反応サイクル中にフットボール型複合体は存在しないと疑っていた。このように反応サイクル中におけるフットボール型複合体の存在が論争的になっている。本論文では、シャペロニンの反応サイクル中にフットボール型複合体が存在することを、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) および蛍光相関分光法 (FCS) を用いた多分子系の実験で明らかにすると共に、フットボール型複合体と弾丸型複合体の寿命を1分子計測した結果をまとめたものである。

まず、第1章ではシャペロニン GroEL の機能と現在広く受け入れられている GroEL の反応サイクルのモデルなど、本研究の背景が述べられるとともに、本論文の概要がまとめられている。

第2章では、本研究で用いた材料と実験方法がまとめられている。

第3章では、FRET を用いたフットボール型複合体の検出について述べられている。筆者は、GroEL と GroES の特定の amino 酸残基にそれぞれ異なる蛍光色素を導入し GroEL と GroES の結合によって起こる FRET を蛍光分光光度計を用いて測定した。先行研究により明らかにされているフットボール型複合体形成条件 (ATP+BeF<sub>x</sub>) と弾丸形複合体成条件 (ADP+BeF<sub>x</sub>)、および GroEL の反応サイクル中 (ATP) の FRET 効率を比較した。その結果、フットボール型複合体と弾丸型複合体が反応サイクル中で共存していることを明らかにした。FRET の変化が GroEL の構造変化によるものではないことを証明するため、次に筆者は GroES を蛍光標識し、FCS を用いてフットボール型複合体と弾丸型複合体が反応サイクル中で共存していることを明らかにした。また、筆者は、ADP が存在するとフットボール型複合体の形成が阻害されることを明らかにした。この ADP によるフットボール型複合体形成阻害機構を明らかにするため、ATP 加水分解前のアナログである ADP-BeF<sub>x</sub> を利用して形成させた弾丸型複合体に GroES が結合する様子を、FRET を用いて様々な ADP 濃度条件下において測定した。すると、弾丸型複合体に対する GroES の結合速度は ADP 濃度依存的に低下した。さらに筆者は ATP 加水分解能が低下した GroEL の変異体 (D398A) を用いることで、フットボール型複合体は両側に ATP が結合した状態で形成されることを見出した。

第4章では、変性タンパク質がフットボール型複合体形成に与える影響が述べられている。変性

タンパク質は GroEL の ATPase 活性を増加させるなど、GroEL の反応サイクルに影響を与えることが知られている。そこで、筆者は変性タンパク質がフットボール型複合体の形成に与える影響を調べるため、変性タンパク質濃度を変化させて、GroEL-GroES の分子間 FRET を測定した。その結果、フットボール型複合体の形成は変性タンパク質濃度依存的に促進され、変性タンパク質による GroEL の ATPase 活性化と良好な相関を見出した。また、ADP によるフットボール型複合体形成阻害効果に対し、変性タンパク質がどのように影響しているか調べた。20  $\mu$ M ADP 存在下において変性タンパク質濃度を変化させ、ADP-BeF<sub>x</sub> で形成させた弾丸型複合体に対する GroES の結合速度の変化を FRET により測定した。その結果、弾丸型複合体に対する GroES の結合速度が変性タンパク質濃度依存的に加速することが分かった。すなわち、変性タンパク質は ADP による 2 個目の GroES の結合阻害効果を低下させ、フットボール型複合体の形成を促進する働きがあることを明らかにした。

第5章では、1分子蛍光イメージング法によるフットボール型複合体を経由した GroEL の反応経路の解析について述べられている。フットボール型複合体の 2 つの GroES が解離する順番は、GroEL に結合する順番により決まっているのかという疑問に答えることは、多分子の平均を扱う従来の生化学的手法では困難である。そこで、筆者は 1 分子蛍光イメージング法を利用することで、フットボール型複合体の 2 つの GroES を区別して解析した。フットボール型複合体の 1 分子観察を行うためには、高濃度の蛍光標識 GroES を溶液中に存在させる必要があるため zero-mode waveguides(ZMWs)基板を利用して 1 分子蛍光イメージングを行った。ビオチン及び Alexa488 で標識した GroES をビオチン化 BSA とストレプトアビジンを介して ZMWs 基板底面に固定し、50 nM Cy5 標識 GroEL(Cy5-GroEL)、300 nM Cy3 標識 GroES(Cy3-GroES)、および変性タンパク質である還元型ラクトアルブミンを溶液中に存在させ、Cy3-GroES 及び Cy5-GroEL の蛍光を同時観察した。その結果、Alexa488-ビオチン化 GroES が存在する位置に Cy3-GroES、Cy5-GroEL の輝点が共局在する様子が確認できた。さらに共局在の様式は主に Cy3-GroES と Cy5-GroEL が同時に結合して同時に解離する様式 (タイプ 1)、Cy3-GroES と Cy5-GroEL が同時に結合して、先に Cy3-GroES が解離する様式 (タイプ 2) に分類され、タイプ 1 が 31%、タイプ 2 が 48%、その他の結合様式が 21% だった。すなわち、フットボール型複合体の 2 つの GroES は先に結合したものが先に解離する場合 (タイプ 2) が若干多いものの、後から結合した GroES が先に解離すること(タイプ 1)もかなりの割合で起こることが明らかとなった。また、Cy3-GroES と Cy5-GroEL が共局在した時間を解析し、フットボール型複合体の寿命は平均約 3 秒、弾丸型複合体の寿命が約 5 秒であることを明らかにした。

第6章では、本研究のまとめと展望が述べられている。

以上のように、学位申請者は GroEL の反応サイクル中にフットボール型複合体が存在することを FRET、FCS、および 1 分子イメージング法を用いて明らかにし、GroEL の反応機構の解明に大きく貢献した。よって、本研究を行った鮫島知哉は博士(薬学)の学位を受けるにふさわしいと判断した。