

論文内容の要旨

論文題目 大腸菌シャペロニンの構造機能解析

(Structural and Functional Analysis of the *Escherichia coli* Chaperonin)

氏名 高橋一暢

大腸菌のシャペロニン GroEL は、分子量 57 kDa の単量体が 7 つ並んで形成されたリングが 2 つ背中合わせに重なった二重リング構造をしている蛋白質超分子複合体である。GroEL は ATP を利用してコシャペロニン GroES と共に蛋白質のフォールディングを介助する。これまで、GroEL に関して生化学的、物理化学的研究が数多くなされてきた。しかしながら、GroEL の機能発現の詳細な分子機構は未だ明らかとなっていない。本研究では GroEL-GroES 複合体の構造を X 線小角散乱 (SAXS) で調べるとともに、GroEL のアロステリック転移にとって重要である ATP の結合をストップフロー法と光親和性標識を用いて調べた。

GroEL は GroES と複合体を形成することにより完全な機能を発揮することができる。しかしながら、生体内において、GroEL と GroES が 1:1 で結合した弾丸型複合体と GroEL と GroES が 1:2 で結合したフットボール型複合体のどちらが形成されているのかについて、これまでに多くの議論がなされてきた。X 線小角散乱 (SAXS) は生理的条件下にある水溶液中の蛋白質の立体構造を直接測定できる方法である。本研究では、SAXS を用いて、基質蛋白質の存在下における GroEL-GroES 複合体の構造を調べた。様々なヌクレオチドの存在下における GroEL-GroES 複合体の散乱パターンを解析し、形成された複合体の構造を表すパ

ラメータである慣性半径 (R_g)、分子内最大距離 (D_{max})、重量平均分子量 (M_w) を求めた。得られたパラメータから GroEL-GroES 複合体の構造形成に関して以下の結論を得た：(i) ヌクレオチドが存在しない条件では、複合体は形成されない (ii) ATP と ADP が存在する条件 ($[ADP]/[ATP]=0.2\sim 0.6$) では、弾丸型複合体が形成される。(iii) ATP と BeF_x が存在する条件ではフットボール型複合体が形成される。これらの結果は生体内では弾丸型複合体が形成されることを示している。

GroEL は ATP 結合にともなって協動的なアロステリック転移を示す。GroEL のアロステリック転移にはリング内の協同性とリング間の協同性が存在すると考えられている。リング内の協同性を調べるために、GroEL の単一リング変異体 (SR1) のトリプトファン導入変異体 (Y485W-SR1) を用いて、アロステリック転移を速度論的に解析した。蛍光ストップフロー法により、ATP と Y485W-SR1 を混合したときの蛍光変化を調べたところ、アロステリック転移の速度定数の ATP 濃度依存性は、先行研究で示されていたような単純なシグモイドで表されないことが明らかとなった。そこで、この複雑なシグモイドは、ATP 結合部位が複数存在することに起因するという仮説を立てた。この仮説を確認するために、ATP 結合の阻害剤として働く ADP の存在下で、ATP による Y485W-SR1 のアロステリック転移を調べた。その結果、ADP 濃度が増えていくにしたがってアロステリック転移の速度定数は減少し、ADP 濃度が $400\ \mu\text{M}$ ではアロステリック転移の速度定数は ATP 濃度に対して 1 つのシグモイドを示した。この結果は、第 2 のヌクレオチド結合部位が存在し、ADP の濃度が $100\ \mu\text{M}$ より大きくなるときには、ADP がそのヌクレオチド結合部位に結合しているというを示唆している。この推定された第 2 のヌクレオチド結合部位の存在とアミノ酸配列上の位置を特定するために、同一条件下で ADP の代わりに $8N_3$ -ADP を用いて、Y485W-SR1 と SR1 のアミノ酸残基を光親和性標識した。標識した Y485W-SR1 及び SR1 をプロテアーゼ Arg-C で加水分解後 HPLC 分析し、ポリリン酸基と選択的に結合する蛍光性亜鉛錯体を用いて、標識されたペプチド断片を単離することができた。そのペプチド断片のアミノ酸

配列分析により、Y485W-SR1 と SR1 のいずれも Tyr360 がラベルされていることが明らかになった。また、アロステリック転移の ATP 濃度依存性から ATP の濃度が 800 μM のときには、第 2 のヌクレオチド結合部位に ATP が結合していることが予想された。そこで、この条件下で ATP の代わりに $8\text{N}_3\text{-ATP}$ を用いて、SR1 のアミノ酸残基を光親和性標識した。その結果、先と同様に Tyr360 がラベルされていることが明らかになった。これらの結果は、GroEL のサブユニット内にはこれまで知られているヌクレオチド結合部位の他に、第 2 のヌクレオチド結合部位が存在し、その位置は Tyr360 の近くであることを示している。

以上より、生理的条件下において GroEL と GroES は弾丸型複合体を形成することが明らかとなるとともに、第 2 のヌクレオチド結合部位が Tyr360 の付近に存在することが明らかとなった。これらは GroEL の機能発現機構を理解するうえで重要な結果である。