

|             |                                                                                                         |
|-------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏 名         | しょう むら やす ひと<br>庄 村 康 人                                                                                 |
| 学位(専攻分野)    | 博 士 (理 学)                                                                                               |
| 学 位 記 番 号   | 理 博 第 2635 号                                                                                            |
| 学位授与の日付     | 平 成 15 年 3 月 24 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 | Structural studies of group II chaperonin from hyperthermophilic archaea<br>(超好熱古細菌由来グループIIシャペロニンの構造解析) |
| 論文調査委員      | (主 査)<br>教 授 三 木 邦 夫    教 授 伊 藤 維 昭    教 授 藤 井 紀 子                                                      |

### 論 文 内 容 の 要 旨

シャペロニンは細胞内に多量に存在する巨大超分子複合体で、細胞内ストレス等により生じた変性タンパク質の高次構造形成を、ATP 依存的に促進する役割を担っている。あらゆる生物はシャペロニンを備えているが、それらはアミノ酸配列の相同性により二つのグループ（グループIおよびII）に分類される。グループIには真正細菌、細胞内小器官由来のシャペロニンが含まれているが、中でも大腸菌由来のシャペロニンはGroELと呼ばれ、その作用機構に関する研究が最もよく進んでいる。一方、真核生物と、その共通の祖先を持つといわれている古細菌由来のシャペロニンはグループIIに分類され、それぞれCCT (TCP-1), Thermosomeと呼ばれているが、その詳細な分子機構はまだ明らかでない。特にGroELは空洞の「ふた」としての役割を担うGroESと呼ばれる補因子が機能上必須であるのに対して、グループIIではシャペロニン自身の挿入残基がこれに相当すると考えられている。また、リング間の相互作用の様式が両者ではまったく異なり、グループIでの分子機構をそのままグループIIに当てはめることはできないと考えられる。本研究では、X線結晶学に基づいた立体構造の研究により、グループIIシャペロニンの動的なメカニズムを解明することを目的として、二種類の準安定化状態の立体構造を決定し、それらの比較を行った。

グループIIシャペロニンとしては、大腸菌の大量発現系から得られた超好熱性古細菌 *Thermococcus* strain KS-1 由来の $\alpha$ サブユニット16量体 (TKSl  $\alpha$  cpn) を用いた。スクリーニングの結果、3種類の結晶化条件が見出され、析出した結晶はそれぞれ異なる結晶形 (Form I, II, III) の属するものであった。放射光を利用したX線回折実験での最高分解能は、それぞれ2.3, 7, 3.0Åであった。Form IIについては、原子位置を決定できるような高分解能データは収集できなかったため、Form I, IIIの回折強度データを用いて構造決定を行った。Form Iの結晶はリフォールディング活性のない変異体 (G65C) および野生体と同様の性質をもつ変異体 (I125T) から得られ、どちらも *Thermoplasma acidophilum* 由来のグループIIシャペロニンの $\alpha$ サブユニットをモデルとした分子置換法によって結晶構造を決定した。また、得られた結晶を10mMヌクレオチド (ADP, AMP-PNP) 溶液に浸漬したヌクレオチド結合型の結晶についても同様に解析した。Form IIIの結晶は結晶化の段階でADPを加えたときのみ生成したもので、ADP結合型の構造を決定した。これらの分子モデルの精密化を完了した時の結晶学的R値は20~24%で、タンパク質の結晶構造として十分の精度を有する分子モデルが得られた。

Form IIIとForm Iの全体構造を比較すると、Form IIIではサブユニット間の分子間相互作用がかなり減少しており、その結果として16量体の中でのサブユニットの向きが傾いて、若干入り口が開いたような構造になっていることが分かった。これまで各ドメイン間の剛体運動がopen formとclosed form間の構造変化に重要であると考えられていたが、サブユニット自身の相対的位置の変化も考慮する必要があることが示唆された。また、グループIシャペロニンとの結晶構造の比較から、グループIIシャペロニンのopen formの立体構造モデルを構築し、そのモデルに基づいて、部位特異的変異G65Cがopen formとclosed form間の構造変化に及ぼす影響を検討した。また、そのモデルに基づいて、グループIIシャペロニン

の動的な分子機構に関する議論を行った。

## 論文審査の結果の要旨

本論文は、超好熱性古細菌 *Thermococcus* strain KS-1 由来のグループⅡシャペロニンの $\alpha$ サブユニット16量体 (TKSI  $\alpha$  cpn) の結晶構造解析を、二種類の異なる結晶形について行い、決定したそれぞれの立体構造を互いに比較し、さらに既知のグループⅠシャペロニンの結晶構造とも比較することによって、グループⅡシャペロニンにおいて起こり得る構造変化を予測し、その動的機構を分子レベルで議論したものである。

これまでにグループⅡシャペロニンの結晶構造はただ一つしか解析例がなく、非常に大きな構造変化が機能上重要であるグループⅡシャペロニンの分子機構の詳細に関しては不明な点が多かった。また、リフォールディング活性を実際に試験管内で再現できるようなグループⅡシャペロニンを用いた結晶構造解析は、今回が初めてであり、本研究によって初めて分子機能と結晶構造の関係についての議論が可能になっている。リフォールディング活性がある変異体と無い変異体の構造がそれぞれ明らかになったことによってともに決定され、両者がリフォールディング反応の活性化状態と考えられる closed form をとり得ることを明らかにしている。また、リフォールディング活性の消失は、65番目のグリシンがシステインに変換されることによってもたらされたのであるが、セリン以上の嵩だかさを持つ残基への置換がリフォールディング活性を消失させるという実験結果から、リフォールディング活性には closed form から open form への構造変化が重要であることを予測し、グループⅠシャペロニンの open form の結晶構造を用いた遷移状態モデルの構築によって、このことを証明している。

また、同種のシャペロニンの立体構造が、二種類の異なる結晶形で決定されたことを利用して、それぞれの立体構造を比較し、closed form においてドメイン間の構造的な揺らぎよりもサブユニット全体の揺らぎの方が顕著であることを明らかにしている。また、この揺らぎが、シャペロニンの「ふた」の部分に大きな構造変化がもたらしていることに着目し、グループⅡシャペロニンにおいて補因子なしに「ふた」の開閉を制御する機構を説明している。

以上の結果を踏まえて、それまで明らかにされていなかったグループⅡシャペロニンの open form のモデルを構築している。結晶構造解析の結果を踏まえて、このシャペロニンサブユニットでの可動な部分を割り出して構築したモデルは、構造生物学的にも根拠のあるものと考えられ、今後のグループⅡシャペロニンの分子機構解明にも寄与すると思われる。

以上のようにこれらの研究成果は、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）の学位論文として価値あるものと認められる。論文内容とそれに関連する分野について試問した結果、合格と認めた。