

氏名	奥田博史		
学位の種類	博士(農学)		
学位記番号	農第109号		
学位授与の日付	平成19年3月22日		
学位授与の要件	学位規程第4条第1項該当		
学位論文題目	Molecular Characterization for <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> GroEL ( <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> GroEL の分子特性)		
論文審査委員 (主査)	教授	松田	一彦
	(副主査)	教授	河村幸雄
	(副主査)	教授	内海龍太郎

あらゆる生命の生理現象は、遺伝情報が発現して生じる RNA とタンパク質が機能することに基いている。タンパク質の構造は、遺伝子に書き込まれている一次元的なアミノ酸配列によって規定される。しかし、細胞内は非常に高濃度のタンパク質溶液であり、新たに合成されたポリペプチドは自身が折りたたまれ立体構造を形成(フォールディング)する前に周囲に存在するタンパク質等と相互作用することで、凝集体を形成してしまう。そこで細胞は、ポリペプチドのフォールディングを補助するタンパク質ファミリーを進化の初期段階で獲得した。このタンパク質ファミリーは、細胞がストレス応答すると高発現し、ストレスにより変性したタンパク質も再度天然状態へ巻き戻す。中でも HSP60 あるいは GroEL と呼ばれるサブファミリーは特によく研究されており、その立体構造および反応メカニズムの詳細が明らかにされてきた。本タンパク質はマグネシウムイオンおよび ATP 存在下で補助タンパク質 GroES を用いて自身の空洞内に取り込む(カプセル化)ことでフォールディングに適した小さな空間を提供する。取り込まれたタンパク質は GroEL 内で凝集の危険なくフォールディングし、放出される。この反応サイクルは約 10 秒で一巡し、ATP の加水分解を伴う。近年、そのダイナミックな反応機構から、GroEL に対してナノデバイスとしての期待が高まってきている。

*Chlamydomonas reinhardtii* は細胞内偏性寄生細菌であり、主に人に感染し肺炎および気管支炎を引き起こす。*C. pneumoniae* は進化の過程でそのゲノム情報を大腸菌のそれと比較して約 1/4 まで短縮させてきた。その反面 *C. pneumoniae* は通常 1 つの *groEL* 遺伝子を進化の初期段階でパラログとして 3 つ獲得している。本研究では、このような特殊なゲノム進化の過程でおこりうる GroEL の性質の変化について調べることによって、本タンパク質におけるフォールディングに係る未同定の機能を解明することを目的とした。

(1) GroEL 依存タンパク質リフォールディング反応における二価カチオンの影響

大腸菌の GroEL のみならず、*C. pneumoniae* の GroEL1 のタンパク質フォールディング活性には二価カチオンとしてマグネシウムが必須である。このことに関連して、マンガン、亜鉛イオンなどの二価カチオンが、GroEL のコンフォメーションを変化させることが最近報告されたが、そのことがどのように GroEL がタンパク質リフォールディング反応に対して影響を及ぼすのか不明であった。そこで、GroEL によってリフォールディングされるときに GroES を必要とする 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (METF) を材料として用いて、METF のカプセル化、ATP 加水分解、GroEL による METF の放出およびフォールディングに対する種々の二価カチオンの影響について研究した。

マンガニウム存在下で、GroEL は ATPase 活性を示し、METF をフォールディングしたが、コバルト、ニッケルおよび亜鉛イオンが存在すると、GroEL は METF をリフォールディングできなかった。プロテアーゼ感受性を指標として GroEL/ES 複合体による基質タンパク質のカプセル化を測定するとともに、ゲルろ過によって複合体からの基質

タンパク質の放出の有無を測定することによって、コバルト、ニッケルおよび亜鉛イオンが存在するときに GroEL がタンパク質をフォールディングできない原因について検討した。その結果、コバルトおよびニッケルイオンが存在するとき、GroEL による ATP の加水分解反応はおこるものの、METF は GroEL/ES 複合体内にカプセル化されたまま放出されず、亜鉛イオンが存在するとき、ATP の加水分解反応すら見られないことが明らかとなった。

### (2) *C. pneumoniae* GroEL1 のフォールディング機能の特徴

*C. pneumoniae* はそのゲノム上に3つの大腸菌 GroEL ホモログをコードする遺伝子を有する。そのうち *groEL1* 遺伝子のみが *groES* 遺伝子とオペロンを組み、ヒートショック等のストレスによって高発現する。このことから、主に GroEL1 が GroES と共同して、*C. pneumoniae* 細胞におけるタンパク質フォールディング反応を行うと推測された。そこで、*groEL1* 遺伝子産物の機能を大腸菌の GroEL のそれと *in vivo* および *in vitro* で比較した。

大腸菌の GroEL と同様に、*C. pneumoniae* の GroEL1 は 37°C および 42°C において METF のリフォールディングを促進した。しかし、*groEL* 遺伝子の変異によって 42°C で生育不能な大腸菌温度感受性株の生育を *groEL1* 遺伝子は相補できなかった。そこで、大腸菌 *groEL* 遺伝子と *C. pneumoniae groEL1* 遺伝子との間で、apical、intermediate、および equatorial domain を交換したキメラを作成し、それぞれのキメラについて大腸菌温度感受性株に対する相補性のみならず、タンパク質カプセル化反応やリフォールディング反応の有無についても検討した。その結果、*C. pneumoniae* GroEL1 の apical domain が熱感受性大腸菌を相補できない因子としてはたらいっていることが明らかとなった。

### (3) GroEL 依存タンパク質フォールディング反応のヌクレオチド選択性

大腸菌 GroEL および *C. pneumoniae* GroEL1 のタンパク質フォールディング機能を、さまざまなタンパク質を基質として用いて比較検討した。その結果、GroES 非依存型の基質タンパク質である D-lactate dehydrogenase や  $\alpha$ -glucosidase のリフォールディング反応では、*C. pneumoniae* GroEL1 が大腸菌 GroEL よりも広範囲のヌクレオチドを利用できることが明らかとなった。そこで、このようなヌクレオチド選択性をもたらす CP GroEL1 の構造要因について、上述のキメラタンパク質を用いて検討した。その結果、*C. pneumoniae* GroEL1 のヌクレオチド選択性に関与する領域は intermediate domain に存在することがわかった。さらに、点変異実験によって、*C. pneumoniae* GroEL1 ヌクレオチド選択性に関与するアミノ酸残基を複数同定した。それらのアミノ酸残基は、*Chlamydomonas* 属細菌でのみ保存されていた。興味深いことに、作成したキメラの中には、ATP 存在下ではタンパク質リフォールディング反応を促進せず、ADP を加えたときにのみリフォールディング反応を促進するものも存在した。

以上の研究成果により、ヌクレオチド選択性を中心とする GroEL の機能を、さまざまな構成要素を使い分けることによってコントロールすることが可能であることが明らかとなった。本研究の過程で、ATP を用いずともタンパク質のフォールディングを促進する GroEL タンパク質を作出した。このようなタンパク質に対して、エネルギーを消費しないタンパク質フォールディングデバイスとしての利用が期待された。

## 論文審査結果の要旨

細胞内において、シャペロニン GroEL は熱ストレスなどによって生じるタンパク質の凝固や変性を防ぐ役割を果たしている。それゆえ、すべての生物細胞にとって GroEL は欠くことはできない因子の一つとなっている。これまで、GroEL のタンパク質リフォールディング機構については、大腸菌の GroEL タンパク質を材料として研究されてきた。それについて簡単に要約する。GroEL に変性ポリペプチドが結合し、次いで ATP、GroES がポリペプチドの結合している GroEL リングに結合して “Pre-cis complex” をつくる。ポリペプチドは GroEL の空洞内で遊離状態となりフォールディングが開始される。この状態 “cis complex” 状態で ATP の加水分解が終了すると、GroES を解離する準備が整う。そして、*trans* リングに ATP が結合すると *cis* リングの GroES は解離する。GroES が解離すると同時に ADP および空洞内の基質タンパク質が解離する。こうして *trans* リングに GroES が結合することで反応サイクルが継続する。GroEL の基質となるタンパク質は 3 種 (Class 1-3) に分類される。Class 1 に属する基質は、自発的にフォールディングすることが可能で、GroEL/ES もしくは GroEL の存在によってさらにフォールディングが促進される。Class 2 に属する基質は、自発的にはフォールディングできず、GroEL、GroEL/ES のいずれによってもフォールディングが促進される。そして、Class 3 に属する基質は、自発的なリフォールディング活性が無く、GroEL/ES 複合体がなければフォールディングされない。

これらの知見は、あくまでも大腸菌の GroEL において成立することであって、他の生物が有する関連タンパク質に対して成り立つとは限らない。学位論文請求者・奥田博史はこのことを念頭において研究した結果、肺炎クラミジア (*Chlamydomydia pneumoniae*) の GroEL ホモログタンパク質 CP GroEL1 が例外的性質をもつことを見事に証明した。*C. pneumoniae* は脊椎動物の細胞に感染する偏性寄生細菌であり、解糖系や TCA 回路の酵素はすべて保有するものの ATP 生産能が低い。そのため、*C. pneumoniae* は ATP の生産を宿主に頼っている。このような制限は、タンパク質フォールディング反応で ATP を利用する GroEL タンパク質にとって一種のストレスとなりうる。実際、奥田は CP GroEL1 のタンパク質フォールディング反応におけるヌクレオチド選択性について調べた結果、EC GroEL よりもはるかに広範囲のヌクレオチドを本反応に利用することができることを発見した。

本研究では、奥田は CP GroEL1 特有のヌクレオチド選択性のほかにも、興味深い知見を多数得ている。まず GroEL の金属選択性に関する研究について見てみる。GroEL がタンパク質フォールディング反応に ATP を用いることは記述のとおりであるが、金属イオンの効果についてはあまり知られていない。奥田はマグネシウムイオンのみならず、マンガンイオンでも GroEL がタンパク質をフォールディングできることを明らかにした。また、コバルト、ニッケルおよび亜鉛イオンでは逆に本反応が阻害されることをも

見出した。ここまでなら現象論であるが、奥田はコバルト、ニッケルおよび亜鉛イオン存在下で GroEL がタンパク質をフォールディングできない理由が、GroES との複合体から放出できないためであることを、カプセル化実験とゲルろ過を用いて突き止めた。とくにこの研究で興味深いのは、コバルトやニッケルイオンが存在するとき ATP は加水分解できるということである。すなわちこの知見は、二価カチオンが ATP との配位だけではなく、フォールディング反応後のタンパク質の放出にかかわることを示唆しており、興味深い。

奥田は、*groEL* 遺伝子に変異をもつために高温では生育不能な大腸菌の *ts* 株を用いて、細胞全体で見たときの CP GroEL1 の機能を評価した。その結果、大腸菌において CP GroEL1 は EC GroEL の役割を肩代わりできないことを見出した。そのことに、基質との相互作用にかかわる apical ドメインにかかわるという。本結果は大変興味深いのが、なぜこのような現象が見出されたのか、詰めが不足していると感じられる。EC GroEL と CP GroEL1 とで基質選択性が異なるためか、それとも CP GroEL1 にない特殊な機能を EC GroEL がもっているためか不明である。最低 apical ドメインのどのアミノ酸残基が関与するのか究明してほしい。このようなアミノ酸を比較的容易に同定する方法がある。*C. pneumoniae* の近縁種 *C. trachomatis* の GroEL1 (CT GroEL1) は本研究で用いた大腸菌 *ts* 変異を相補できると報告されている。したがって、CP GroEL1 と CT GroEL1 の apical ドメインのアミノ酸配列を比較することで、目的とするアミノ酸の候補は見つかるはずである。今後、研究の完成度を高めてほしい。

奥田の博士論文でもっとも充実しているのが、CP GroEL1 の広域ヌクレオチド選択性にかかわる構造因子に関する研究である。GroEL タンパク質はタグを付していないため、一つ一つ大腸菌破砕液から高度に精製しなくてはならず、調製に大変な労力を要する。それを乗り越え、奥田は網羅的に EC GroEL と CP GroEL1 のキメラを構築し、CP GroEL1 が広範囲のヌクレオチドを利用することができる原因が intermediate ドメインのアミノ酸にあることを発見した。そもそも intermediate ドメインにそのような役割があることはこれまで一切報告がなく、独創性に優れている。またそのアミノ酸は、*Chlamydomydia* 属細菌でよく保存されており、分子進化の観点からも興味深い。いち早く、成果を一流誌に発表することが望まれる。

以上の奥田博史の研究成果は、実験量と新規性に優れており、博士の学位授与に十分値すると判断される。