

(続紙 1)

京都大学	博士 (薬科学)	氏名	石野 聡
論文題目	Physicochemical studies on reaction mechanism of molecular chaperone GroE (分子シャペロンGroEの反応機構に関する物理化学的研究)		
<p>大腸菌の分子シャペロンであるGroEL/GroESは細胞内で様々なタンパク質のフォールディングを補助することが知られている。GroELは7量体から成る中空のリングを背中合わせにしたダブルリング構造 (14量体) を持ち、リングの両端に基質タンパク質、及び共シャペロンであるGroESとの結合サイトを持つ。GroESは7量体から成るドーム状の構造を持ち、GroELのふたとして働く。変性した基質と結合したGroELは、GroESとATP依存的に結合し、親水性の内部空洞に基質を封入する。GroE内腔に隔離された基質は分子間で凝集することなくネイティブ構造へとフォールディングする。GroEは、ATPの加水分解によって、その反応サイクルを制御していることが知られており、GroELの片側のリングにのみGroESが結合した弾丸型複合体が反応サイクルにおいて中心的な役割を担っていると考えられてきた。しかしながら、近年、弾丸型複合体だけでなく、GroELの両側のリングにGroESが結合したフットボール型複合体が反応サイクルに関与している可能性や、本来ダブルリング構造を持つGroELがシングルリングに過渡的に開裂する可能性なども指摘されており、未だGroEの反応機構に関して不明な点が多く残されている。また、GroE複合体の立体構造はX線結晶構造解析により明らかとなっているものの、GroELのC末端領域は結晶構造上では見えておらず、その役割についても不明な点が多い。本研究では、GroEの反応機構に関してさらなる知見を得ることを目的とし、種々の物理化学的手法による解析を行なった。</p> <p>GroELのC末端領域は基質の封入過程に深く関与している可能性が示されている。第1章では、基質として緑色蛍光タンパク質 (GFP) を用いて、C末端領域の欠損変異がGFPの封入効率に与える影響を調べた。C末端を欠損させることにより、シングルリング変異型EL₇/ES₇複合体によるGFPの封入効率は著しく低下した。一方で、フットボール型EL₁₄/ES₁₄複合体によるGFPの封入効率はC末端領域の欠損変異の影響をほとんど受けなかった。このことは、C末端領域が欠損した状態では、封入されたGFPがEL/ES複体内腔の底から漏れ出すことを示唆している。これにより、GroELのC末端領域は複体内腔の底から基質が漏出するのを防ぐバリアとしての役割を担っていることが明らかとなった。</p> <p>第2章では、GroELリングの過渡的な開裂反応に伴うリングの交換過程を蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) により解析した。Cys変異を導入したGroELをドナー蛍光色素、アクセプター蛍光色素の2種類で別々にラベルした後、種々の条件下で両者を混合して蛍光強度の変化をモニターした。GroELがGroESと安定に弾丸型複合体を形成する条件下では、顕著な蛍光強度の変化は見られなかった。一方、安定にフットボール型複合体を形成する条件下では、FRETによりドナー色素の蛍光強度</p>			

が低下し、アクセプター色素の蛍光強度が増大した。このことから、フットボール型複合体の形成時に、GroELリングが過渡的に開裂していることが示唆された。

GroEは基質を内腔に封入することで外部から隔離するという性質を持つことから、ナノキャリアとしての応用も期待されている。当研究室では、溶液NMRによる凝集性タンパク質の構造解析に向けて、変異型EL/ES複合体からなるカプセルに着目してきた。しかし、GroE複合体の安定性に関する知見はこれまでにほとんど得られていない。そこで、第3章では、ATP加水分解活性が低下した変異を持つシングルリング型SR398/ES複合体の安定性を解析した。ATPアナログであるATP γ Sを用いて形成させたSR398/ES複合体は周りに過剰量のATP γ Sが存在する条件では、37°Cで長時間インキュベート後も安定であった。しかし一方で、複合体を形成後に周りのATP γ Sを除去すると徐々に複合体は解離することが分かった。このことから、SR398はGroESとの結合を保持したまま、フリーのヌクレオチドと結合、解離を繰り返していることが明らかとなった。

本研究により、GroELのC末端領域が封入した基質の漏出を防ぐ役割を担っていること、GroELリングの開裂反応がフットボール型複合体の形成に応じて起こること、そしてSR398/ES複合体の安定性が、周りにフリーのヌクレオチドが存在するかどうかに強く依存することが明らかとなった。これらの知見が、今後GroEの反応機構をより深く理解することにつながることを期待される。

(論文審査の結果の要旨)

大腸菌の分子シャペロンであるGroEL/GroESは、細胞内で様々なタンパク質のフォールディングを補助することが知られており、生物物理学の観点から興味ある研究対象として、盛んに研究されているが、その詳細な分子機構については不明な点が多い。本論文では、GroEL/GroESの分子機構について、種々の物理化学的手法を用いて研究を行い、3つの新知見を得た。

まず、GroELのC末端領域の基質封入過程への関与に関し、C末端領域の欠損変異体を用いることによって、GroELのC末端領域は複体内腔の底から基質が漏出するのを防ぐバリアとしての役割を担っていることを明らかにした。

次に、GroELリングの過渡的な開裂反応に伴うリングの交換過程を蛍光共鳴エネルギー移動により解析した結果、GroELがGroESと安定に弾丸型複合体を形成する条件下では、GroELリングの開裂は見られないが、フットボール型複合体の形成時に、GroELリングが過渡的に開裂していることを見いだした。

最後に、GroEのナノキャリアとしての応用を視野に入れ、シングルリング型SR398/ES複合体の安定性を解析したところ、SR398はGroESとの結合を保持したまま、フリーのヌクレオチドと結合、解離を繰り返しており、フリーのヌクレオチドが存在しない場合、R398/ES複合体は解離してしまうことを解明した。

以上の新知見は、GroEL/GroESの分子機構の全貌の解明に重要な情報を与えるものである。

よって、本論文は博士(薬科学)の学位論文として価値あるものと認める。また、平成27年2月24日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。

なお、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、当分の間、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

要旨公表可能日： 平成27年6月22日以降