TITLE:

Crystal Structure of Chaperonin-60 from *Paracoccus denitrificans*(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Fukami, Takaaki

CITATION:

Fukami, Takaaki. Crystal Structure of Chaperonin-60 from *Paracoccus denitrificans*. 京都大学, 2001, 博士(理学)

ISSUE DATE:

2001-07-23

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/150394>

RIGHT:

氏 名	ふか 深 海 隆 明
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	理 博 第 2391 号
学位授与の日付	平 成 13 年 7 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	理 学 研 究 科 化 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	Crystal Structure of Chaperonin-60 from <i>Paracoccus denitrificans</i> (<i>Paracoccus denitrificans</i> 由来シャペロニン60の結晶構造に関する研究)

論文調査委員 (主 査) 教 授 三 木 邦 夫 教 授 伊 藤 維 昭 教 授 井 上 丹

論 文 内 容 の 要 旨

生体内には分子シャペロンと呼ばれる一群のタンパク質が存在する。その役割は、他のタンパク質がその機能を発現するために正しい立体構造を取ることを手助けすることであり、いくつかのファミリーが知られている。シャペロニンは、分子シャペロンの一員であり、正常な立体構造を持たないタンパク質を捕らえ、その正しい折れたたみを促進する働きを持つタンパク質である。シャペロニンは細胞内に多量に存在する普遍的なタンパク質で、アミノ酸配列の相同性やサブユニット構成によって、2つのグループに大別される。グループIのシャペロニンは、分子量約60kDaおよび10kDaのサブユニット(シャペロニン60およびシャペロニン10)から構成されており、2つの7量体リングが背中合わせに重なった構造をしている。

これまでの大腸菌由来のシャペロニン (GroEL) による研究から、基質となるポリペプチド鎖は、二重リングの一方 (cis-ring) にできた GroEL/ES 複合体内部の空洞内で、外界と隔絶された状態で折りたたまれる。ほとんどの細菌由来のシャペロニンは二重リングとしてのみ存在するが、*Paracoccus denitrificans* 由来のシャペロニン60 (以下、P.cpn60 と略記) は、電子顕微鏡での研究から単一の7量体リングでも存在することが示されていた。GroEL で提唱されている反応機構では二重リング構造が必須であり、P.cpn60 で見られるリング開裂の理由を明らかにすることは、シャペロニンの反応機構を理解する上で重要である。また、これまでグループIのシャペロニンについては、GroEL の構造しか報告されておらず、他種のシャペロニンの構造との比較は、シャペロニン分子の持つ構造上の特徴をより明らかにすると考えられる。

本研究では P.cpn60 の立体構造を X 線結晶解析により決定し、GroEL の構造との比較検討により、シャペロニン分子の構造上の特徴を明らかにし、また、二重リング間の相互作用を分子構造の視点から論じたものである。

大量培養した *P. denitrificans* 菌体の可溶性画分より、精製過程に通常のクロマトグラフィー操作に加えて分取用電気泳動を行うことで、高純度の P.cpn60 を精製することが可能となった。結晶化条件を検討した結果、沈澱剤としてポリエチレングリコールと塩化リチウムを使用した条件で、正方晶系に属する空間群 $P4_22_12$ (格子定数 $a=b=286.3\text{\AA}$, $c=153.3\text{\AA}$) の結晶が再現性よく得られた。この結晶は溶液組成の変化に敏感なため、低温回折実験が可能な溶液条件を見いだすことが困難で、加えてシンクロトロン放射光照射による損傷が著しく、構造解析に必要な全ての回折データを一つの結晶から測定することが不可能であった。このため、多数の結晶から測定した回折データを併合することで、 $3.2\text{\AA}$ 分解能の完全な回折データを得た。

構造解析は GroEL の原子座標を用いた分子置換法により行った。各々のサブユニットを独立に精密化するには分解能が不十分であったため、非結晶学的対称性 (NCS) を制約条件として適用した。サブユニット分子を構成する3つのドメイン間の相対配置は、サブユニット毎に異なっていたため、NCS マトリックスはドメイン毎に異なるものを適用し、溶媒領域平滑法、NCS による平均化などを用いて電子密度図を改良することで結晶学的精密化を行った。最終的に得られた立体構造モデルの結晶学的 R 値は、20.4% (Rfree は23.4%) であった。

決定された P. cpn60 の構造は、非対称単位内にある 7 量体リングは隣接した非対称単位内にあるリングと背中合わせに接触しており、GroEL と同様の二重リングを形成していた。各サブユニットはヒンジで接続された 3 つのドメインから構成されていて、リング上部のドメインほど温度因子が大きく、構造の大きなゆらぎが示唆された。GroEL の構造と比較すると、P. cpn60 の各サブユニットは、109番目と461番目の残基を支点として外側に向かって 2 度傾いており、さらに Apical ドメインが 4 度ねじれていた。これらの動きにより、リング上部中央にある基質が結合する穴の内径が 45Å から 50Å に広がっていた。サブユニットの動きに際して支点となる残基は、リング間の接触に関与している残基であり、リング間の相互作用はサブユニットの動きに際しても保たれていることが明らかになった。このようなサブユニットの動きは、シャペロニン分子が様々な大きさの基質タンパク質を非特異的に結合することを可能にしていると考えられた。シャペロニンの 2 つのリングは、各サブユニット当たり 2 カ所 (Left site および Right site) で接触している。P. cpn60 では GroEL と比べて Left site で水素結合が 1 つ少なく、また、接触面積が小さくなっていることが明らかになった。この特徴は、GroEL の ATP γ S 結合型の構造でも観測され、ATP 結合に伴う構造の変化が *trans* リングから *cis* リングへ Left site を介して伝わりと提唱されていることに整合している。GroEL のリング間相互作用は ATP 結合により弱まることを考えると、このことは P. cpn60 で単一リングが観測される理由の一つであると結論された。

論文審査の結果の要旨

本論文は、*Paracoccus denitrificans* 由来のシャペロニン 60 (P. cpn60) の X 線結晶構造解析を行い、シャペロニン分子が持つ立体構造上の特徴を明らかにしたものである。その結晶の性質から、X 線結晶解析における回折実験には種々の困難があったが、シンクロトロン放射光での実験を重ねて慎重に行うことでこれを克服し、このような超分子複合体として十分な水準に達する構造解析を行っている。

決定された P. cpn60 の構造は、ヒンジで接続された 3 つのドメインから構成されるサブユニットの 7 量体リングが背中合わせに接触しており、同じグループ I シャペロニンに属する大腸菌 GroEL と同様の二重リングを形成していた。リングを構成するサブユニットの相対配置には違いが見られたが、このサブユニットの動きはリング間接触領域を支点としたものであり、その結果、リング間の相互作用は同様に保たれていることを、立体構造を詳細に検討することで明らかにしている。P. cpn60 は、電子顕微鏡による研究から単一のリングでも存在することが示唆されていたため、特異な反応機構を持っている可能性が示唆されていたが、本研究で明らかになった構造は、GroEL で提唱されていた二重リング構造を必要とする反応機構に従うことを強く示唆しており、この反応機構が細菌由来のシャペロニンに対して一般的に適用できることを支持する結果となった。

また、シャペロニン分子の基質結合部位であるリング開口部の内径は、サブユニットの動きにより 45Å から 50Å へ広がっていた。この動きは、大きさの異なる基質タンパク質がシャペロニン分子に結合する際に、シャペロニン分子が取り得る構造変化の一つであることを示唆している。これは、これまでの GroEL の構造だけからでは得られなかったものであり、P. cpn60 の構造によって初めて明らかになったものである。

さらに、P. cpn60 で見られるリング開裂の理由を明らかにするため、リング間の相互作用を詳細に検討している。シャペロニンの 2 つのリングは各サブユニット当たり 2 カ所で接触しており、それぞれの接触領域は Left site と Right site と呼ばれている。P. cpn60 の構造を GroEL の構造と比較することによって、Left site の水素結合が一つ減少して、接触面積も小さくなっていることを明らかにしている。ATP 結合に伴う構造の変化はリング間を Left site を介して伝わり、GroEL のリング間相互作用は ATP 存在下で弱まること、ATP γ S 結合型の GroEL の構造でも Left site の相互作用のみが弱くなることを指摘し、これらの特徴に基づいて P. cpn60 で単一リングが観測される理由を考察している。

以上に示した研究成果は、当該分野の進展に確かな寄与があるものであり、本論文は博士 (理学) の学位論文として十分な価値があるものと認められた。また、本論文の研究内容とそれに関連した研究分野についての口頭試問を行った結果、合格と認めた。