

2014 年度博士論文

分子シャペロン ClpB の基質糸通し活性の解析

甲南大学大学院 自然科学研究科 生命・機能科学専攻

生理化学研究室

中崎 洋介

指導教員 渡辺 洋平 准教授

目次	1
略号	4
要旨	6
1. 序論	7
1-1. 分子シャペロン	
1-2. DnaK (Hsp70) システムの機能	
1-3. ClpB の構造と特徴	
1-4. ClpB の N 末端ドメイン	
1-5. ClpB の Walker 配列	
1-6. ClpB の中央孔の芳香族アミノ酸	
1-7. ClpB のサブユニット界面の保存 Arg 残基	
1-8. ClpB のミドルドメイン	
1-9. ClpB の変異体 BAP	
1-10. 本研究の目的	
2. 実験材料と実験方法	20
2-1. 変異体発現用プラスミドの作製	
2-2. 大腸菌の大量培養	
2-3. タンパク質の精製	
2-4. タンパク質濃度測定	
2-5. α -casein の FITC ラベル化	
2-6. N 末端ドメイン変異体の酸化及びジスルフィド結合形成の確認	
2-7. トリクロロ酢酸 (TCA) 処理	
2-8. IPMDH を用いた凝集体の再生活性の測定	
2-9. α -glucosidase を用いた凝集体の再生活性の測定	
2-10. G6PDH を用いた凝集体の再生活性の測定	
2-11. α -casein を用いた <i>TBAP</i> 変異体および <i>TBAP2</i> のミドルドメイン変異体の糸通し活性の測定	
2-12. 基質タンパク質の結合親和性測定	
2-13. FITC- α -casein を用いた <i>TBAP2</i> の N 末端ドメイン変異体の糸通し活性の測定	
2-14. FITC- α -casein の糸通し反応を利用した <i>TBAP2</i> と <i>TClpP</i> の結合親和性の測定	
2-15. FITC- α -casein を用いた <i>TBAP2</i> 変異体の糸通しにおける速度論パラメータの測定	

2-16.	TBAP2 の ATP 加水分解活性における速度論パラメータの測定	
2-17.	TBAP2 の AAA-1、AAA-2 の保存配列変異体の ATP 加水分解活性の測定	
3.	結果	37
3-1.	TBAP 変異体の作製及び活性測定	
3-1-1.	TBAP シリーズの作製	
3-1-2.	TBAP による凝集体の再生活性および TBAP と TClpP による凝集体分解活性	
3-1-3.	TBAP2 と TClpP による α -casein の分解	
3-2.	ミドルドメイン変異体の作製及び活性測定	
3-2-1.	ミドルドメイン変異体による凝集体の再生活性および TClpP との凝集体分解活性	
3-2-2.	ミドルドメイン変異体の casein 結合親和性	
3-2-3.	ミドルドメイン変異体による α -casein の分解	
3-3.	N 末端ドメイン変異体の作製及び活性測定	
3-3-1.	N 末端ドメイン変異体の酸化及びジスルフィド結合形成の確認	
3-3-2.	N 末端ドメイン変異体による FITC- α -casein の糸通し速度の検出	
3-3-3.	N 末端ドメイン変異体の凝集体の再生活性	
3-4.	基質糸通し活性における速度論パラメータの測定	
3-4-1.	TBAP2 の ATP 加水分解活性における速度論パラメータの測定	
3-4-2.	FITC- α -casein の糸通し反応を利用した TBAP2 と TClpP の結合親和性の測定	
3-4-3.	TBAP2 による FITC- α -casein の糸通しの速度論パラメータの測定	
3-5.	AAA-1、AAA-2 の保存配列変異体の作製及び活性測定	
3-5-1.	中央孔残基変異体による FITC- α -casein の糸通しの速度論パラメータの測定	
3-5-2.	Walker A 変異体による FITC- α -casein の糸通しの速度論パラメータの測定	
3-5-3.	Walker B 変異体による FITC- α -casein の糸通しの速度論パラメータの測定	
3-5-4.	保存 Arg 残基変異体による FITC- α -casein の糸通しの速度論パラメータの測定	
3-5-5.	AAA-1、AAA-2 の保存配列変異体による FITC- α -casein の糸通し速度と ATP 加水分解活性の比較	
3-5-6.	AAA-1、AAA-2 の保存配列変異体による FITC- α -casein の糸通し速度と凝集体の再生活性の比較	

4. 考察	65
5. 結語	68
6. 引用文献	69
7. 公表論文	74

本論文で使用されている略号 (アルファベット順)

ABD-F	4-Fluoro-7-sulfamoylbenzofurazan
ADP	adenosine 5'-diphosphate
Amp	ampicillin
AMP-PNP	adenosine 5'- (beta,gamma-imino) triphosphate
ATP	adenosine 5'-triphosphate
ATP _γ S	adenosine 5'- O- (3-thiotriphosphate)
BAP	ClpB-ClpA-P loop
BSA	bovine serum albumin
CBB	Coomassie brilliant blue
Clp	Caseinolytic protease
DEAE	diethyl-aminoethyl
DTT	dithiothreitol
EClpA	ClpA from <i>Escherichia coli</i>
EClpB	ClpB from <i>Escherichia coli</i>
EClpP	ClpP from <i>Escherichia coli</i>
EDnaK	DnaK from <i>Escherichia coli</i>
FITC	Fluorescein-4-isothiocyanate
G6PDH	Glucose-6-phosphate-dehydrogenase
Hsp	heat shock protein
IPM	isopropylmalate
IPMDH	3-Isopropylmalate dehydrogenase
LDH	lactate dehydrogenase
MOPS	3-morpholinopropanesulfonic acid
NAD ⁺	(酸化型) nicotinamide adenine dinucleotide
NADH	(還元型) nicotinamide adenine dinucleotide
NADP ⁺	(酸化型) nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NADPH	(還元型) nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PEP	phospho enol pyruvate
PK	pyruvate kinase
QAE	quaternary-aminoethyl
SDS	sodium dodecylsulfate
TCEP	Tris (2-carboxyethyl) phosphine hydrochloride
TBAP	BAP from <i>Thermus thermophilus</i>

<i>T</i> ClpB	ClpB from <i>Thermus thermophilus</i>
<i>T</i> ClpP	ClpP from <i>Thermus thermophilus</i>
<i>T</i> DnaJ	DnaJ from <i>Thermus thermophilus</i>
<i>T</i> DnaK	DnaK from <i>Thermus thermophilus</i>
<i>T</i> GrpE	GrpE from <i>Thermus thermophilus</i>
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan

要旨

分子シャペロン ClpB は、DnaK システムと協同して、ストレスによって凝集したタンパク質（凝集体）をほぐし（脱凝集）、再生することができる。その際、ClpB は ATP の結合・加水分解のエネルギーを使って、凝集体を ClpB の 6 量体リング中央の孔に通す（糸通し）ことで脱凝集すると言われている。ClpB のサブユニットは、N 末端ドメイン、ミドルドメイン、2 つの ATPase ドメイン（AAA-1、AAA-2）の 4 つのドメインから成る。N 末端ドメインは他のドメインに比べて高い可動性をもつことが知られている。ミドルドメインはコイルドコイル構造を形成しており、ロイシンジッパー様構造で安定化している。AAA-1、AAA-2 はそれぞれ共通の保存配列を持つ。それらの配列の中でも、Walker A 配列は ATP の結合に、Walker B 配列と保存 Arg 残基は ATP の加水分解に、中央孔残基は基質結合に関わっていることが知られている。しかし、ClpB の各ドメインが基質タンパク質の糸通しにどのように関わっているか、その詳細は明らかでない。

Bukau らによって作製された ClpB の変異体（BAP）は、ClpB と同様の機能を持ったまま、筒型の ClpP プロテアーゼと結合できる。BAP は DnaK システム非存在下でも、ClpP とともに変性モデルタンパク質である casein を分解できるため、ClpB の基質糸通し活性のみを調べることができる変異体である。本研究では、好熱菌 *Thermus thermophilus* の BAP（TBAP）を作製し、様々なドメインの変異を導入し、活性への影響を調べた。その結果、ミドルドメインの安定性は脱凝集における基質結合と糸通し以外の過程に必要であることが分かった。また、N 末端ドメインは casein の糸通しに重要であり、その動きは糸通し活性を促進していることを見出した。更に、AAA-1、AAA-2 の中央孔の Tyr 残基はそれぞれ基質結合に関わっており、Ala 残基に置換しても基質結合後の糸通しは可能であることが分かった。また、AAA-1、AAA-2 のそれぞれのドメインへの ATP の結合も基質結合に関わっており、どちらか片方への ATP の結合が基質結合後の糸通しに必要であることを明らかにした。更に、それぞれのドメインでの ATP の加水分解は基質結合後の糸通しを促進しているが、必要ではないことを見出した。ATP 加水分解活性を全く持たない変異体でも十分な速度で casein を糸通しすることができたことから、ClpB による変性タンパク質の糸通しには、ATP の加水分解は必要ではないことが分かった。これらの結果をもとに、ClpB による変性タンパク質の新たな糸通しモデルを提唱した。本研究の成果は、糸通し活性を共通に持つタンパク質の基質糸通しメカニズムの理解に役立つと期待される。

1. 序論

1-1. 分子シャペロン

タンパク質は正しい立体構造を形成して初めて機能する。通常、タンパク質の立体構造は疎水性残基が内側に、親水性残基が外側に向くように折りたたまれて（フォールディング）、疎水相互作用や水素結合などの非共有結合で安定化している。しかし、温度、pH、塩濃度などの変化によってストレスを受けると、それらの結合が解かれ、疎水性残基が外側に露出したヒモ状の変性タンパク質となる。これらの変性タンパク質は疎水相互作用によって非特異的に会合し、細胞に有害な不溶性の凝集体となってしまう [1]。こういったタンパク質の凝集を防ぎ、正しい立体構造にフォールディングする手助けをしているのが、分子シャペロンと呼ばれる一群のタンパク質である。分子シャペロンとは、様々なタンパク質のフォールディングを助け、最終的にそのタンパク質の構成因子にならないタンパク質のことであり、原核生物から真核生物まで幅広く存在する。分子シャペロンの多くは、熱ショックタンパク質（Hsp）やストレスタンパク質と呼ばれ、熱など様々なストレスに応じて大量に発現し、生命の維持に役立っている [2]。また、一般的な分子シャペロンはヒモ状の変性タンパク質に結合して凝集体形成を防ぎ、再度フォールディングに導く機能を持つが、一度凝集してしまったタンパク質を再生することはできない。しかし、Clp/Hsp100 ファミリーに属する ClpB は、別の Hsp で分子シャペロンである DnaK、DnaJ、GrpE からなる DnaK システムと協力して ATP 依存的に働くことによって、凝集したタンパク質をほぐし（脱凝集）、活性のある状態まで再生することができる（図 1-1） [3-9]。

1-2. DnaK システムの機能

DnaK は ATP 加水分解活性を持つヌクレオチド結合ドメイン、フレキシブルリンカー、基質結合ドメインからなる（図 1-2.A,B）。DnaK は ATP 結合型で基質結合ドメインが開いた状態になり、変性タンパク質などの基質を受け入れ可能にする。ATP が加水分解され、ADP 結合型になると基質結合ドメインは閉じた状態となり、基質タンパク質と強く結合するようになる [1, 2]。この DnaK と基質タンパク質の相互作用を補助しているのが、DnaJ と GrpE である。まず、DnaJ が変性タンパク質と結合し、ATP 結合型の DnaK にそれを受け渡す。この動きに伴って DnaJ は DnaK の ATP 加水分解活性を促進し、ADP 結合型になった DnaK は変性タンパク質との相互作用が安定化する。その後、DnaK-変性タンパク質複合体から DnaJ が解離し、ヌクレオチド交換因子

である GrpE が DnaK のヌクレオチド結合ドメインに結合すると、ADP が解離して ATP 結合型の DnaK が再生する [10]。この ADP/ATP のヌクレオチド交換に伴う構造変化によって、変性タンパク質が解離する。DnaK システムはこのように変性タンパク質と結合・解離を繰り返すことで、凝集体形成を防ぎ、自発的なフォールディングを促進する [11]。また、DnaK システムは、変性タンパク質だけでなく、疎水表面が露出している小さな凝集体も再生することができる。しかし、より厳しい変性条件で形成された大きな凝集体を DnaK システムが再生するためには、ClpB との協力が必要である [7, 12]。その際、先に DnaK システムが凝集体に作用し、ClpB にそれを受け渡していると考えられている [13]。

1-3. ClpB の構造と特徴

ClpB の属する Clp/Hsp100 ファミリーは、より大きな AAA+ (ATPases associated with diverse cellular activities) ファミリーの一部である。AAA+ファミリータンパク質は、Walker 型 ATPase の基本構造の C 末端側に α ヘリックスに富んだサブドメインが付随した ATPase ドメイン (AAA モジュール) を共通に持つ。多くの場合、リング状の多量体を形成して働き、そのリング中央には小さな孔が存在する。Clp/Hsp100 ファミリーに属するタンパク質は、このリング中央の孔に基質タンパク質を通す(糸通し)活性を共通に持つ [2]。

ClpB はリング状の 6 量体を形成して働く (図 1-3.A)。その 6 量体リングの安定性は塩濃度、タンパク質濃度、ヌクレオチドの結合状態に依存する [14-20]。また、ClpB は DnaK システムによって受け渡された凝集体を 6 量体リング中央の孔に糸通しすることで脱凝集すると言われている [13]。

好熱菌 *Thermus thermophilus* の ClpB (TClpB) の結晶構造によると、TClpB のサブユニット 1 つは、 α ヘリックスに富んだ球状構造の N 末端ドメイン、ATP 加水分解活性を持つ 2 つの AAA モジュール (AAA-1、AAA-2)、85 Å と長く特徴的なコイルドコイル構造を持つミドルドメインの 4 つの部分からなる (図 1-3.B) [21]。

1-4. ClpB の N 末端ドメイン

ClpB の遺伝子には、N 末端ドメインに相当する配列の直後にも弱い翻訳開始点があり、生体内では、全長の ClpB の他に N 末端ドメインが欠損した ClpB (ClpB Δ N) も合成されている [22, 23]。ClpB Δ N は ClpB と同様、DnaK システムと共にいくつかの凝集した基質タンパク質を再生できるが、多くの場合は ClpB よりも再生活性が低い

[19, 24-26]。また、ClpB の ATP 加水分解活性は、変性モデルタンパク質である casein が主に N 末端ドメインに結合することによって促進されることが知られている [23, 25, 27]。ClpB の N 末端ドメインは casein の他にも強固に凝集したタンパク質との結合にも関わっていると言われている [26, 28]。結晶構造解析の結果によると、同じヌクレオチド結合状態でも ClpB の N 末端ドメインは他のドメインに対して様々な方向に向いていた (図 1-4) [21]。また、電子顕微鏡像では、N 末端ドメインは見えていない。これらのことから、N 末端ドメインが非常に高い可動性を持つことが示唆されている [29]。

1-5. ClpB の Walker 配列

ClpB の AAA-1、AAA-2 それぞれには Walker 配列と呼ばれる保存配列が存在する (図 1-5.A,B)。GXXGXGKT 配列 (X は任意のアミノ酸残基) は Walker A 配列として知られている。この Lys-Thr を Ala-Ala に置換すると、変異を導入した AAA モジュールへのヌクレオチドの結合が阻害される [18]。ClpB の脱凝集活性には、両方の AAA モジュールへの ATP の結合が必要であり、また、ClpB の 6 量体が安定化するためには、AAA-1 への ATP の結合が重要である [18, 19]。hhhhDE 配列 (h は疎水性アミノ酸残基) は Walker B 配列として知られている。この Glu を Gln または Ala に置換すると、その AAA モジュールでの ATP の結合を阻害せずに、ATP の加水分解が阻害される [18]。両方の AAA モジュールに Walker B 変異を持つ trap 変異体は、基質タンパク質と強く結合することが知られている [30]。また、ClpB の脱凝集活性には、いずれか片方の AAA モジュールでの ATP 加水分解が必要であり、効率的な脱凝集には両方の AAA モジュールでの ATP 加水分解が必要である [18]。

1-6. ClpB の中央孔の芳香族アミノ酸

Clp/Hsp100 ファミリータンパク質のリングの中央孔には pore loop が高度に保存されている [31]。pore loop は aXG 配列 (a は芳香族アミノ酸残基、X は任意のアミノ酸残基) からなり、6 量体リングの中央孔に面している。TClpB の電子顕微鏡像では、ATP 結合状態で pore loop が孔の中心に集まっており、ヌクレオチド非結合状態では、pore loop はフレキシブルであるために見えていない [29]。大腸菌の ClpB (EClpB) では、ATP 結合状態の AAA-1、AAA-2 それぞれの pore loop の Tyr 残基と基質タンパク質との直接的な結合が見られている [13, 32, 33]。その Tyr 残基を Ala 残基に変異させると、凝集体の再生活性や糸通し活性が大きく低下することが知られている [13]。また、AAA タンパク質ファミリーのメンバーで膜結合型プロテアーゼの FtsH は、pore

loop の Phe 残基を性質の大きく異なるアミノ酸残基に変えると基質の分解活性が著しく低下する [34]。

1-7. ClpB のサブユニット界面の保存 Arg 残基

AAA+ファミリータンパク質のサブユニットの界面に高度に保存されている Arg 残基（保存 Arg 残基）は Arg finger とも呼ばれている。この保存 Arg 残基は隣のサブユニットに結合した ATP の γ リン酸基と相互作用し、ATP 加水分解中の遷移状態を安定化することで ATP 加水分解を触媒していると考えられている。7ClpB の AAA-1 には R322 が、AAA-2 には R747 が保存されている（図 1-5.A,B）。これらの Arg 残基を Ala に置換すると、その AAA モジュールでの ATP の結合は阻害されずに、ATP 加水分解だけが阻害される [35]。

1-8. ClpB のミドルドメイン

ClpB のミドルドメインのコイルドコイル構造は Wing-1、Wing-2 と呼ばれる 2 つの羽のような構造からなる（図 1-3.B）。このコイルドコイル構造はロイシンジッパー様構造で安定化されている（図 1-6）。また、N 末端ドメインほどではないが、ミドルドメインも高い可動性を持つ（図 1-4） [21, 29]。ClpB の AAA-1 に ATP が結合すると、ミドルドメインの Wing-1 は AAA-1 側へ傾いて近づき、Wing-2 は AAA-2 から遠ざかる [36]。また、この構造変化が 6 量体を安定化し、ATP 加水分解活性が促進される。更に、ClpB のミドルドメインと AAA-1 に Cys 残基を変異導入し、ジスルフィド結合でドメイン間の動きを制限すると脱凝集活性が失われる [21, 36]。これはミドルドメインが脱凝集と共役して動くことを示している。また最近、DnaK が ClpB のミドルドメインに結合し、ClpB の ATP 加水分解活性を促進することが報告された [37-39]。

1-9. ClpB の変異体 BAP

他の Clp/Hsp100 ファミリータンパク質である ClpA は、ミドルドメインを持たないこと以外は ClpB と構造的に似ている（図 1-7.A）。ClpA は HLH（Helix-Loop-Helix）と呼ばれる領域の loop 部分（ClpP loop）で 14 量体の筒状構造を持つ ClpP プロテアーゼと結合する（図 1-7.A,B）。ClpAP は、異常な mRNA から翻訳された不完全なタンパク質につけられる *ssrA* タグのついたタンパク質などを認識し、ClpP の内部に糸通し

し、分解する (図 1-7.C)。ClpB にも HLH に相当する領域があるが、ClpA とはアミノ酸配列が異なり、ClpP とは結合できない。ドイツの Bukau らは大腸菌の ClpA (*EClpA*) の HLH を *EClpB* の HLH 相当領域に導入した変異体を作製し、BAP (ClpB·ClpA·P loop) と名付けた [13]。BAP は大腸菌の DnaK (*EDnaK*) システムと共に働き、ClpB と同様に凝集した基質タンパク質を脱凝集・再生する (図 1-8.A)。また、大腸菌の ClpP (*EClpP*) 存在下では凝集した基質を脱凝集して、分解する (図 1-8.B)。更に *EDnaK* システム非存在下でも、BAP は *EClpP* とともに変性モデルタンパク質である casein を ATP 依存的に分解することができる (図 1-8.C)。この系を用いれば、*EDnaK* システムに依存しない ClpB の基質糸通し活性のみを検出することができる。

1-10. 本研究の目的

ClpB による脱凝集には、DnaK システムとの協同、ATP の結合・加水分解とそれに伴うミドルドメインの構造変化、6 量体リング中央の孔への凝集タンパク質の糸通しなど様々な過程が必要である。その中で、糸通しは基質に直接作用する主要な過程であり、Clp/Hsp100 ファミリーに共通の過程でもある。*EClpP* と結合できる *EClpB* の変異体 BAP を用いれば、*EDnaK* システム非存在下でも ClpB の糸通し活性を調べることができ、脱凝集活性と糸通し活性を分離して検出することができる。

本研究では、ClpB の基質糸通しのメカニズムを調べることで脱凝集のメカニズムに迫ることを目的とした。*TClpB* は結晶構造が解かれており、変異を導入する部位を選別しやすく、また、*EClpB* とは異なり、Cys 残基を持たないため、任意のドメインの任意の部位に Cys 残基を導入し、ジスルフィド結合を形成させることでそのドメインの可動性を制限することも容易である。そこで、まず BAP と同様の機能を持つ、*TClpB* の変異体 *TBAP* を作製する。次に *TBAP* を用いて、時間分解能、定量性、再現性のよい糸通し速度の測定系を立ち上げ、糸通し速度を反応速度論的に議論できるようにする。更に、N 末端ドメインの欠損や可動性を制限する変異や、ミドルドメインを不安定化させる変異、または中央孔を形成し、ATP の結合・加水分解に関わる AAA-1 と AAA-2 の保存配列の変異を *TBAP* に導入し、糸通し活性への影響を調べる。これにより、基質の糸通しにおける ClpB の各ドメインの役割や貢献度を明らかにする。また、それらの変異体の糸通し活性と ATP 加水分解活性や脱凝集活性を比較し、総合的に評価することで基質糸通しのメカニズムを理解する。

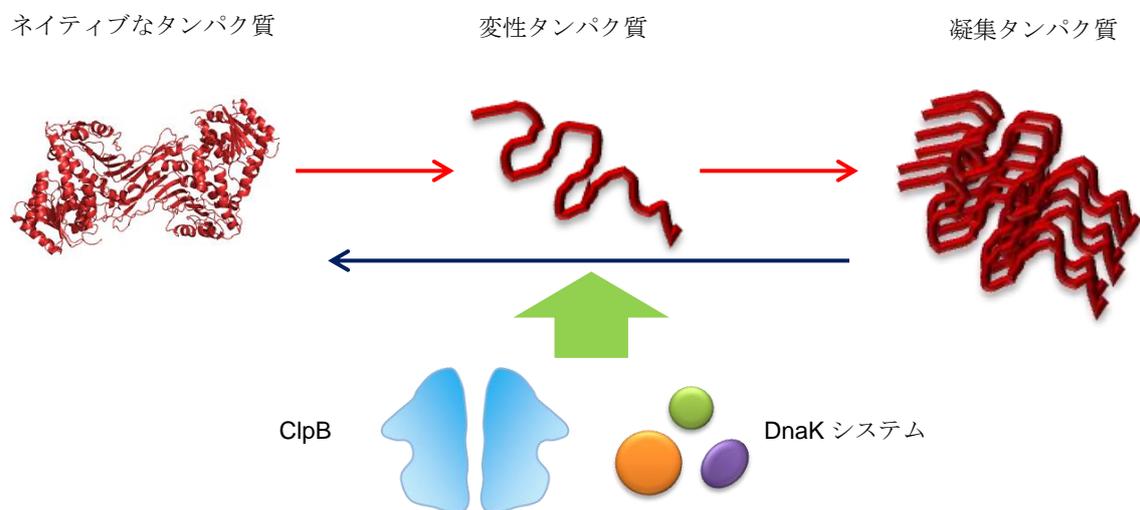


図 1-1. 分子シャペロン ClpB による脱凝集

分子シャペロン ClpB は別の分子シャペロンである DnaK システムと協力して、凝集タンパク質をほぐし（脱凝集）、元の活性のある状態にまで再生することができる。

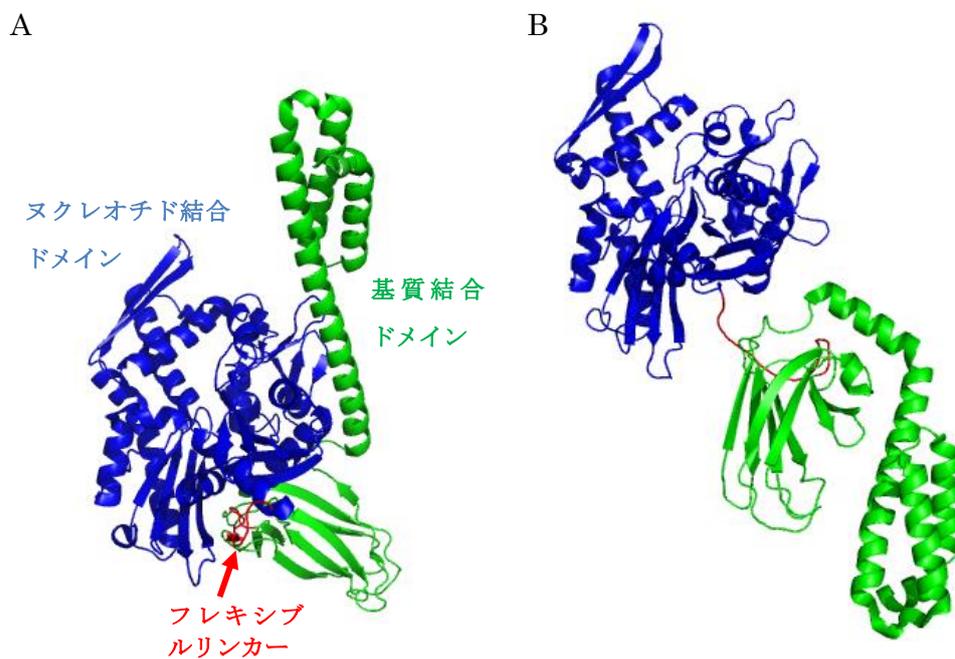


図 1-2. 大腸菌の DnaK (*EDnaK*) の立体構造

A) ATP 結合型の *EDnaK* の立体構造 (PDB 4B9Q) [40]。ヌクレオチド結合ドメインを青色で、フレキシブルリンカーを赤色で、基質結合ドメインを緑色で表示した。

B) ADP 結合型の *EDnaK* の立体構造 (PDB 2KHO) [41]。

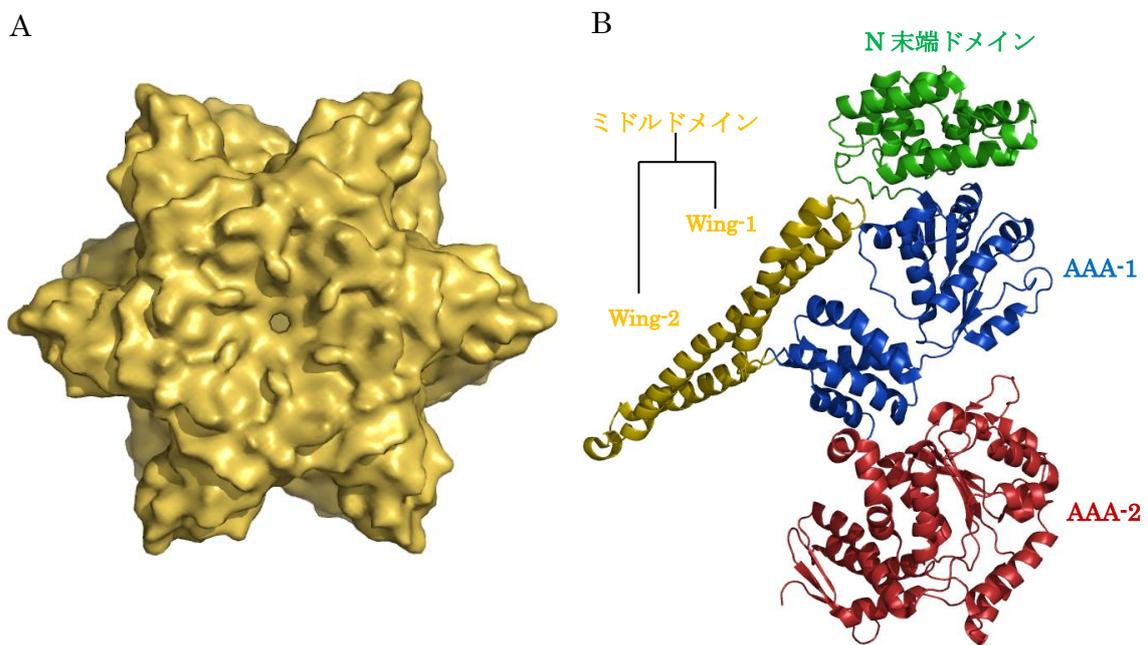


図 1-3. 好熱菌の ClpB (*TClpB*) の立体構造

A) *TClpB* 6量体リングの電子顕微鏡像の三次元再構成図 (EMDB 1244) [29]。B) *TClpB* 単量体の立体構造 (PDB 1QVR) [21]。N末端ドメインを緑色で、AAA-1を青色で、AAA-2を赤色で、ミドルドメインを黄色で表示した。

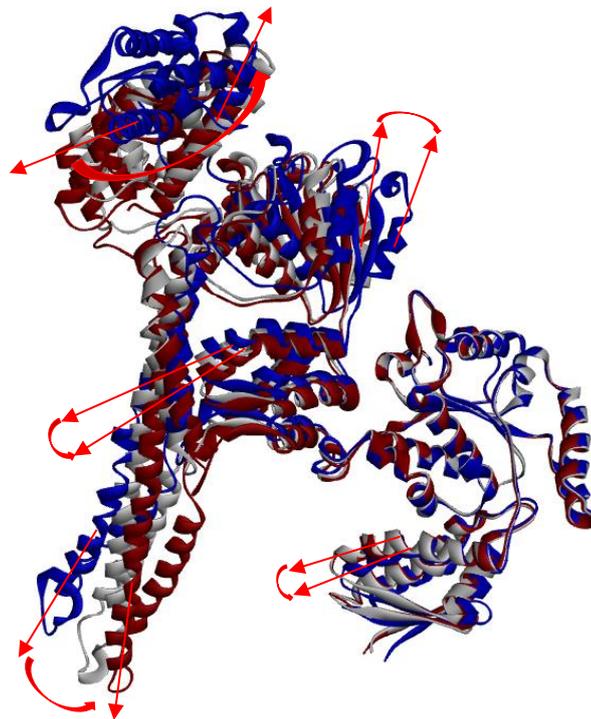


図 1-4. AMP-PNP 結合状態の *TClpB* の立体構造を重ね合わせた図

TClpB の結晶構造解析で得られた AMP-PNP 結合状態の 3 種類の立体構造を AAA-2 の一部で重ね合わせた図。同じヌクレオチド結合状態でも、各ドメインは少なくともこの程度の可動性を持つことが示唆された。

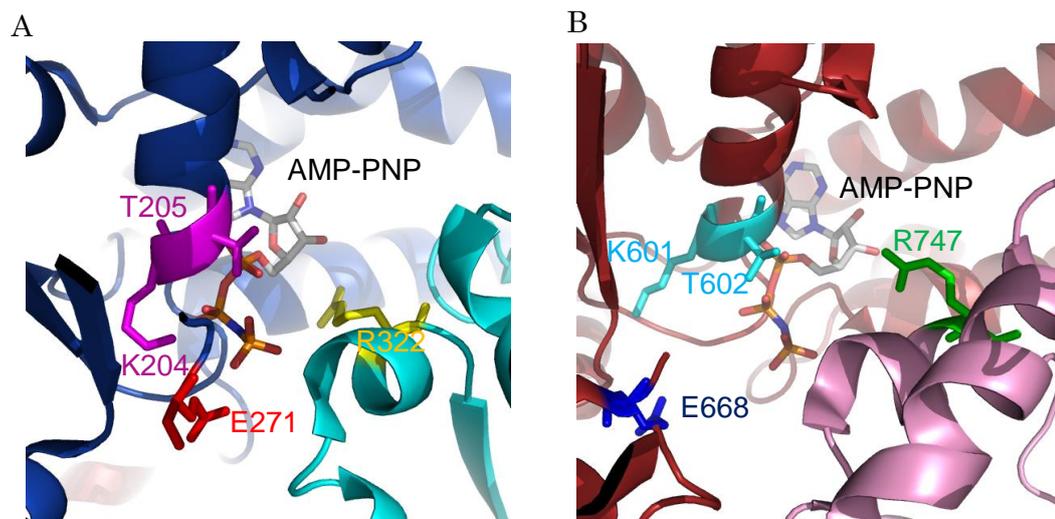


図 1-5. *TClpB* の AAA-1、AAA-2 のサブユニット界面

A) AAA-1 のサブユニット界面の拡大図。左側のサブユニットを青色で、右側のサブユニットを水色で表示した。左側のサブユニットの Walker A 配列の 204 番目の Lys と 205 番目の Thr を赤紫色で、Walker B 配列の 271 番目の Glu を赤色で、右側のサブユニットの 322 番目の保存 Arg を黄色で表示した。B) AAA-2 のサブユニット界面の拡大図。左側のサブユニットを赤色で、右側のサブユニットを桃色で表示した。左側のサブユニットの Walker A 配列の 601 番目の Lys と 602 番目の Thr を水色で、Walker B 配列の 668 番目の Glu を青色で、右側のサブユニットの 747 番目の保存 Arg を緑色で表示した。

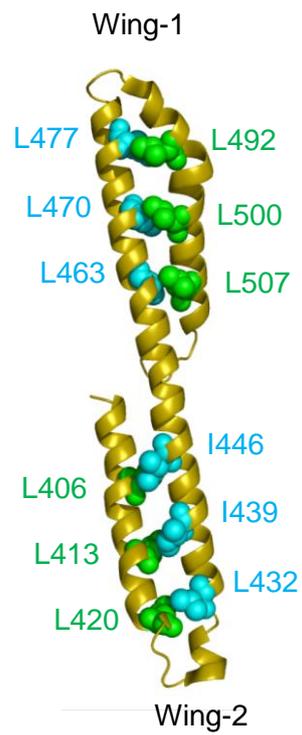


図 1-6. *TClpB* のミドルドメイン

TClpB のミドルドメインの拡大図。ロイシンジッパー様構造を形成している部位を緑色と水色で示した。

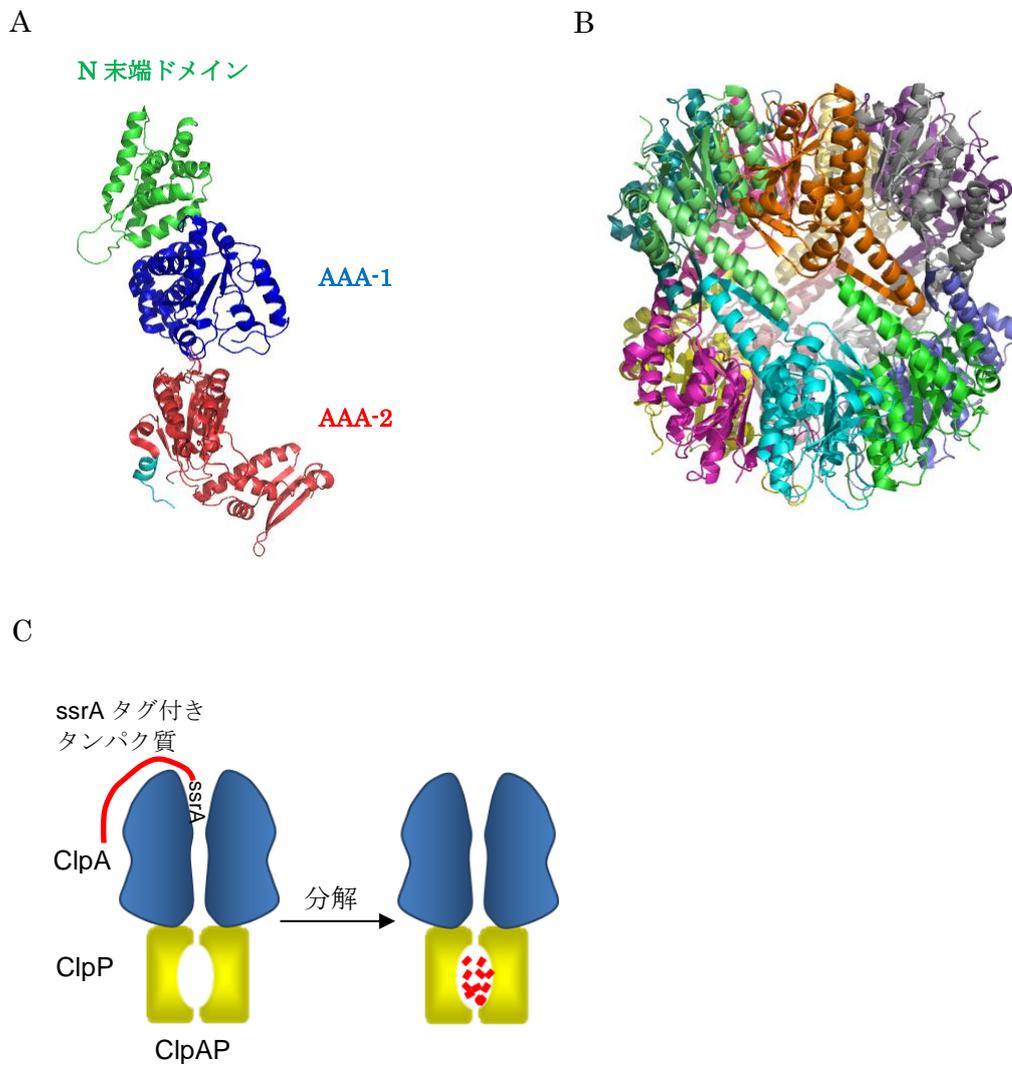


図 1-7. ClpA と ClpP の立体構造と機能

A) *E*ClpA の単量体の立体構造 (PDB 1KSF) [42]。N 末端ドメインを緑色で、AAA-1 を青色で、AAA-2 を赤色で表示した。ClpP loop を含む HLH (Helix-Loop-Helix) 部分を水色で表示した。B) *E*clpP の 14 量体の立体構造 (PDB 1YG6) [43]。サブユニットごとに色を変えて表示した。C) ClpAP による ssrA タグ付きタンパク質の分解。

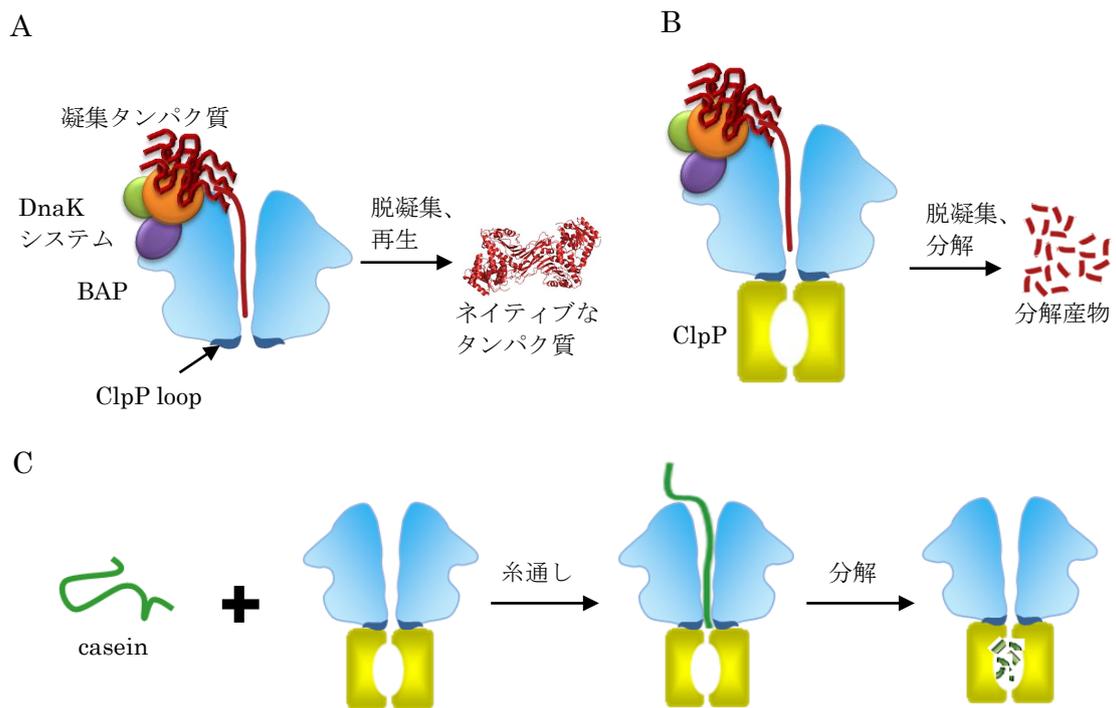


図 1-8. BAP 変異体の機能

A) DnaK システムと BAP による凝集タンパク質の脱凝集・再生。B) DnaK システムと BAP と ClpP による凝集タンパク質の脱凝集・分解。C) BAP と ClpP による変性モデルタンパク質 casein の分解。

2. 実験材料と実験方法

2-1. プラスミドの作製

TClpB 変異体発現用プラスミドの作製は次のように行なった。*pET21c* ベクターのマルチクローニングサイトに、*TClpB* 遺伝子が導入されているプラスミド *pET21c* (N6S0)-*TClpB*、またはその変異体プラスミドを鋳型として、*EX-taq* DNA ポリメラーゼ (Takara) または *KOD FX Neo* DNA ポリメラーゼ (Toyobo) を用いて 2 段階の PCR (オーバーラップ伸長 PCR) を行なった (図 2-1) [44, 45]。用いたプライマーの配列を表 2-1 に、組み合わせを表 2-2 に示した。2 段階目の PCR 反応液をアガロース電気泳動にかけ、目的の大きさの DNA 断片を切り出し、*GFX* (GE Healthcare) を用いて精製した。得られた PCR 産物を指定の制限酵素で処理し、変異配列を含む DNA 断片をアガロース電気泳動と *GFX* を用いて回収した (表 2-3)。ベクターとなるプラスミドも同様に処理し (表 2-3)、それらの断片をリガーゼでつなぎ合わせ、大腸菌 *JM109* を形質転換した。その後、50 µg/ml の Amp を含む LB プレート培地 (1 ℓあたり、5 g Bacto Yeast Extract、10 g Bacto tryptone、10 g NaCl、15 g Agar) で、37°C で 16~18 時間培養し、得られたコロニーを 50 µg/ml の Amp を含む LB 液体培地 (1 ℓあたり、5 g Bacto Yeast Extract、10 g Bacto tryptone、10 g NaCl) 3 ml、37°C で 16~18 時間振とう培養した。培養した菌体を 16,400 G で遠心して回収し、プラスミドは *Accuprep* (Bioneer) を用いて抽出した。PCR 法を用いて作製した変異体発現用プラスミドについて、PCR で増幅させた部分の配列を、DNA シークエンス解析 (*ABI PRISM 310*) により確認した。また、一部の変異体 *TClpB* 発現用プラスミドに関しては、既存のプラスミドを制限酵素とリガーゼを用いて切り貼りすることで作製した。形質転換やプラスミド抽出などは先程と同様の方法で行なった。変異導入の確認は、それぞれの変異部分に予め導入した制限酵素配列を切断することで行なった。

2-2. 大腸菌の大量培養

各タンパク質発現用プラスミドで形質転換した大腸菌 *BL21* (DE3) を LB+Amp プレート培地にスプレッドし、37°C で 16-18 時間培養した。得られたコロニーを指定の液体培地 500 ml で、37°C で 16~18 時間振とう培養した。その後、6,797 G で遠心して菌体を回収し、更に約 25 ml の菌体回収用 Buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.5、150 mM NaCl) で懸濁し、7,900G で遠心して菌体を回収し、-80°C で保存した。*TBAP1*、*TClpP* は 50 µg/ml の Amp を含む 2×YT 液体培地 (1 ℓあたり、5 g Bacto Yeast Extract、8 g

Bacto tryptone、2.5 g NaCl) で、TBAP3、TBAP4 は 50 µg/ml の Amp を含む Super Broth 液体培地 (1 ℓあたり、7.5 g Bacto Yeast Extract、12.5 g Bacto tryptone、2.5 g NaCl) で、その他作製した TClpB とその組み合わせ変異体、または TBAP2 とその組み合わせ変異体は、50 µg/ml の Amp と 178 mM Kpi pH 7.2 を含む Terrific Broth 液体培地 (1 ℓあたり、24 g Bacto Yeast Extract、12 g Bacto tryptone、4 ml 100% glycerol) で培養した。菌体はそれぞれ 4~7 g、7~9 g、11~14 g 得られた。

2-3. タンパク質の精製

TBAP1 の精製を、次の操作で行なった。TBAP1 を発現した菌体を 20 ml の Buffer A (25 mM Tris-HCl pH 7.5、3 mM MgCl₂) + 250 mM NaCl に懸濁した。氷上で超音波破碎機 SONIFIRE 250 (BRANSON) により、output 6、cycle 20、2 分間、細胞を破碎した。その後、細胞破碎液を 80°C、30 分間熱処理し、9,700G で 4°C、30 分間遠心分離した上清を、Buffer A+250 mM NaCl で平衡化した DEAE-Toyopearl カラム (Tosoh) 約 5 ml にアプライして素通りさせた。この素通り画分に、硫酸アンモニウムを 10%になるように加え、同じ濃度の硫酸アンモニウムを含む Buffer A で平衡化した Butyl-Toyopearl カラム (Tosoh) 約 3 ml に吸着させた。Buffer の硫酸アンモニウムの濃度を 10~0%まで徐々に下げて、TBAP1 を溶出させ、1 ml ずつ分取した。TBAP1 を含む画分を集め、PD10 ゲルろ過カラム (GE Healthcare) で Buffer を 50mM MOPS-NaOH pH7.5 に置換した。得られたタンパク質は液体窒素で凍結し、-80°Cで保存した。

TClpB、TBAP2 とその組み合わせ変異体、TBAP3、TBAP4 の精製は次のように行なった。目的タンパク質を発現した菌体を 20 ml の Buffer B (25 mM Tris-HCl pH 7.5、1 mM EDTA) に懸濁した。TBAP1 の場合と同様の条件で、超音波処理、熱処理、および遠心分離を行なった。その上清を Buffer B で平衡化した DEAE-Toyopearl カラム約 10 ml にアプライした。Buffer の塩化ナトリウムの濃度を 0~100 mM まで徐々に上げて、目的タンパク質を溶出させ、分取した。目的タンパク質を含む画分に硫酸アンモニウムを 10%になるように加え、同じ濃度の硫酸アンモニウムを含む Buffer B で平衡化した Butyl-Toyopearl カラム約 5 ml に吸着させた。Buffer の硫酸アンモニウムの濃度を 10~0%まで徐々に下げて、目的タンパク質を溶出させ、1 ml ずつ分取した。目的のタンパク質を含む画分を集めて、PD10 ゲルろ過カラムで Buffer を 50 mM MOPS-NaOH pH 7.5 に置換した。得られたタンパク質は液体窒素で凍結し、-80°Cで保存した。Cys 残基を導入した全ての TClpB および TBAP2 の変異体は 1 mM DTT を含む Buffer B を用いて同様の方法で精製した。

好熱菌の ClpP (TClpP) の精製を次の操作で行なった。TClpP を発現した菌体を 20

ml の Buffer B に懸濁した。TBAP1 の場合と同様の条件で、超音波処理、熱処理、および遠心分離を行なった。その上清を、Buffer B で平衡化した QAE-Toyoparl カラム (Tosoh) 約 7 ml にアプライした。Buffer の塩化ナトリウムの濃度を徐々に上げて、TClpP を溶出させ、分取した。TClpP を含む画分に硫酸アンモニウムを 20% になるように加え、同じ濃度の硫酸アンモニウムを含む Buffer B で平衡化した Butyl-Toyoparl カラム約 2 ml に吸着させた。TClpP を Buffer B で一気に溶出させ、1 ml ずつ分取した。TClpP を含む画分を集めて、PD10 ゲルろ過カラムで Buffer を Buffer MS (50 mM MOPS-NaOH pH 7.5、150 mM KCl、5 mM MgCl₂) または 50 mM MOPS-NaOH pH 7.5 に置換した。得られたタンパク質は液体窒素で凍結し、-80°C で保存した。

好熱菌の DnaK (TDnaK)、DnaJ (TDnaJ)、IPMDH [46]、GrpE (TGrpE) [47]、TClpB-W1-6A、TClpB-W2-6A、TClpB-W1-4A/W2-4A [48] は当研究室で発現、精製されたものを用いた。

2-4. タンパク質の濃度測定

タンパク質の濃度は、ブラッドフォード法を用いて求めた。2.0 mg/ml の牛血清アルブミン (BSA:Sigma) を用いて 0~1 mg/ml の標準溶液を作製した。5 倍希釈した Brad Ford Protein Assay 溶液 (Bio Rad) 500 μ l に標準溶液を 5 μ l 添加し、室温で 10~15 分間インキュベートした。マイクロプレートリーダー Model 550 (Bio Rad) で 595 nm の吸光度を測定し、検量線を作成した。精製したそれぞれのタンパク質を約 0.25 mg/ml の濃度になるように希釈した。この希釈溶液 5 μ l を 5 倍希釈した Brad Ford Protein Assay 溶液 500 μ l に添加し、室温で 10~15 分間インキュベートした。595 nm の吸光度を測定し、検量線から、各タンパク質の濃度を計算した。TDnaK、TDnaJ、IPMDH、 α -glucosidase、G6PDH、FITC- α -casein は単量体、TGrpE は 2 量体、TClpB とその変異体は 6 量体、TClpP は 14 量体として、それぞれのモル濃度を計算した。

2-5. α -casein の FITC ラベル化

Buffer MS 中に 100 μ M α -casein (Sigma)、6 mM FITC (Dojindo) を含む溶液を室温で 60 分間インキュベートし、Buffer MS で平衡化した PD10 ゲルろ過カラムで溶液交換し、未反応の FITC を除いた。FITC- α -casein の 494 nm の吸光度を分光光度計 V-650 (JASCO) で測定し、 α -casein に結合した FITC の濃度を算出した。FITC- κ -casein (ラベル率約 176%) は当研究室の水野が作製したものを使用した [49]。

2-6. N 末端ドメイン変異体の酸化及びジスルフィド結合形成の確認

Cys 残基を導入し、1 mM DTT 入りで精製された *TClpB* または *TBAP2* の N 末端ドメイン変異体を、Buffer A で平衡化した PD10 ゲルろ過カラムに 2 回通すことで溶液交換をし、DTT を除いた。続いて、それらの変異体 1~5 μM に対して最終濃度が 50 μM になるように CuCl_2 を加え、55°C で 1 時間インキュベートして酸化した。その後、50 mM MOPS-NaOH pH 7.5 で平衡化した PD10 ゲルろ過カラムに 2 回通すことで溶液交換をし、 CuCl_2 を除いた。酸化後の溶液を様々な濃度の還元剤 TCEP 存在下 (0, 0.2, 1, 5 mM) で室温で 30 分間インキュベートし、非還元条件下で SDS-PAGE (8% A.A.) にかけた。ジスルフィド結合の形成により、SDS-PAGE のバンドの移動度が変化する変異体は、移動前後のバンドをモレキュラー・イメージャー FX Pro Plus (Bio Rad) で定量することによってジスルフィド結合の形成率を算出した。移動度の違いがあまり見られない変異体もあったため、チオール基反応性の蛍光試薬である ABD-F を用いて以下の方法でジスルフィド結合の形成を確認した。Buffer MS 中に 0.05 μM *TClpB* またはその N 末端ドメイン変異体、60 μM ABD-F を含む溶液を 55°C で 2 分間インキュベートした。蛍光分光光度計 FP-6500 (JASCO) を用いて、励起波長 390 nm、蛍光波長 520 nm における蛍光強度の時間変化を測定した。20 分間反応させた後、最終濃度 5 mM になるように TCEP を加え、更に測定を続けた。

2-7. トリクロロ酢酸 (TCA) 処理

タンパク質溶液に最終濃度 10% になるように TCA を加えて素早く攪拌した。その後、氷上で 10 分間インキュベートし、21,900 G で 4°C、10 分間遠心することで溶液中のタンパク質を沈殿させた。

2-8. IPMDH を用いた凝集体の再生活性の測定

Buffer MS 中に 0.2 μM IPMDH (*Thermus thermophilus* 由来)、3 mM ATP、必要に応じて 5 mM TCEP を含む反応溶液を、89°C で 30 分間インキュベートし、IPMDH を変性・凝集させた。その後、*TDnaK*、*TDnaJ*、*TGrpE* (*TDnaK* システム) と、*TClpB* またはその N 末端ドメイン変異体または *TBAP1*~4 変異体または *TBAP2* のミドルドメイン変異体と、必要に応じて *TClpP* を加えて 55°C、90 分間インキュベートし、再生した IPMDH の活性を測定した。熱変性前の酵素活性を 100% として、IPMDH の回復

率を求めた。IPMDH の酵素活性は、あらかじめ 55°C にしておいた活性測定溶液 (120 mM potassium phosphate pH 7.8, 1.2 M KCl, 1.2 mM MgCl₂, 0.96 mM NAD⁺, 0.48 mM IPM) 500 μl に反応溶液を 100 μl 加えた時の NADH の 340 nm の吸光度の変化を分光光度計 V-530 (JASCO) または V-650 で測定することで求めた (図 2-2)。その後、必要に応じて反応溶液を TCA 処理し、得られた沈殿を SDS-PAGE (12% A.A.) にかけた。CBB で染色し、IPMDH のバンドの量を分析した。反応溶液中に含まれるタンパク質の最終濃度は TDnaK が 0.6 μM、TDnaJ が 0.2 μM、TGrpE が 0.1 μM、TClpB または TBAP1~4 変異体または TBAP2 の組み合わせ変異体が 0.05 μM、TClpP が 0.5 μM である。

2-9. α-glucosidase を用いた凝集体の再生活性の測定

Buffer MS 中に 0.2 μM α-glucosidase (*Bacillus stearothermophilus* 由来:Sigma)、3 mM ATP、必要に応じて 5 mM TCEP を含む反応溶液を 73°C で 10 分間熱処理して α-glucosidase を変性させた。その後、TDnaK システムと TClpB またはその N 末端ドメイン変異体を加えて 55°C、90 分間インキュベートし、再生した α-glucosidase の活性を測定した。熱変性前の酵素活性を 100% として、α-glucosidase の回復率を求めた。α-glucosidase の酵素活性は、あらかじめ 55°C にしておいた α-glucosidase の活性測定用 Buffer (50 mM sodium phosphate pH 6.8) 500 μl と、α-glucosidase の基質溶液 (50 mM sodium phosphate pH 6.8, 12 mM *p*-nitrophenyl-α-D-glucopyranoside) 100 μl の混合溶液に、反応溶液を 10 μl を加え、*p*-nitrophenol の 405 nm の吸光度の変化を分光光度計 V-650 で測定することで求めた (図 2-3)。反応溶液中に含まれるタンパク質の最終濃度は TDnaK が 0.6 μM、TDnaJ が 0.2 μM、TGrpE が 0.1 μM、TClpB またはその N 末端ドメイン変異体が 0.05 μM である。

2-10. G6PDH を用いた凝集体の再生活性の測定

Buffer MS 中に 0.2 μM G6PDH (*Bacillus stearothermophilus* 由来:Unitika)、3 mM ATP、必要に応じて 5 mM TCEP を含む反応溶液を 72°C で 8 分間熱処理して G6PDH を変性させた。その後、TDnaK システムと TClpB またはその N 末端ドメイン変異体を加えて 55°C、90 分間インキュベートし、再生した G6PDH の活性を測定した。熱変性前の酵素活性を 100% として、G6PDH の回復率を求めた。G6PDH の酵素活性は、あらかじめ 55°C にしておいた G6PDH の活性測定用 Buffer (100 mM Tris-HCl pH 8.8, 40 mM MgCl₂) 1000 μl と、G6PDH の基質溶液 (100 mM Tris-HCl pH 8.8, 40 mM

MgCl₂, 6 mM NADP⁺, 18 mM glucose-6-phosphate) 200 μl の混合溶液に、反応溶液を 10 μl 加え、NADPH の 340 nm の吸光度の変化を分光光度計 V-650 で測定することで求めた (図 2-4)。TBAP2 またはその AAA-1、AAA-2 の保存配列変異体による凝集体の再生活性は、Buffer LS (50 mM MOPS-NaOH pH 7.5, 20 mM KCl, 10 mM MgCl₂) 中に 0.2 μM G6PDH、5 mM ATP を含む反応溶液を用いて、同様の方法で測定した。反応溶液中に含まれるタンパク質の最終濃度は TDnaK が 0.6 μM、TDnaJ が 0.2 μM、TGrpE が 0.1 μM、TClpB またはその N 末端ドメイン変異体、TBAP2 またはその AAA-1、AAA-2 の保存配列変異体が 0.05 μM である。

2-11. α-casein を用いた TBAP 変異体および TBAP2 のミドルドメイン変異体の糸通し活性の測定

Buffer MS 中に指定の濃度の α-casein、指定のタンパク質、ATP を含む溶液を 55°C で指定の時間、インキュベートした。反応溶液を TCA 処理し、得られた沈殿を SDS-PAGE (12% A.A.) にかけて。CBB で染色し、α-casein のバンドの減少量から、糸通し活性を調べた。

2-12. 基質タンパク質の結合親和性測定

Buffer MS 中に 0~2 μM の様々な濃度の TClpB のミドルドメイン変異体、3 mM ATP_γS を含む溶液を 55°C で 5 分間インキュベートし、6 量体を形成させた。そこに、最終濃度が 0.014 μM になるように FITC-κ-casein (ラベル率約 176%) を加え、更に 55°C で 10 分間インキュベートした。その後、蛍光分光光度計 FP-6500 と偏光板 FDP-223 (W) を用いて、励起波長 490 nm、蛍光波長 535 nm の蛍光偏光を測定した。蛍光偏光は励起 0° - 蛍光 0° (I_{P0,A0})、励起 0° - 蛍光 90° (I_{P0,A90})、励起 90° - 蛍光 90° (I_{P90,A90})、励起 90° - 蛍光 0° (I_{P90,A0}) の 4 つの組み合わせで測定した。測定した蛍光偏光の強度から、式 1 を用いて、偏光度 *P* を求めた。また、各 TClpB 濃度での *P* をプロットし、式 2 でフィッティングして、*K_d* を求めた。

$$P = \frac{\frac{I_{P90,A90} - I_{P0,A90}}{I_{P0,A0} \cdot I_{P90,A0}}}{\frac{I_{P90,A90} + I_{P0,A90}}{I_{P0,A0} \cdot I_{P90,A0}}} \quad \text{式 1}$$

$$P = \frac{[E] + [L] + K_d - \sqrt{([E] + [L] + K_d)^2 - 4 \cdot [E] \cdot [L]}}{2} \cdot c \quad \text{式 2}$$

P は偏光度、 $[E]$ は $TClpB$ 濃度、 $[L]$ は FITC- κ -casein 濃度、 K_d は解離定数、 c は定数を表す。

2-13. FITC- α -casein を用いた $TBAP2$ の N 末端ドメイン変異体の糸通し活性の測定

Buffer MS 中に $3 \mu\text{M}$ FITC- α -casein (ラベル率約 186%)、 3 mM ATP、 $0.5 \mu\text{M}$ $TClpP$ 、必要に応じて 5 mM TCEP を含む反応溶液を 55°C で 2 分間インキュベートした。蛍光分光光度計 FP-6500 を用いて、励起波長 490nm 、蛍光波長 520nm における蛍光強度の時間変化の測定を開始した。その後、最終濃度が $0.05 \mu\text{M}$ になるように $TBAP2$ またはその N 末端ドメイン変異体を加え、更に 55°C で指定の時間、測定を続けた。 $TBAP2$ 添加時を反応開始時間とし、30 分後の反応溶液を TCA 処理し、得られた沈殿を SDS-PAGE (14% A.A.) にかけた。FITC- α -casein のバンドをモレキュラー・イメージャーで定量し、FITC- α -casein の減少量を求めた。

2-14. FITC- α -casein の糸通し反応を利用した $TBAP2$ と $TClpP$ の結合親和性の測定

Buffer LS 中に、 $0.05\sim 1.5 \mu\text{M}$ の様々な濃度の $TClpP$ 、 $3 \mu\text{M}$ FITC- α -casein (ラベル率約 186%)、 5 mM ATP を含む溶液をセル内で 55°C 、2 分間インキュベートした。蛍光分光光度計 FP-6500 を用いて、励起波長 490 nm 、蛍光波長 520 nm における蛍光強度の時間変化の測定を開始した。その後、最終濃度が $0.05 \mu\text{M}$ になるように $TBAP2$ を加え、更に 5 分間測定を続けた。各 $TClpP$ 濃度での FITC- α -casein の分解の初速をプロットし、式 3 でフィッティングして K_d を求めた。

$$v = \frac{[E] + [L] + K_d - \sqrt{([E] + [L] + K_d)^2 - 4 \cdot [E] \cdot [L]}}{2} \cdot c \quad \text{式 3}$$

v は FITC- α -casein の分解の初速度、 $[E]$ は $TClpB$ 濃度、 $[L]$ は $TClpP$ 濃度、 K_d は解離定数、 c は定数を表す。

2-15. FITC- α -casein を用いた *TBAP2* 変異体の糸通しにおける速度論パラメータの測定

Buffer LS 中に 2.0 μM *TClpP*、0.1~4 μM の様々な濃度のラベル率約 186%または約 194%の FITC- α -casein、5 mM ATP を含む反応溶液を 55°Cで 2 分間インキュベートした。蛍光分光光度計 FP-6500 を用いて、励起波長 490 nm、蛍光波長 520 nm における蛍光強度の時間変化の測定を開始した。その後、最終濃度が 0.05 μM になるように *TBAP2* またはその AAA-1、AAA-2 の保存配列変異体を加え、更に 5 分間測定を続けた。各 FITC- α -casein 濃度での FITC- α -casein の分解の初速をプロットし、ミカエリス・メンテン式 (式 4) でフィッティングして k_{cat} と K_{m} を求めた。

$$v = \frac{k_{\text{cat}} \cdot [\text{S}]}{K_{\text{m}} + [\text{S}]} \quad \text{式 4}$$

v は FITC- α -casein の分解の初速度、 k_{cat} は触媒定数、 K_{m} はミカエリス定数、 $[\text{S}]$ は FITC- α -casein 濃度を表す。

2-16. *TBAP2* の ATP 加水分解活性における速度論パラメータの測定

ATP 加水分解活性測定溶液 (50 mM MOPS-NaOH pH 7.5、20 mM KCl、10 mM MgCl_2 、2.5 mM PEP、0.2 mM NADH、50 $\mu\text{g/ml}$ PK (ウサギの筋肉由来:Roche)、50 $\mu\text{g/ml}$ LDH (ウサギの筋肉由来:Roche) 中に、0.05 μM *TBAP2* を含む溶液をセル内で 55°C、2 分間インキュベートし、分光光度計 V-650 で NADH の 340 nm の吸光度の時間変化の測定を開始した。その後、最終濃度が 0.05、0.2、0.5、1、2、3、5 mM になるように ATP を加えて測定を続けた。ATP 加水分解活性の速度は NADH の 340 nm の吸光度変化と、NADH の分子吸光係数 ($\epsilon_{340} = 6220 \text{ M}^{-1}$) から求めた (図 2-5)。各 ATP 濃度での ATP 加水分解の速度をプロットし、ヒルの式 (式 5) でフィッティングし、 k_{cat} と K_{m} と n を求めた。

$$v = \frac{k_{\text{cat}} \cdot [\text{S}]^n}{K_{\text{m}}^n + [\text{S}]^n} \quad \text{式 5}$$

v は ATP 加水分解速度、 k_{cat} は触媒定数、 K_{m} はミカエリス定数、 n はヒル係数、 $[\text{S}]$ は ATP 濃度を表す。

2-17. TBAP2 の AAA-1、AAA-2 の保存配列変異体の ATP 加水分解活性の測定

5 mM ATP を含む ATP 加水分解活性測定溶液をセル内で 55°C、2 分間インキュベートし、分光光度計 V-650 で NADH の 340 nm の吸光度の時間変化の測定を開始した。その後、TBAP2 またはその AAA-1、AAA-2 の保存配列変異体を加えて反応を開始し、続いて α -casein を加えて測定を続けた。ATP 加水分解活性の速度は NADH の 340 nm の吸光度変化と、NADH の分子吸光係数 ($\epsilon_{340}=6220 \text{ M}^{-1}$) から求めた。反応溶液中に含まれるタンパク質の最終濃度は TBAP2、TBAP2-1E/Q、TBAP2-1Y/A が 0.05 μM 、TBAP2-2E/Q、TBAP2-2Y/A、TBAP2-1R/A が 0.25 μM 、TBAP2-1KT/AA、TBAP2-2KT/AA、TBAP2-2R/A が 0.8 μM 、 α -casein が 4 μM である。

表 2-1. 使用プライマー

Primer	Sequence(5'-3')
<i>TBAP</i> -f	CCAGCAAAGAAGTGGATACCGAAAGCCCGCTTAAAGCGCTGTTCCGCCCGAG
<i>TBAP</i> -r	CACTTCTTTGCTGGTAAAGCCGATCGCCGGGCCACATTATACCCAGGTTGGAG
<i>TBAP2</i> -SP-f	CAACCTGGGGAGCCCCATAATGTGG
<i>TBAP2</i> -SP-r	CCACATTATAGGGGCTCCCCAGGTTG
<i>TBAP2</i> -QQH-f	GCGCTGCAGCAGCACTCCGCCCGAG
<i>TBAP2</i> -QQH-r	CGGAAGTGCTGCTGCAGCGCTTTAAGCGGG
<i>TBAP3</i> -f	GCTTTACCTCAGAGCGTATACGGGACGAGGTCTT
<i>TBAP4</i> -f	GCTTTACCTCAAAAGAGAGGATCCGGG
<i>TBAP3,4</i> -r	TGAGGTAAAGCCGATCGCGAGGCCCTCGAG
T7F24	GAAATTAATACGACTCACTATAGG
<i>TClpB</i> -f1	AGCTCAAGGACCGCTACGTG
<i>TClpB</i> -f2.9	TCCCACCGGTACATCACGGAAAGGC
T7R24	CTAGTTATTGCTCAGCGGTGGCAG
<i>TClpB</i> -r2.5	TCCTTCTCAATCTCCCGGTACTC
<i>TClpB</i> -Y243A-f	AAGGCGCGCGGCGAGTTTGAGG
<i>TClpB</i> -Y243A-r	GCCGCGCGCCTTGCCCCG
<i>TClpB</i> -Y643A-f	CGCGCCGCCCGGCGCGGTGGGCTACG
<i>TClpB</i> -Y643A-r	CGCGCCGGGCGGCGCGCCGATGAGGCGGGAGAC

表 2-2. 使用プライマーの組み合わせ

Plasmid	PCR	Forward primer	RiVerse primer	Template
pET21c(N6S0)-TBAP1	1st	<i>TClpB</i> -f2.9	<i>TBAP</i> -r	pET21c(N6S0)- <i>TClpB</i>
		<i>TBAP</i> -f	<i>T7R24</i>	
	2nd	<i>TClpB</i> -f2.9	<i>T7R24</i>	1st PCR産物
pET21c(N6S0)-TBAP2	1st	<i>TClpB</i> -f2.9	<i>TBAP2</i> -SP-r	pET21c-TBAP1
		<i>TBAP2</i> -SP-f	<i>TBAP2</i> -QQH-r	
		<i>TBAP2</i> -QQH-f	<i>T7R24</i>	
	2nd	<i>TClpB</i> -f2.9	<i>T7R24</i>	1st PCR産物
pET21c(N6S0)-TBAP2ΔN	1st	<i>TClpB</i> -f2.9	<i>TBAP2</i> -SP-r	pET21c-TBAP1
		<i>TBAP2</i> -SP-f	<i>TBAP2</i> -QQH-r	
		<i>TBAP2</i> -QQH-f	<i>T7R24</i>	
	2nd	<i>TClpB</i> -f2.9	<i>T7R24</i>	1st PCR産物
pET21c(N6S0)-TBAP3	1st	<i>TClpB</i> -f2.9	<i>TBAP3,4</i> -r	pET21c(N6S0)- <i>TClpB</i>
		<i>TBAP3</i> -f	<i>T7R24</i>	
	2nd	<i>TClpB</i> -f2.9	<i>T7R24</i>	1st PCR産物
pET21c(N6S0)-TBAP4	1st	<i>TClpB</i> -f2.9	<i>TBAP3,4</i> -r	pET21c(N6S0)- <i>TClpB</i>
		<i>TBAP4</i> -f	<i>T7R24</i>	
	2nd	<i>TClpB</i> -f2.9	<i>T7R24</i>	1st PCR産物
pET21c(N6S0)-TBAP2-Y243A	1st	<i>TClpB</i> -f1	<i>TClpB</i> -Y243A-r	pET21c(N6S0)- <i>TClpB</i>
		<i>TClpB</i> -Y243A-f	<i>TClpB</i> -r2.5	
	2nd	<i>TClpB</i> -f1	<i>TClpB</i> -r2.5	1stPCR産物
pET21c(N6S0)-TBAP2-Y643A	1st	<i>TClpB</i> -f2.9	<i>TClpB</i> -Y643A-r	pET21c(N6S0)-TBAP2
		<i>TClpB</i> -Y643A-f	<i>T7R24</i>	
	2nd	<i>TClpB</i> -f2.9	<i>T7R24</i>	1stPCR産物

表 2-3. 制限酵素処理の組み合わせ

Plasmid	Insert	Vector	制限酵素	DNA断片	
pET21c(N6S0)-TBAP1	2nd PCR産物	pET21c(N6S0)-TClpB	Aat II Sac II	約500	Insert
pET21c(N6S0)-TBAP2				約7500	Vector
pET21c(N6S0)-TBAP3		約500		Insert	
pET21c(N6S0)-TBAP4		約7100		Vector	
pET21c(N6S0)-TBAP2AN		pET21c(N6S0)-TClpBAN			
pET21c(N6S0)-TBAP2-W1-6A	pET21c(N6S0)-TClpB-W1-6A	pET21c(N6S0)-TBAP2	NheI Csp45I	約700	Insert
pET21c(N6S0)-TBAP2-W2-6A	pET21c(N6S0)-TClpB-W2-6A			約7300	Vector
pET21c(N6S0)-TBAP2-W1-4A/W2-4A	pET21c(N6S0)-TClpB-W1-4A/W2-4A				
pET21c(N6)-TBAP2-1E/Q	pET21c(N6S0)-TBAP2	pET21c(N6)-TClpB-1E/Q	Aat II EcoRI	約600	Insert
pET21c(N6)-TBAP2-2E/Q		pET21c(N6)-TClpB-2E/Q		約7400	Vector
pET21c(N6)-TBAP2-1,2E/Q		pET21c(N6)-TClpB-1,2E/Q			
pET21c(N6S0)-TBAP2-2KT/AA		pET21c(N6S0)-TClpB-2KT/AA			
pET21c(N6S0)-TBAP2-Y643A	2nd PCR産物	pET21c(N6S0)-TBAP2	Csp45I EcoRI	約1000	Insert
pET21c(N6S0)-TBAP2-1KT/AA	pET21c(N6S0)-TBAP2	pET21c(N6S0)-TClpB-1KT/AA			
pET21c(N6S0)-TBAP2-1KT/AA-2KT/AA	pET21c(N6S0)-TBAP2-2KT/AA	pET21c(N6S0)-TBAP2-1KT/AA			
pET21c(N6S0)-TBAP2-1R/A-2R/A	pET21c(N6S0)-TBAP2-2R/A	pET21c(N6S0)-TBAP2-1R/A	約7000	Vector	
pET21c(N6S0)-TBAP2-Y243A-Y643A	pET21c(N6S0)-TBAP2-Y643A	pET21c(N6S0)-TBAP2-Y243A			
pET21c(N6S0)-TBAP2-Y243A	2nd PCR産物	pET21c(N6S0)-TBAP2	EcoT22I NheI	約400	Insert
				約7600	Vector

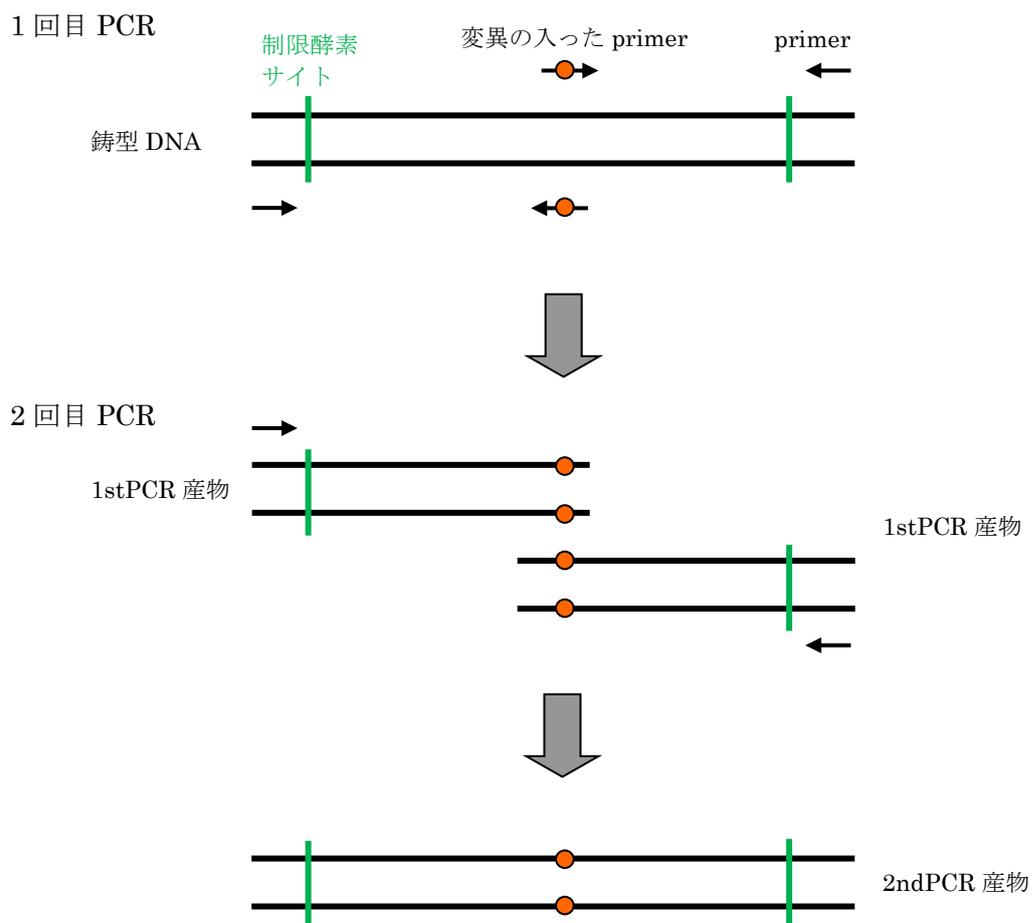


図 2-1. オーバーラップ伸長 PCR 法

変異部分を橙色で示した。1 回目の PCR の産物を鋳型にして 2 回目の PCR を行う。

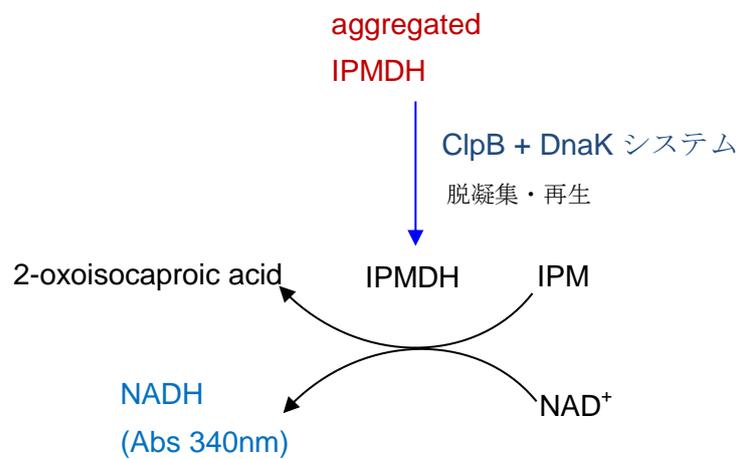


図 2-2. 熱凝集 IPMDH の再生活性の測定法

IPMDH が IPM を 2-oxoisocaproic acid にする反応と、 NAD^+ の還元反応を共役させることにより、IPMDH の酵素活性を NADH の 340 nm の吸光度変化として検出した。ClpB による凝集体の再生活性は、熱凝集 IPMDH の酵素活性がどの程度回復したかで相対的に求めた。

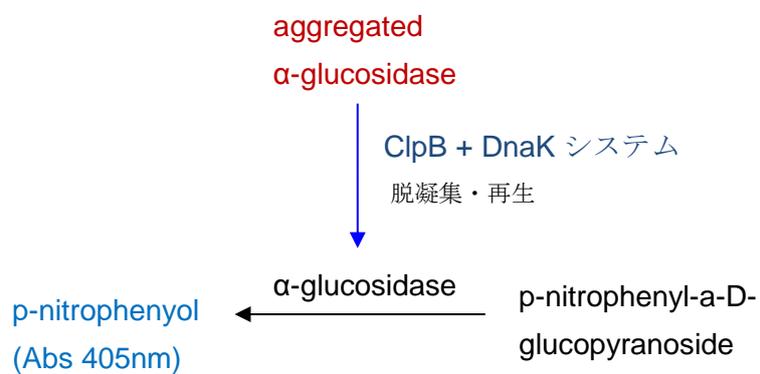


図 2-3. 熱凝集 α-glucosidase の再生活性の測定法

p-nitrophenyl-a-D-glucopyranoside を p-nitrophenol にする α-glucosidase の酵素活性を 405 nm の吸光度変化として検出した。ClpB による凝集体の再生活性は、熱凝集 α-glucosidase の酵素活性がどの程度回復したかで相対的に求めた。

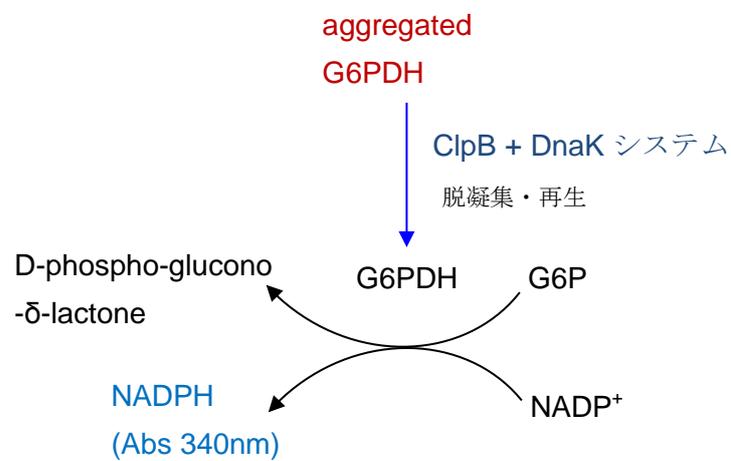


図 2-4. 熱凝集 G6PDH の再生活性の測定法

G6PDH が G6P を D-phospho-glucono- δ -lactone にする反応と、NADP⁺の還元反応を共役させることにより、G6PDH の酵素活性を NADPH の 340 nm の吸光度変化として検出した。ClpB による凝集体の再生活性は、熱凝集 G6PDH の酵素活性がどの程度回復したかで相対的に求めた。

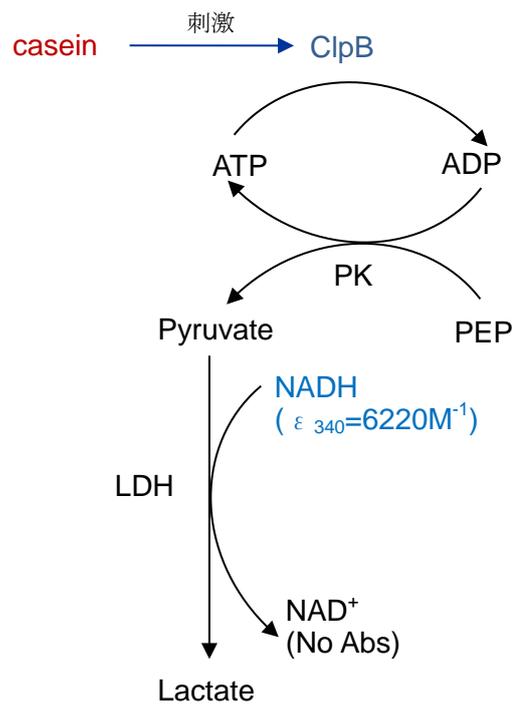


図 2-5. ATP 加水分解活性の測定法

PK と LDH を用いて、ClpB が加水分解した ATP を再生する反応と、NADH の酸化反応を共役させることにより、ATP の加水分解を NADH の 340 nm の吸光度変化として検出した。

3. 結果

3-1. TBAP 変異体の作製及び活性測定（副論文 I）

3-1-1. TBAP シリーズの作製

Bukau らは *EClpA* の HLH を *EClpB* の HLH 相当領域に導入することによって BAP を作製した。この変異体は *EClpP* と結合して基質を分解するという特徴があり、*EDnaK* システム非存在下で casein を分解できる。これは *ClpB* の糸通し活性のみを調べる道具として有用だと考えられたため、*TClpB* についても同様の変異体 (*TBAP*) の作製を検討した。大腸菌の場合とは違い、好熱菌の *ClpA* (*TClpA*) の HLH と *TClpB* の HLH 相当領域は配列の長さが異なっていたため、配列をそのまま入れ換えた *TBAP1*、長さをそろえた *TBAP2*、*ClpP* loop 付近だけを入れ換えた *TBAP3*、*TBAP4* を作製した (図 3-1)。

3-1-2. TBAP による凝集体の再生活性および TBAP と TClpP による凝集体分解活性

熱で凝集させた IPMDH に、ATP 存在下で *TDnaK* システムと *TBAP1*~*4* 変異体を加えてインキュベートし、酵素活性の回復を見た (図 3-2.A)。その結果、*TBAP1*、*TBAP2*、*TBAP3*、*TBAP4* の全てで IPMDH の活性が熱処理前の 40-65%程度まで回復した。同様の実験を、*TClpP* 存在下で行なったところ、*TBAP2* でのみ活性回復の顕著な阻害が見られた。また、反応後の溶液を TCA 処理し、得られた沈殿を SDS-PAGE にかけた (図 3-2.B)。すると *TBAP2* と *TClpP* が共存した場合のみ、IPMDH のバンドが減少した。これは、*TBAP2* が *TClpP* と結合し、IPMDH を分解したためと考えられる。

3-1-3. TBAP2 と TClpP による α -casein の分解

BAP の研究では、凝集していない変性モデルタンパク質である casein は *DnaK* システムなしでも BAP と *ClpP* によって分解されることが示されている [13]。そこで、*TBAP2*、*TClpP*、 α -casein、ATP を含む溶液を 55°C で 90 分間インキュベートした。反応後の溶液を TCA 処理し、得られた沈殿を SDS-PAGE にかけたところ、 α -casein のバンドが減少していた。*TBAP2* のみ、*TClpB* と *TClpP*、または *TClpP* のみでは、 α -casein のバンドは減少しなかった (図 3-3)。

3-2. ミドルドメイン変異体の作製及び活性測定（副論文 I）

3-2-1. ミドルドメイン変異体による凝集体の再生活性および *TClpP* との凝集体分解活性

W1-6A、W2-6A、W1-4A/W2-4A はミドルドメインのロイシンジッパー構造の一部を Ala で置換し、部分的に不安定にさせた変異体である。W1-6A は Wing-1 の L463-L507、L470-L500、L477-L492 の 3 対に、W2-6A は Wing2 の L406-I446、L413-I439、L420-L432 の 3 対に、W1-4A/W2-4A は Wing1,2 の外側の L470-L500、L477-L492、L413-I439、L420-L432 を 2 対ずつに変異をいれた（図 1-5）。これらのミドルドメイン変異体は、*TClpB* と同様に 6 量体形成能を持っている。これらの変異と *TBAP2* を組み合わせた変異体を作製し、活性への影響を調べた。まず、熱で凝集させた IPMDH に *TDnaK* システムと *TBAP2* のミドルドメイン変異体を加えて 55°C で 90 分間インキュベートし、酵素活性の回復を見た（図 3-4.A）。その結果、*TBAP2*-W1-6A、*TBAP2*-W2-6A、*TBAP2*-W1-4A/W2-4A のいずれの変異体でも IPMDH の活性の回復は見られなかった。また、同様の実験を、*TClpP* 存在下で行ない、反応後の溶液を TCA 処理し、得られた沈殿を SDS-PAGE にかけた（図 3-4.B）。すると、いずれの *TBAP2* のミドルドメイン変異体を用いた場合でも IPMDH のバンドは減少しなかった。

3-2-2. ミドルドメイン変異体の casein 結合親和性

様々な濃度の *TClpB* のミドルドメイン変異体と FITC- κ -casein（ラベル率約 176%）を混合し、蛍光偏光解消法により、偏光度を測定した。各 *TClpB* の濃度に対して偏光度をプロットし、式 2 でフィッティングして、解離定数 K_d を求めた（図 3-5）。*TClpB*、*TClpB*-W1-6A、*TClpB*-W2-6A、*TClpB*-W1-4A/W2-4A の casein に対する K_d はそれぞれ 0.02 μ M、0.03 μ M、0.11 μ M、0.11 μ M で、*TClpB*-W2-6A と *TClpB*-W1-4A/W2-4A の casein との親和性は *TClpB* よりもやや低めではあったが、casein との結合能を十分に持っていた。

3-2-3. ミドルドメイン変異体による α -casein の分解

TBAP2 のミドルドメイン変異体、*TClpP*、 α -casein、ATP を含む溶液を、55°C でインキュベートし、反応時間ごとに反応溶液を TCA 処理し、得られた沈殿を SDS-PAGE にかけた。すると、*TBAP2*-W1-6A、*TBAP2*-W2-6A、*TBAP2*-W1-4A/W2-4A の全てで *TBAP2* の場合と同様に α -casein のバンドが減少した（図 3-6）。

3-3. N 末端ドメイン変異体の作製及び活性測定（副論文 II）

3-3-1. N 末端ドメイン変異体の酸化及びジスルフィド結合形成の確認

同じヌクレオチド結合状態でも *TClpB* の N 末端ドメインのヘリックス A5 が 6 量体リングの内側を向いているサブユニットと、外側に向いているサブユニットが結晶構造解析で解かれている（図 3-7.A,B）。当研究室の水野が作製した *TClpB-E12C/R228C* はジスルフィド結合を形成させることにより、N 末端ドメインのヘリックス A5 を 6 量体リングの内向きに（*TClpB-NXin*）、*TClpB-R136C/Q260C* は外向きに（*TClpB-NXout*）固定することができると期待される。同様に作製された *TClpB-R23C* とこれらの変異体を CuCl_2 存在下で酸化してジスルフィド結合を形成させ、SDS-PAGE にかけた（図 3-8.A）。還元剤 TCEP 非存在下では、*TClpB-R23C* のバンドは大きく上に移動し、そのバンドは TCEP の濃度の増加に伴って下に移動した。また、*TClpB-NXout* のバンドは TCEP 非存在下でわずかに上に移動し、TCEP の濃度の増加に伴って下に移動した。これらのバンドを定量したところ、*TClpB-R23C*、*TClpB-NXout* とともに約 90%、ジスルフィド結合を形成していた。一方、*TClpB-NXin* のバンドは、TCEP の有無に関わらず移動度の変化が見られなかった。ジスルフィド結合を形成していても移動度に変化が見られない場合もあるため、蛍光試薬である ABD-F を用いて、更にジスルフィド結合形成の確認を行なった（図 3-8.B）。ABD-F は Cys 残基のチオール基に結合して蛍光を発するため、未酸化でフリーの Cys 残基を検出することができる。*TClpB* は Cys 残基を持たないため、TCEP の有無で ABD-F の蛍光強度の有意な変化は見られなかった。一方、*TClpB-NXin*、*-NXout*、*-R23C* は TCEP 非存在下では ABD-F の蛍光強度の変化は見られなかったものの、TCEP 添加後は蛍光強度の大きな変化が見られた。これは *TClpB-R23C* や *TClpB-NXout* の場合と同様に、*TClpB-NXin* のほとんどがジスルフィド結合を形成していることを示している。

3-3-2. N 末端ドメイン変異体による FITC- α -casein の糸通し速度の検出

ジスルフィド結合を形成させ、N 末端ドメインの動きを制限した変異体と、N 末端ドメインを欠損させた *TClpB Δ N* の糸通し活性を調べた。蛍光色素は高密度で存在すると、近接した蛍光分子同士で消光（クエンチ）を起こすことが知られている。そこで、 α -casein を FITC で高密度にラベルしてクエンチ状態にし、FITC- α -casein の分解を、蛍光強度の回復で検出した。*TBAP2* の N 末端ドメイン変異体、*TClpP*、FITC- α -casein（ラベル率約 186%）、ATP、必要に応じて TCEP を含む溶液を 55°C でインキュベートし、蛍光強度の時間変化を測定した（図 3-9.A,B）。TCEP の有無に関わらず、*TBAP2*

は *TClpP* とともに FITC- α -casein を十分な速度で分解し、蛍光強度が大きく上昇した。一方、*TBAP2* Δ N では、TCEP の有無に関係なく、蛍光強度がほとんど上昇しなかった。また、*TBAP2*-NXin、*TBAP2*-NXout、*TBAP2*-R23C では、蛍光強度の上昇が見られ、その上昇速度は TCEP 非存在下で有意に減少した。反応後の溶液を TCA 処理し、得られた沈殿を SDS-PAGE にかけて、FITC- α -casein の量を分析した (図 3-9.C)。更にそのバンドを定量し、反応後の蛍光強度の上昇量と FITC- α -casein の分解量をプロットしたところ、両者が比例関係にあることが分かった (図 3-9.D)。この検量線の式を用いて、FITC- α -casein の分解反応における蛍光強度の変化の初速度から、各変異体の糸通し速度を算出した (図 3-9.E)。その結果、*TBAP2* は 1 分間で 7-10 個の FITC- α -casein を糸通しすることが分かった。また、*TBAP2* Δ N の糸通し速度は TCEP の有無に関わらず *TBAP2* の約 10% 以下であった。TCEP 存在下での *TBAP2*-NXin、*TBAP2*-NXout、*TBAP2*-R23C の糸通し速度はそれぞれ *TBAP2* の約 50-60% 程度だったが、TCEP 非存在下では有意に減少した。

3-3-3. N 末端ドメイン変異体の凝集体の再生活性

N 末端ドメインの凝集体の再生活性を調べるにあたり、まずは当研究室の水野が α -glucosidase を基質として用いて調べた結果を紹介する [49]。これは、ATP 存在下、TCEP 存在下または非存在下で、熱で凝集させた α -glucosidase に、*TDnaK* システムと *TClpB* の N 末端ドメイン変異体を加えてインキュベートし、酵素活性の回復を見たものである (図 3-10.A)。TCEP 存在下では、*TClpB* は α -glucosidase の活性を熱処理前の約 51% まで回復させた。また、*TClpB* Δ N は α -glucosidase の活性を約 26% まで回復させ、*TClpB* よりも凝集体の再生活性が低かった。一方、*TClpB*-NXin、*TClpB*-NXout、*TClpB*-R23C は約 44~51% まで回復させ、*TClpB* と同程度の再生活性を持っていた。しかし、TCEP 非存在下では、*TClpB*-NXin、*TClpB*-NXout は α -glucosidase の活性を約 17%、*TClpB*-R23C は約 14% までしか回復させず、TCEP 存在下よりも凝集体の再生活性が大きく減少した。これらの再生活性は α -glucosidase の活性を約 40% まで回復させた *TClpB* よりも低く、約 18% まで回復させた *TClpB* Δ N と同程度であった。この結果を受けて、G6PDH や IPMDH を基質として用いて同様の実験を行なった。G6PDH を基質として用いた場合、TCEP 存在下では、*TClpB*、*TClpB*-NXin、*TClpB*-NXout、*TClpB*-R23C は G6PDH の活性を熱処理前の約 51~61% まで回復させたが、*TClpB* Δ N は約 31% までしか回復させることができなかった (図 3-10.B)。TCEP 非存在下では、*TClpB* は G6PDH の活性を約 25% まで回復させ、TCEP 存在下よりも凝集体の再生活性が低かった。しかし、*TClpB*-NXin は G6PDH の活性を約 16%、*TClpB*-NXout、*TClpB*-R23C は約 17% まで回復させ、凝集体の再生活性は

TClpB よりも低く、約 18%まで回復させた *TClpB* ΔN と同程度であった。IPMDH を基質として用いた場合、TCEP 存在下では、*TClpB* は IPMDH の活性を約 57%、*TClpB* ΔN は約 42%まで回復させた。また、*TClpB*-NXin、*TClpB*-NXout、*TClpB*-R23C は IPMDH の活性を約 51%回復させた。TCEP 非存在下では、*TClpB* は IPMDH の活性を約 51%、*TClpB* ΔN は約 40%まで回復させた。*TClpB*-NXin、*TClpB*-NXout は IPMDH の活性を約 45%、*TClpB*-R23C 約 43%まで回復させた。

3-4. 基質糸通し活性における速度論パラメータの測定（副論文Ⅲ）

3-4-1. *TBAP2* の ATP 加水分解活性における速度論パラメータの測定

ClpB の 6 量体の安定化には AAA-1 への ATP の結合が重要である。AAA-1、AAA-2 の保存配列変異体は導入する変異の種類によって *ClpB* の 6 量体の安定性が大きく変化する。生体内の条件とは異なるが、低塩濃度条件下では、*ClpB* の 6 量体はヌクレオチド非結合状態でも安定化することが知られている。この条件で実験することによって、6 量体の安定性に影響されることなく AAA-1、AAA-2 の保存配列変異体の糸通し活性を評価できると期待される。また、*ClpB* による基質の糸通し活性は、ATP の結合・加水分解のエネルギーを使っていると考えられている。糸通し活性を最大限に引き出すためには、溶液中のほとんどの *ClpB* が ATP 結合・加水分解できる程度の十分な ATP 濃度条件で実験を行うことが重要だと予想される。そこで、まずは低塩濃度条件下での *TBAP2* の ATP 加水分解における k_{cat} と K_m を調べた。Buffer LS 中に *TBAP2* と様々な濃度の ATP を加えて混合し、55°C で ATP の加水分解速度を測定した。各 ATP 濃度での ATP 加水分解速度をプロットし、ヒルの式(式 5) でフィッティングした(図 3-11)。 k_{cat} は 37.4 min^{-1} で、 K_m は 0.29 mM 、 n は 1.82 であった。この結果より、反応溶液中の ATP の濃度は従来の 3 mM でも十分であると考えられる。しかし、ATP の結合・加水分解に関わる保存配列に変異を導入した変異体では、ATP 加水分解における K_m が多少変化する可能性がある。そこで、ATP の濃度を 5 mM に変更して糸通し活性を調べることにした。

3-4-2. FITC- α -casein の糸通し反応を利用した *TBAP2* と *TClpP* の結合親和性の測定

糸通し活性を正確に測るためには、溶液中の *TBAP2* のほとんどが *TClpP* と結合していることが重要である。そこで、低塩濃度条件下での *TBAP2* と *TClpP* の親和性を調べた。Buffer LS 中に *TBAP2*、様々な濃度の *TClpP*、FITC- α -casein、ATP を含む溶液を 55°C でインキュベートし、蛍光強度の時間変化を測定した。各 *TClpP* 濃度での分解反応の初速度をプロットし、式 3 でフィッティングして *TBAP2* と *TClpP* の K_d を求めた(図 3-12)。 K_d は $0.038 \text{ }\mu\text{M}$ であった。この結果より、反応溶液中の *TClpP* の濃度は従来の $0.5 \text{ }\mu\text{M}$ でも十分であると考えられる。しかし、*TClpP* の K_d も *TBAP2* に導入した変異によって多少変化する可能性があるため、以降の実験では $2 \text{ }\mu\text{M}$ に変更して糸通し活性を調べることにした。

3-4-3. TBAP2 による FITC- α -casein の糸通しの速度論パラメータの測定

Buffer LS 中に 0.05 μM TBAP2、2 μM TClpP、4 μM FITC- α -casein、5 mM ATP を含む溶液を 55°C でインキュベートし、蛍光強度の時間変化を測定した (図 3-13.A)。低塩濃度条件下で TBAP2 の 6 量体が安定化した場合でも、ATP 非存在下や TClpP 非存在下では FITC- α -casein の分解による蛍光強度の上昇がほとんど見られず、TBAP2、TClpP、FITC- α -casein、ATP の全てが存在する場合のみで蛍光強度の大幅な上昇が見られた。次に、TBAP2、TClpP、ATP、様々な濃度の FITC- α -casein を含む溶液を 55°C でインキュベートし、蛍光強度の時間変化を測定した (図 3-13.B)。各 FITC- α -casein 濃度での分解反応の初速度をプロットし、ミカエリス・メンテン式 (式 4) でフィッティングして k_{cat} と K_{m} を求めた (図 3-13.C, 表 3-1)。TBAP2 による FITC- α -casein の糸通しの k_{cat} は 23.9 min^{-1} 、 K_{m} は 0.99 μM であった。 k_{cat} と K_{m} を求めることで、基質結合能と基質結合後の糸通しの能力をわけて評価できると考えられる。

3-5. AAA-1、AAA-2 の保存配列変異体の作製及び活性測定（副論文Ⅲ）

3-5-1. 中央孔残基変異体による FITC- α -casein の糸通しの速度論パラメータの測定

EClpB の AAA-1, AAA-2 の中央孔の芳香族アミノ酸 Y253、Y653 は基質と直接結合することが知られている [13, 32]。 *TClpB* の中央孔の芳香族アミノ酸 Y243、Y643 (1Y、2Y) を側鎖の小さい Ala に置換し、 *TBAP2* と組み合わせて、先程と同様の方法で FITC- α -casein の糸通しの k_{cat} と K_m を求めた (図 3-14.A, 表 3-1)。 *TBAP2-1Y/A*、 *TBAP2-2Y/A*、 *TBAP2-1,2Y/A* による糸通しの k_{cat} はそれぞれ 27.2 min^{-1} 、 28.4 min^{-1} 、 28.6 min^{-1} であり、 *TBAP2* よりもわずかに高くなった。 *TBAP2-1Y/A*、 *TBAP2-2Y/A*、 *TBAP2-1,2Y/A* による糸通しの K_m はそれぞれ $3.59 \mu\text{M}$ 、 $5.90 \mu\text{M}$ 、 $18.1 \mu\text{M}$ であり、 *TBAP2* の約 3.6 倍、約 6 倍、約 18.3 倍と非常に高くなった。

3-5-2. Walker A 変異体による FITC- α -casein の糸通しの速度論パラメータの測定

AAA-1 の Walker A を変異させた K204A/T205A (1KT/AA) や、 AAA-2 を変異させた K601A/T602A (2KT/AA) は、それぞれのドメインでのヌクレオチド結合能を失うことが知られている [18]。 *TBAP2* にこの Walker A 変異を組み合わせて、同様の方法で FITC- α -casein の糸通しの k_{cat} と K_m を求めた (図 3-14.B, 表 3-1)。 *TBAP2-1KT/AA*、 *TBAP2-2KT/AA* による糸通しの k_{cat} はそれぞれ 22.7 min^{-1} 、 33.4 min^{-1} であり、 *TBAP2* と同等かわずかに高くなった。一方で、 K_m はそれぞれ $4.68 \mu\text{M}$ 、 $2.92 \mu\text{M}$ であり、 *TBAP2* の約 4.7 倍、約 2.9 倍高かった。ところが、両方の Walker A を変異させた *TBAP2-1,2KT/AA* は FITC- α -casein をほとんど分解しなかった。

3-5-3. Walker B 変異体による FITC- α -casein の糸通しの速度論パラメータの測定

AAA-1 の Walker B を変異させた E271Q (1E/Q) や、 AAA-2 を変異させた E668Q (2E/Q) は、それぞれのドメインでの ATP 加水分解能を失うことが知られている [18]。 *TBAP2* にこの Walker B 変異を組み合わせて、同様の方法で FITC- α -casein の糸通しの k_{cat} と K_m を求めた (図 3-14.C, 表 3-1)。 *TBAP2-1E/Q*、 *TBAP2-2E/Q*、 *TBAP2-1,2E/Q* による糸通しの k_{cat} はそれぞれ 4.53 min^{-1} 、 2.63 min^{-1} 、 3.30 min^{-1} であり、 *TBAP2* よりも極端に低くなった。一方で、 *TBAP2-1E/Q*、 *TBAP2-2E/Q*、 *TBAP2-1,2E/Q* による糸通しの K_m はそれぞれ $0.79 \mu\text{M}$ 、 $0.83 \mu\text{M}$ 、 $1.33 \mu\text{M}$ であり、 *TBAP2* と同等か、わずかに高い程度であった。

3-5-4. 保存 Arg 残基変異体による FITC- α -casein の糸通しの速度論パラメータの測定

ClpB の AAA-1、AAA-2 のサブユニット界面には、高度に保存された Arg 残基がある。これらの保存 Arg 残基 (AAA-1 の R322、AAA-2 の R747) をそれぞれ Ala に置換 (1R/A、2R/A) すると、それぞれのドメインでの ATP 加水分解が阻害される [35]。また、この保存 Arg 残基はサブユニット間の情報伝達にも関わっていると考えられている。TBAP2 にこの保存 Arg 変異を組み合わせて、同様の方法で FITC- α -casein の糸通しの k_{cat} と K_m を求めた (図 3-14.D, 表 3-1)。TBAP2-1R/A、TBAP2-2R/A、TBAP2-1,2R/A による糸通しの k_{cat} はそれぞれ 11.4 min^{-1} 、 13.8 min^{-1} 、 11.0 min^{-1} であり、TBAP2 の半分程度であった。一方で、TBAP2-1R/A、TBAP2-2R/A、TBAP2-1,2R/A による糸通しの K_m はそれぞれ $1.29 \mu\text{M}$ 、 $2.02 \mu\text{M}$ 、 $1.75 \mu\text{M}$ であり、TBAP2 よりもわずかに高い程度であった。

3-5-5. AAA-1、AAA-2 の保存配列変異体による FITC- α -casein の糸通し速度と ATP 加水分解活性の比較

低塩濃度条件下、 $4 \mu\text{M}$ α -casein 存在下での TBAP2 の AAA-1、AAA-2 の保存配列変異体の ATP 加水分解活性を測定し、FITC- α -casein の糸通し速度との関連を調べた (図 3-15.A, 表 3-2)。いずれの変異体の ATP 加水分解活性も野生型 TBAP2 の約 60% 以下まで減少した。その中でも、TBAP2-1KT/AA、-2KT/AA、-1,2KT/AA、-1,2E/Q、-2R/A、-1,2R/A の ATP 加水分解活性が TBAP2 の約 10% 以下まで減少した。また、TBAP2-1KT/AA、-2KT/AA、-2R/A、-1,2R/A では ATP 加水分解活性が極端に低いにも関わらず、糸通しの速度は十分に速かった。全ての AAA-1、AAA-2 の保存配列変異体を通して、ATP 加水分解活性と糸通し速度の間には明らかな相関は見られなかった。

3-5-6. AAA-1、AAA-2 の保存配列変異体による FITC- α -casein の糸通し速度と凝集体の再生活性の比較

低塩濃度条件下で TBAP2 の AAA-1、AAA-2 の保存配列変異体による熱凝集 G6PDH の再生活性を測定し、FITC- α -casein の糸通し速度との関連を調べた (図 3-15.B, 表 3-2)。TClpB と TBAP2 は熱凝集 G6PDH の活性を熱処理前の約 57% まで回復させた。一方で、TBAP2-1Y/A、-2Y/A、-2E/Q、-2R/A は約 19-21% 程度まで熱凝集 G6PDH の活性を回復させた。その他全ての AAA-1、AAA-2 の保存配列変異体は熱凝集 G6PDH をほとんど回復させることができなかった。全ての AAA-1、AAA-2 の保存配列変異体

を通して、高い糸通し活性を持つ変異体が必ずしも高い凝集体の再生活性を持つわけではなかった。

表 3-1. TBAP2 変異体の FITC- α -casein の糸通しにおける速度論パラメータ

TBAP2-	k_{cat} (min^{-1})	K_m (μM)
wild-type	23.9	0.99
1Y/A	27.2	3.59
2Y/A	28.4	5.90
1,2Y/A	28.6	18.1
1KT/AA	22.7	4.68
2KT/AA	33.4	2.92
1,2KT/AA	1.59	6.38
1E/Q	4.53	0.78
2E/Q	2.63	0.81
1,2E/Q	3.30	1.33
1R/A	11.4	1.29
2R/A	13.8	2.02
1,2R/A	11.0	1.75

TBAP2 の AAA-1、AAA-2 の保存配列変異体の FITC- α -casein の糸通しにおける k_{cat} と K_m 値は、図 3-14 のデータをミカエリス・メンテン式 (式 4) でフィッティングして求めた。

表 3-2. TBAP2 変異体の糸通し速度、ATP 加水分解活性、及び凝集体の再生活性

TBAP2-	糸通し速度 (min ⁻¹)	ATP 加水分解活性 (min ⁻¹)	凝集体の再生活性 (%)
wild-type	18.5 ± 0.6	560 ± 5	57.3 ± 7.8
1Y/A	13.2 ± 1.9	310 ± 3	21.1 ± 4.4
2Y/A	11.4 ± 1.3	182 ± 2	18.9 ± 2.8
1,2Y/A	5.10 ± 0.22	62.8 ± 3.0	3.31 ± 1.02
1KT/AA	10.1 ± 0.6	11.6 ± 0.9	3.61 ± 0.58
2KT/AA	18.6 ± 0.8	50.4 ± 0.9	3.76 ± 0.66
1,2KT/AA	0.53 ± 0.16	ND	3.49 ± 0.41
1E/Q	3.78 ± 0.30	292 ± 31	7.52 ± 2.18
2E/Q	2.18 ± 0.35	90.6 ± 8.9	18.5 ± 0.8
1,2E/Q	2.47 ± 0.12	ND	3.80 ± 0.53
1R/A	8.55 ± 1.05	198 ± 3	5.79 ± 0.33
2R/A	8.90 ± 1.06	29.3 ± 0.6	20.1 ± 3.9
1,2R/A	7.36 ± 0.48	ND	3.45 ± 1.21

全ての測定は 55°C で Buffer LS 中に 5mM ATP を含む溶液で行なった。糸通し速度は図 3-14 で 4 μM FITC-α-casein 存在下での結果を示している。ATP 加水分解活性は 4 μM α-casein 存在下で測定した。凝集体の再生活性は、基質として G6PDH を用いて測定した。0.2 μM G6PDH を 72°C、8 分間で変性・凝集させ、その後、温度を 55°C に下げ、最終濃度が 0.6 μM TDnaK、0.2 μM TDnaJ、0.1 μM TGrpE、0.05 μM TBAP2 の AAA-1、AAA-2 の保存配列変異体になるように加えた。更に 55 °C 90 分間インキュベートし、G6PDH の酵素活性を測定した。独立した実験を 3 回行い、標準偏差をエラーバーで表示した。ND は not detectable である。

<i>TClpA</i>	VILIMTSNTG--Y NVGP-IGFTSKEVDTESPLKAL ---FTPEFLDRLD
<i>TClpB</i>	TVIILTSNLG SPLILEGLQKGWPY-ERIRDEVFKVLQQHFRPEFLNRLD
<i>TBAP1</i>	TVIILTSNLG--Y NVGP-IGFTSKEVDTESPLKAL ---FRPEFLNRLD
<i>TBAP2</i>	TVIILTSNLG SPYNVGP-IGFTSKEVDTESPLKALQQHFRPEFLNRLD
<i>TBAP3</i>	TVIILTSNLG SPLILEGLIGFTS-ERIRDEVFKVLQQHFRPEFLNRLD
<i>TBAP4</i>	TVIILTSNLG SPLILEGLIGFTSKERIRDEVFKVLQQHFRPEFLNRLD

図 3-1. *TBAP* 変異体シリーズの HLH 付近のアミノ酸配列

TClpA の HLH 付近のアミノ酸配列を赤色で、*TClpB* のアミノ酸配列を黒色で表示し、HLH 相当領域を網かけで、ClpP loop に保存されている IGF 部分を太字で表示した。*TBAP1*、*TBAP2*、*TBAP3*、*TBAP4* は *TClpB* の HLH 相当領域に *TClpA* の HLH の配列を置換して作製した。*TBAP1* は HLH を全て置換し、*TBAP2* は置換する配列の長さをそろえるために SP、QQH の配列を残した。*TBAP3*、*TBAP4* は IGF 部分付近だけを置換した。

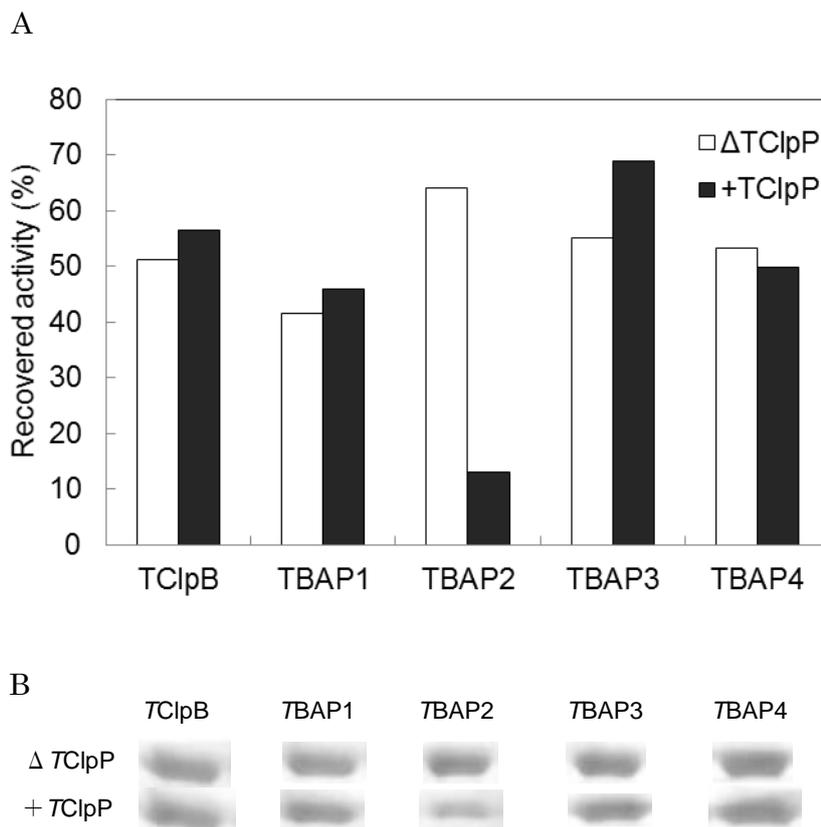


図 3-2. *TBAP* による凝集体の再生活性および *TBAP* と *TClpP* による凝集体分解活性
 A) 89°Cで 30 分間熱処理して変性・凝集させた IPMDH に、*T*DnaK システムと *TBAP*1~4 変異体を加えて 55°Cで 90 分間インキュベートし、酵素活性の回復を見た(白の棒グラフ)。更に、再生時に *TClpP* を加えて同様の実験を行い、活性回復の阻害を見た(黒の棒グラフ)。加えたタンパク質の濃度は、*T*DnaK 0.6 μM、*T*DnaJ 0.2 μM、*T*GrpE 0.1 μM、*TClpP* 0.5 μM、*TClpB* と *TBAP*1 と *TBAP*2 と *TBAP*3 と *TBAP*4 が 0.05 μM である。B) A の反応後の溶液を TCA 処理し、得られた沈殿を SDS-PAGE にかき、IPMDH の量を分析した。

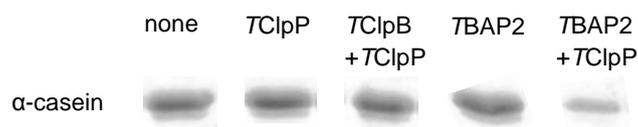


図 3-3. *TBAP2* と *TClpP* による α -casein の分解

α -casein、ATP、示されたタンパク質を含む溶液を 55°C で 90 分間インキュベートした。その後 TCA 処理し、得られた沈殿を SDS-PAGE にかき、 α -casein の量を分析した。加えたタンパク質の濃度は *TClpB* と *TBAP2* が 0.05 μ M、*TClpP* が 0.5 μ M、 α -casein が 1.2 μ M である。

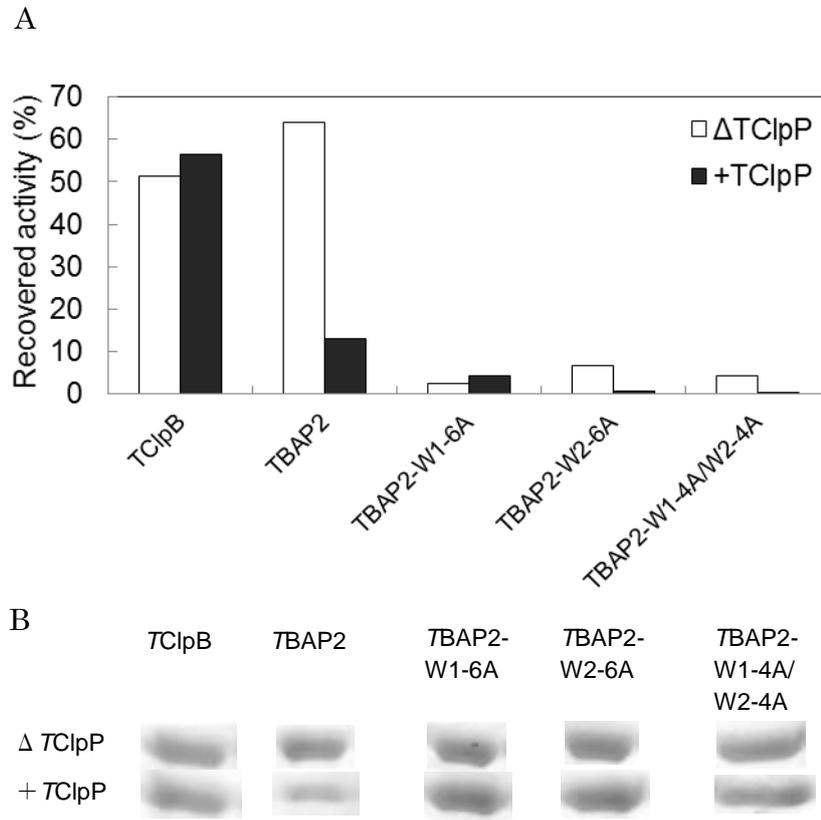


図 3-4. ミドルドメイン変異体による凝集体の再生活性および *TClpP* との凝集体分解活性
 A) 89°Cで30分間熱処理して変性・凝集させた IPMDH に、*TDnaK* システムと *TBAP2* のミドルドメイン変異体を加えて 55°Cで 90 分間インキュベートし、酵素活性の回復を見た (白の棒グラフ)。更に、再生時に *TClpP* を加えて同様の実験を行い、活性回復の阻害を見た (黒の棒グラフ)。加えたタンパク質の濃度は、*TDnaK* 0.6 μM、*TDnaJ* 0.2 μM、*TGrpE* 0.1 μM、*TClpB* と *TBAP2* と *TBAP2-W1-6A* と *TBAP2-W2-6A* と *TBAP2-W1-4A/W2-4A* が 0.05 μM、*TClpP* が 0.5 μM である。B) A の反応後の溶液を TCA 処理し、得られた沈殿を SDS-PAGE にかき、IPMDH の量を分析した。

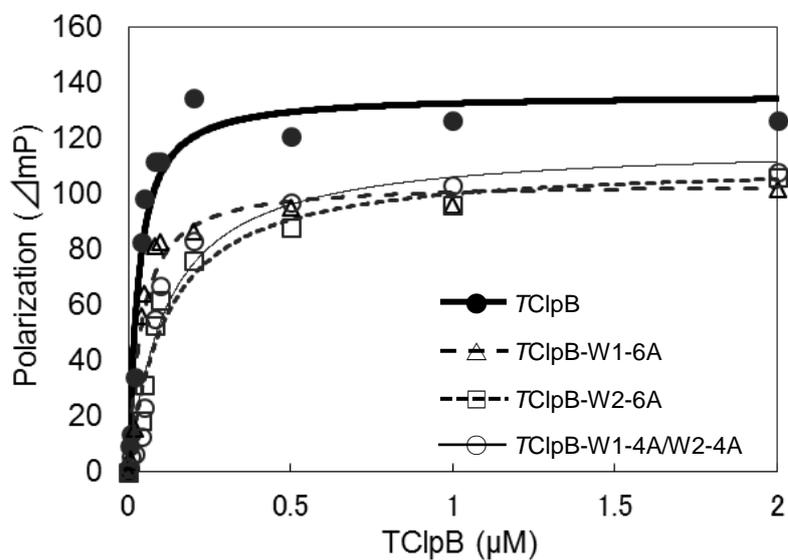


図 3-5. ミドルドメイン変異体の casein 結合親和性

0~2 μM の様々な濃度の TC1pB のミドルドメイン変異体、0.014 μM FITC- κ -casein、3 mM ATP γ S を含む溶液を 55°C で 10 分間インキュベートした。その後、励起波長 490 nm、蛍光波長 535 nm で偏光度を測定し、TC1pB 濃度に対してプロットして式 2 でフィッティングした。得られた K_a の値をもとに、理論曲線を表示した。

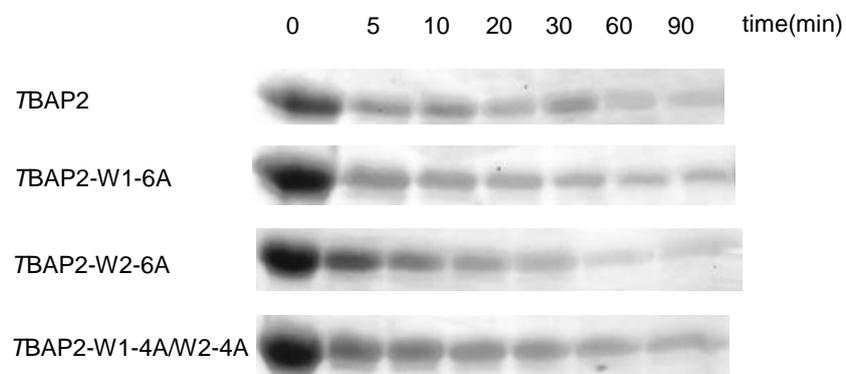


図 3-6. ミドルドメイン変異体による α -casein の分解

0.05 μ M TBAP2 のミドルドメイン変異体、0.5 μ M TClpP、1.8 μ M α -casein、3 mM ATP を含む溶液を、55°C で示した時間インキュベートした。反応時間ごとに反応溶液を TCA 処理し、得られた沈殿を SDS-PAGE にかき、 α -casein の量を分析した。

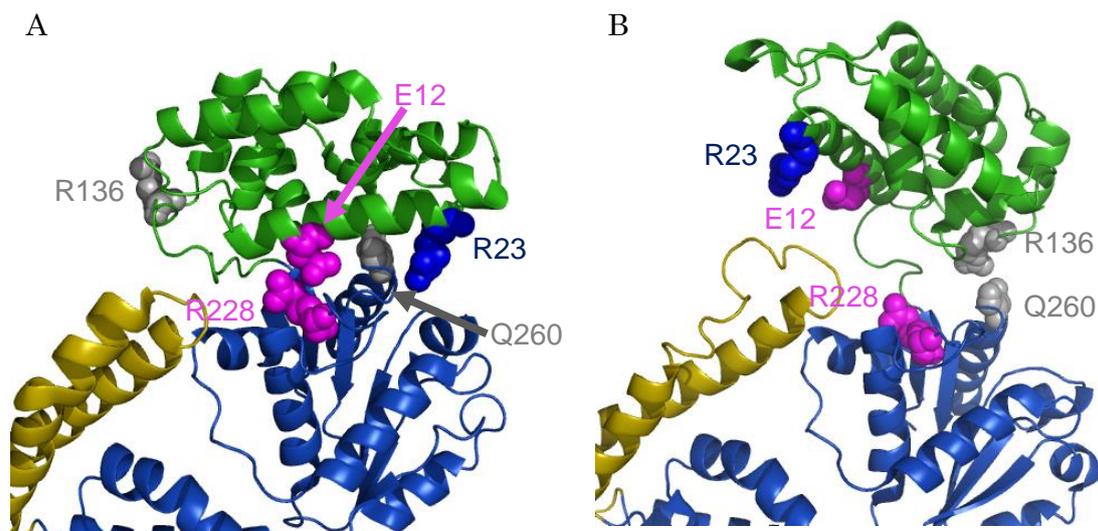


図 3-7. *TClpB* の N 末端ドメインの変異導入部位

TClpB の E12 と R228 を赤紫色で、R23 を青色で、R136 と Q260 を灰色で表示した。A) N 末端ドメインのヘリックス A5 が 6 量体リングの内側に向いた状態の *TClpB* の立体構造。N 末端ドメインの E12 と AAA-1 の R228 が近接した構造をとっている。*TClpB*-E12C/R228C 変異体はジスルフィド結合を形成させることにより、N 末端ドメインのヘリックス A5 を内向きに固定することができると期待される (NXin)。B) N 末端ドメインのヘリックス A5 が 6 量体リングの外側に向いた状態の *TClpB* の立体構造。N 末端ドメインの R136 と AAA-1 の Q260 が近接した構造をとっている。*TClpB*-R136C/Q260C 変異体はジスルフィド結合を形成させることにより、N 末端ドメインのヘリックス A5 を外向きに固定することができると期待される (NXout)。

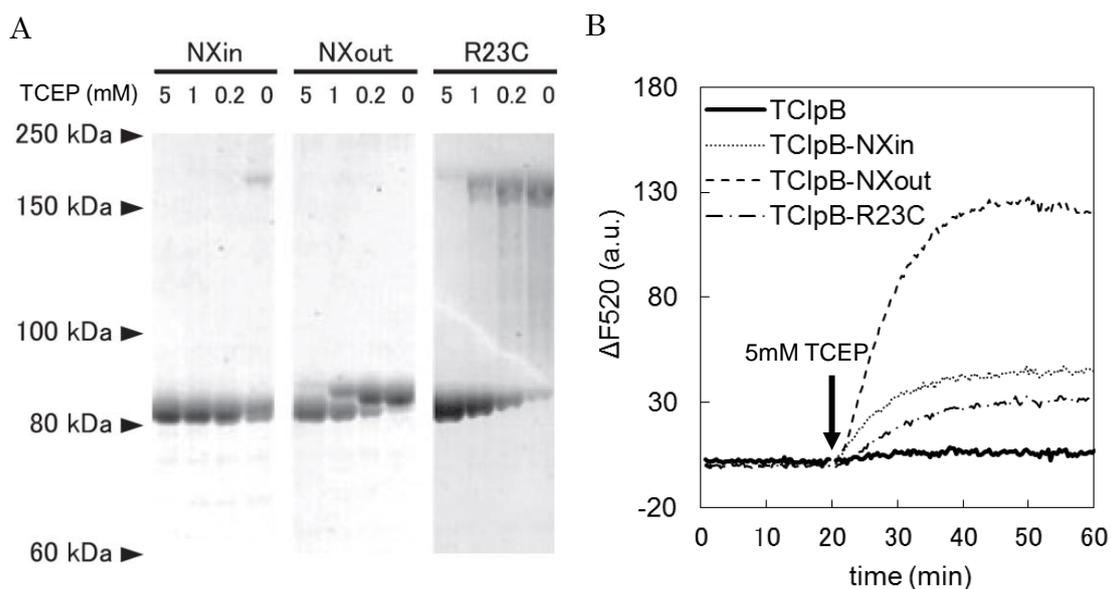


図 3-8. N 末端ドメイン変異体のジスルフィド結合形成の確認

A) 酸化後の *TClpB*-NXin、-NXout、-R23C を 0~5 mM の様々な濃度の還元剤 TCEP 存在下で、室温で 30 分間インキュベートし、非還元条件下で SDS-PAGE (8% A.A.) にかけた。ジスルフィド結合形成によって SDS-PAGE のバンドの移動度が変化した *TClpB*-NXout、-R23C は移動前後のバンドをモレキュラー・イメージャーで定量し、ジスルフィド結合の形成率を算出した。B) 0.05 μ M *TClpB* またはその N 末端ドメイン変異体、60 μ M ABD-F を含む溶液を 55°C でインキュベートし、蛍光強度の時間変化を測定した。横軸は反応時間で、縦軸は蛍光強度の変化を示す。20 分間反応させた後、最終濃度が 5 mM になるように TCEP を加え、更に測定を続けた。励起波長、蛍光波長はそれぞれ 390 nm、520 nm である。*TBAP2* の N 末端ドメイン変異体に関しても同様の方法でジスルフィド結合形成の確認を行なった。

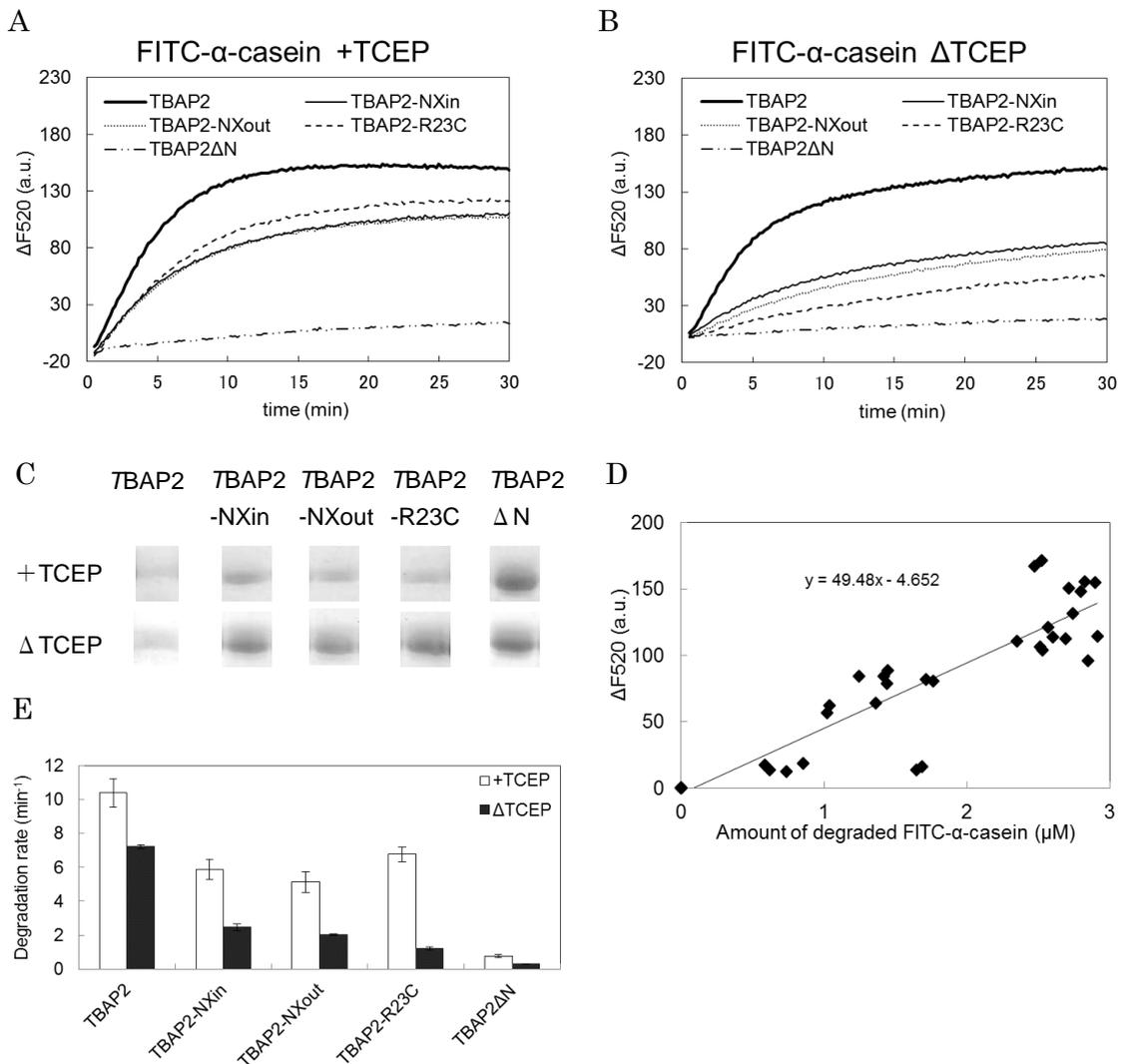


図 3-9. N 末端ドメイン変異体による FITC- α -casein の糸通し速度の算出

A) 5 mM TCEP 存在下で、0.05 μM TBAP2 の N 末端ドメイン変異体、0.5 μM TClpP、3 μM FITC- α -casein、3 mM ATP を含む溶液を 55 $^{\circ}\text{C}$ でインキュベートし、FITC- α -casein の分解による蛍光強度の上昇を見た。横軸は反応時間で、縦軸は蛍光強度の変化を示す。B) TCEP 非存在下で、A と同様の方法で FITC- α -casein の分解を見た。C) A と B の反応後の FITC- α -casein の量を SDS-PAGE で分析した。D) C の FITC- α -casein のバンドをモレキュラー・イメージャーで定量し、算出された分解量に対し、蛍光強度の上昇量をプロットした。反応前の分解量と蛍光強度を 0 として、線形近似曲線をひいた。E) D で得られた検量線の式を用いて、A と B の FITC- α -casein の分解反応開始後の蛍光強度変化の初速度から、TBAP2 の N 末端ドメイン変異体一分子あたりの FITC- α -casein の分解速度 (min^{-1}) を求めた。独立した実験を 3 回行ない、標準偏差をエラーバーで表示した。

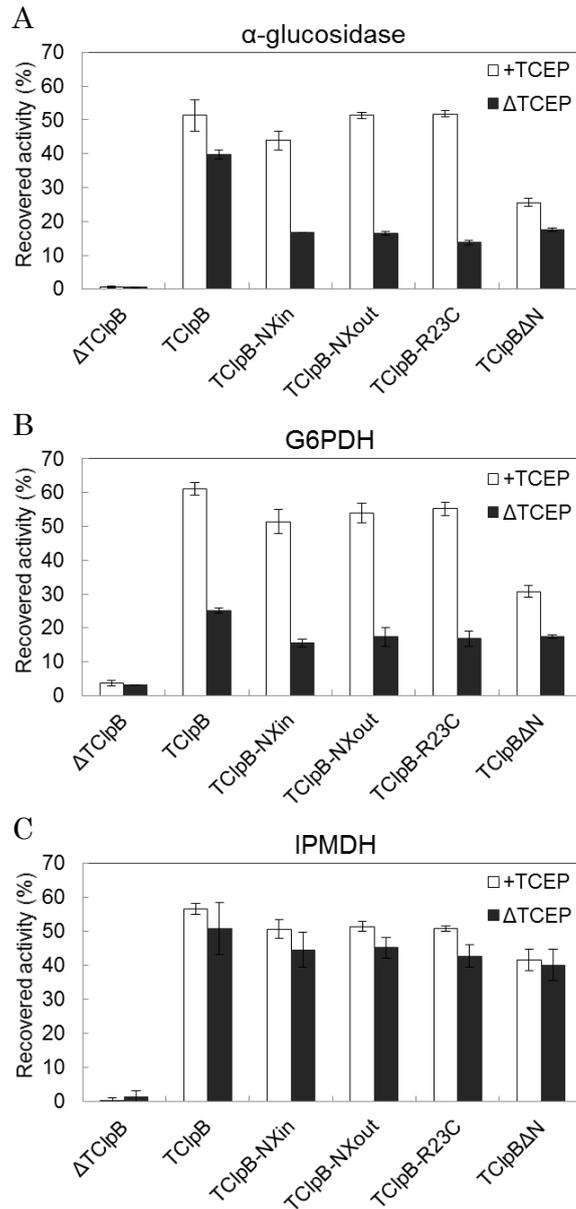


図 3-10. N 末端ドメイン変異体による凝集体の再生活性

A) 73°Cで10分間熱処理して変性させた α -glucosidase に *T*DnaK システムと N 末端ドメイン変異体を加え、55°Cで90分間インキュベートした後、酵素活性を測定した。縦軸は α -glucosidase の回復率を示す。B) 72°Cで8分間熱処理して変性させた G6PDH に *T*DnaK システムと N 末端ドメイン変異体を加え、55°Cで90分間インキュベートした後、酵素活性を測定した。縦軸は G6PDH の回復率を示す。C) 89°Cで30分間熱処理して変性・凝集させた IPMDH に *T*DnaK システムと *T*ClpB の N 末端ドメイン変異体を加え、55°Cで90分間インキュベートした後、酵素活性を測定した。縦軸は IPMDH の回復率を示す。独立した実験を3回行い、標準偏差をエラーバーで表示した。

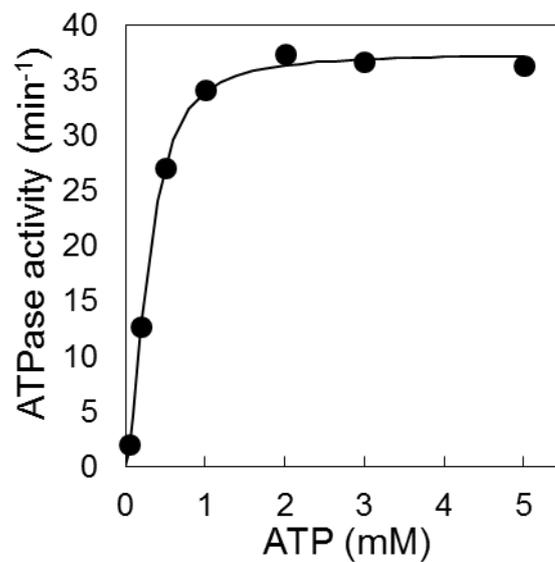


図 3-11. *TBAP2* の ATP 加水分解における速度論パラメータ

TBAP2、ATP 再生系、0.05~5 mM の様々な濃度の ATP 存在下で、55°Cでの *TBAP2* の ATP 加水分解活性を測定した。各 ATP 濃度での ATP 加水分解速度をプロットし、ヒルの式 (式 5) でフィッティングした。得られた k_{cat} 、 K_m 、 n の値をもとに、理論曲線を表示した。横軸は ATP 濃度で、縦軸は *TBAP2* の 1 サブユニットあたりの ATP 加水分解速度 (min^{-1})。

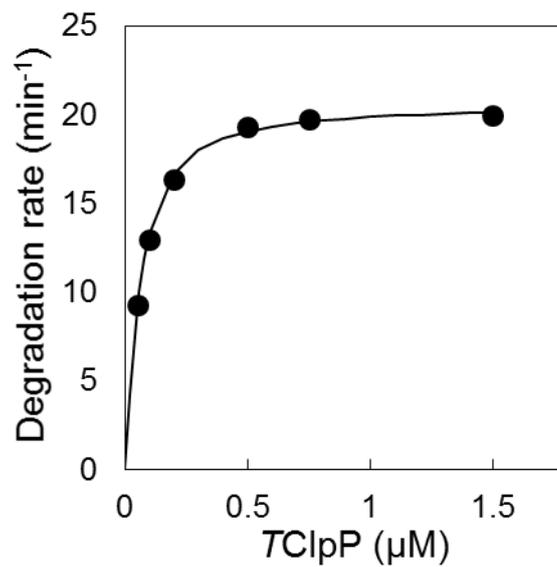


図 3-12. FITC- α -casein の糸通しにおける TC1pP の濃度依存性

0.05 μM TBAP2、0.05~1.5 μM の様々な濃度の TC1pP、3 μM FITC- α -casein、5mM ATP を含む溶液を 55°C でインキュベートし、蛍光強度の変化を測定した。各 TC1pP 濃度での FITC- α -casein の分解の初速度をプロットし、式 3 でフィッティングした。得られた K_d の値をもとに、理論曲線を表示した。横軸は TC1pP 濃度で、縦軸は TBAP2 一分子あたりの FITC- α -casein の分解速度 (min^{-1})。

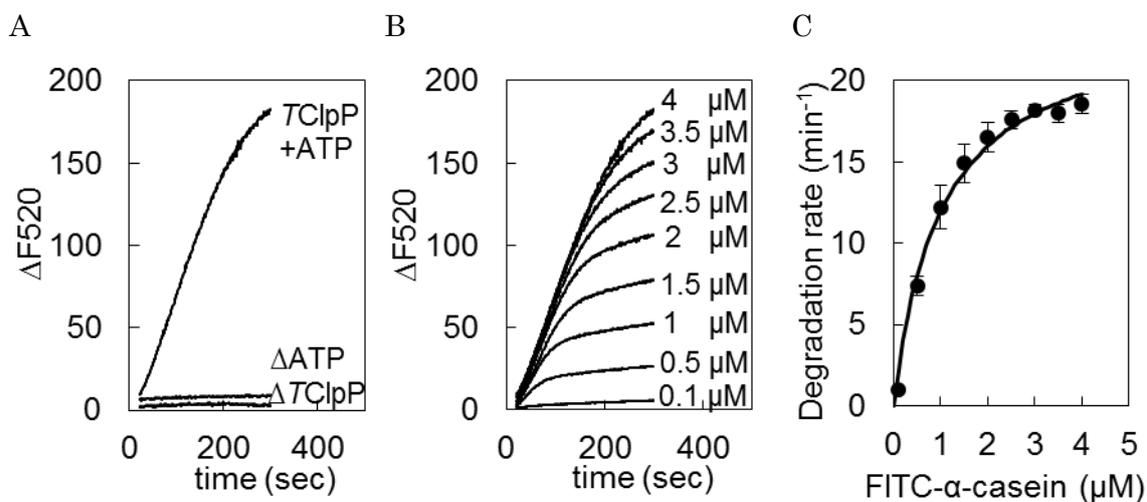


図 3-13. TBAP2 の FITC- α -casein の糸通しにおける速度論パラメータ

A) 0.05 μ M TBAP2、4 μ M FITC- α -casein、必要に応じて 2 μ M TC1pP や 5 mM ATP を含む溶液を 55 $^{\circ}$ C でインキュベートし、蛍光強度の時間変化を測定した。B) 0.05 μ M TBAP2、2 μ M TC1pP、0.1~4 μ M の様々な濃度の FITC- α -casein、5 mM ATP を含む溶液を 55 $^{\circ}$ C でインキュベートし、蛍光強度の時間変化を測定した。C) B の各 FITC- α -casein 濃度での FITC- α -casein の分解の初速度をプロットし、ミカエリス・メンテン式 (式 4) でフィッティングした。得られた k_{cat} 、 K_{m} の値をもとに、理論曲線を表示した。横軸は FITC- α -casein 濃度で、縦軸は TBAP2 一分子あたりの FITC- α -casein の分解速度 (min^{-1})。独立した実験を 3 回行い、標準偏差をエラーバーで表示した。

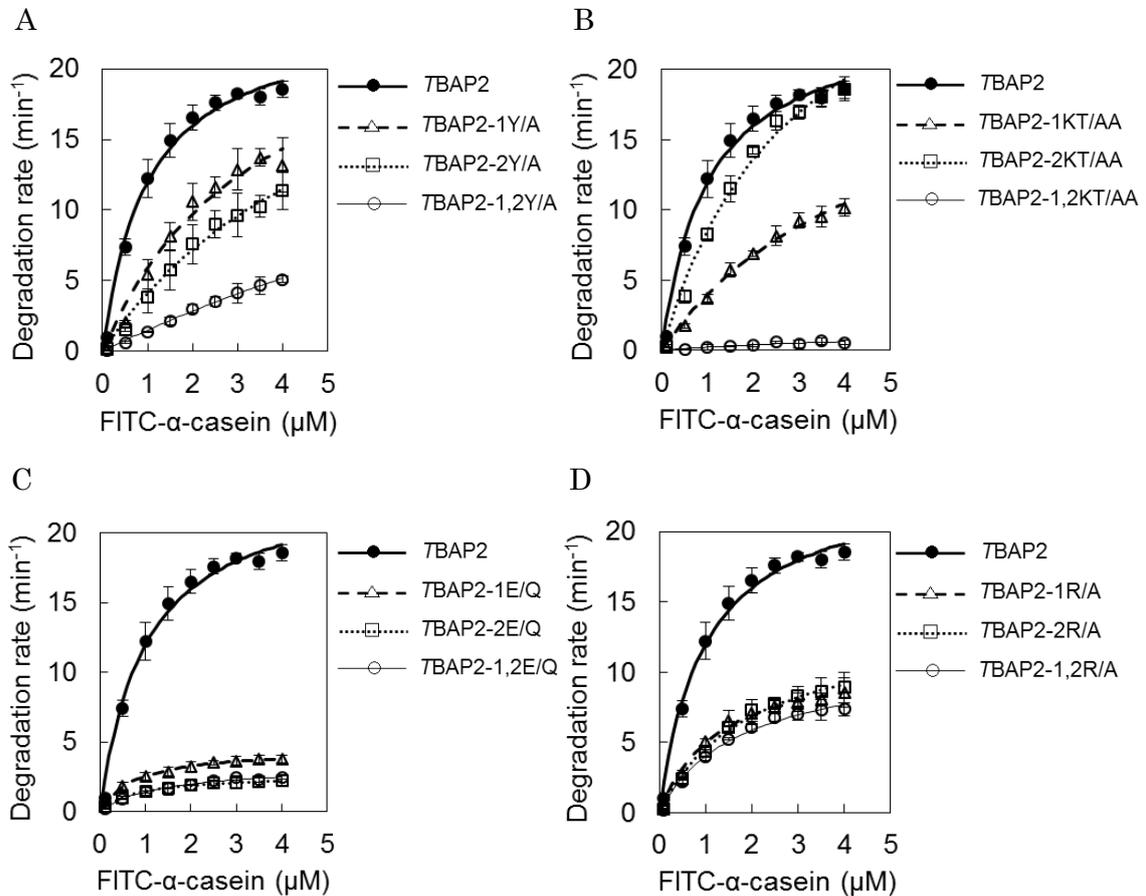


図 3-14. AAA-1、AAA-2 の保存配列変異体の FITC- α -casein における速度論パラメータ

A) $0.05 \mu\text{M}$ TBAP2 の AAA-1、AAA-2 の中央孔残基変異体、 $2 \mu\text{M}$ TClpP、 $0.1\sim 4 \mu\text{M}$ の様々な濃度の FITC- α -casein、 5 mM ATP を含む溶液を 55°C でインキュベートし、蛍光強度の変化を測定した。各 FITC- α -casein 濃度での FITC- α -casein の分解の初速度をプロットし、ミカエリス・メンテン式 (式 4) でフィッティングした。得られた k_{cat} 、 K_{m} の値をもとに、理論曲線を表示した。横軸は FITC- α -casein 濃度で、縦軸は TBAP2 変異体一分子あたりの FITC- α -casein の分解速度 (min^{-1})。B,C,D) A と同様の方法で TBAP2 の Walker A 変異体(B)、Walker B 変異体(C)、保存 Arg 残基変異体(D)の FITC- α -casein の糸通しにおける k_{cat} 、 K_{m} 値を求めた。独立した実験を 3 回行い、標準偏差をエラーバーで表示した。

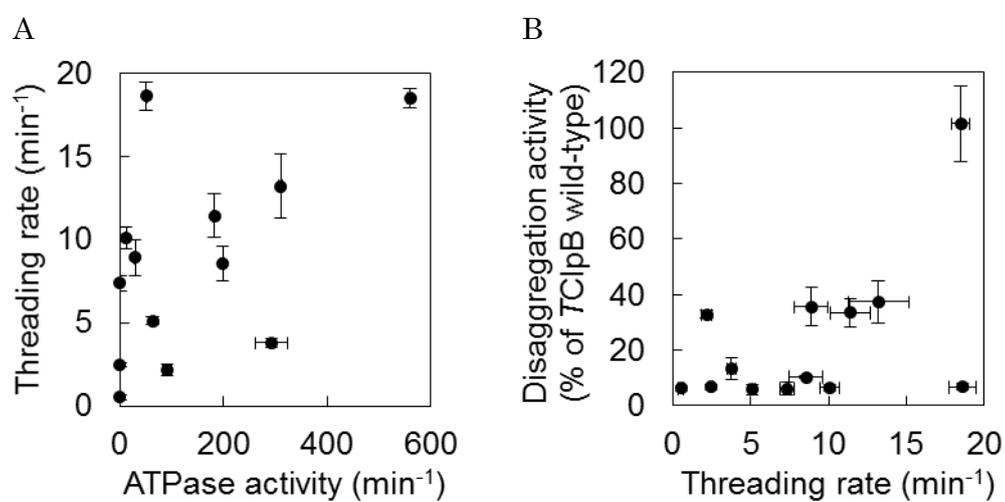


図 3-15. *TBAP2* の AAA-1、AAA-2 の保存配列変異体の ATP 加水分解活性と糸通し速度、及び糸通し速度と凝集体の再生活性の比較

全ての実験は表 3-2 に記載の方法で行なった。A) *TBAP2* の AAA-1、AAA-2 の保存配列変異体の糸通し速度を ATP 加水分解活性に対してプロットした。B) *TBAP2* の AAA-1、AAA-2 の保存配列変異体の凝集体の再生活性を糸通し速度に対してプロットした。凝集体の再生活性は *TClpB* の活性を 100%として表示した。

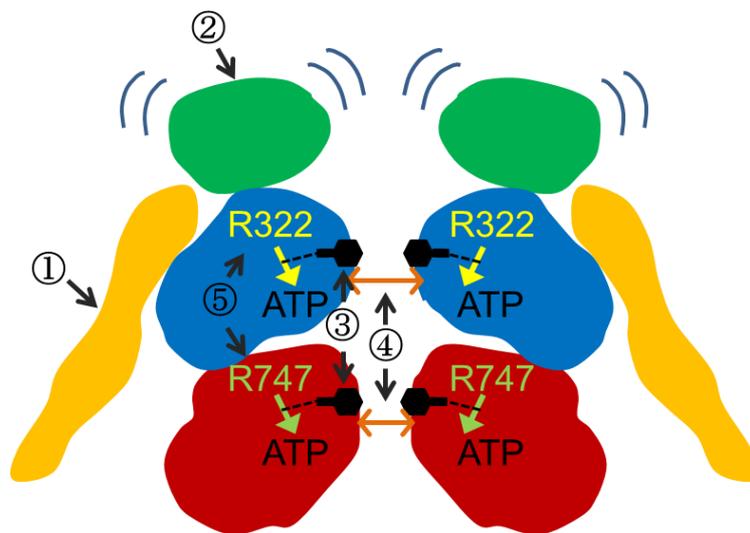


図 3-16. ClpB による変性タンパク質の糸通しモデル

本研究で得られた結果をもとに、ClpB による変性タンパク質の糸通しモデルを提案した。①はミドルドメイン、②は N 末端ドメイン、③は中央孔残基、④は中央孔、⑤は保存 Arg 残基を示している。

4. 考察

本研究では、ClpB の脱凝集過程の主要な過程であり、Clp/Hsp100 ファミリーに共通の過程でもある基質の糸通し活性に着目した。ClpP と結合できる ClpB の変異体 BAP を用いて、DnaK システム非存在下で ClpB の基質糸通し活性を調べることで、脱凝集活性と糸通し活性を分離して検出することを試みた。そこでまず、TClpB に関しても同様の変異体 (TBAP) の作製を検討した。TClpA と TClpB の HLH 相当領域は配列の長さが異なっていたため、ClpP loop を含む長さの異なる配列を導入した 4 つの TBAP 変異体 (TBAP1、TBAP2、TBAP3、TBAP4) を作製した。その中で TBAP2 は凝集体の再生活性を持ち、TBAP2 だけが TClpP とともに凝集体を分解した。また、TBAP2 は TDnaK システムがない場合でも、ATP 存在下で α -casein を分解した。これらの結果より、TBAP2 は大腸菌型の BAP と同等の性質を持っており、TClpB の糸通し活性を調べるよい変異体と言える。

ミドルドメインを不安定化させた変異体である TBAP2-W1-6A、TBAP2-W2-6A、TBAP2-W1-4A/W2-4A は凝集体の再生活性を持たなかった。更に反応後の SDS-PAGE の結果より、これらの変異体は、熱凝集した IPMDH を TDnaK システム存在下でも糸通ししないことを示している。ところが、これらの変異体は、野生型 TClpB と比べても FITC- κ -casein と結合する能力を十分に持っていた。また、 α -casein を糸通しする能力に関しても野生型 TBAP2 と同程度持っていた。これらの結果より、ミドルドメインの安定性は基質結合や基質の糸通しではなく、脱凝集の他の過程に必要であることが示唆された。

Cys 残基を導入した TClpB の N 末端ドメイン変異体は、CuCl₂ 存在下で酸化することによって、約 90% がジスルフィド結合を形成した。TClpB-R23C はシステインを 1 つしか持っていないことと、SDS-PAGE のバンドの分子量から、サブユニット間でジスルフィド結合を形成し、2 量体を形成していると考えられる。また、酸化後の TClpB-NXin、-NXout は酸化・還元型で SDS-PAGE のバンドの移動度があまり変化しないことから、サブユニット内でジスルフィド結合を形成していると考えられる。FITC- α -casein を基質として、これらの TBAP2 変異体の糸通し活性を調べたところ、FITC- α -casein の分解量と蛍光強度の上昇量は比例関係にあった。この検量線の式を用いることで、蛍光強度の上昇量から各変異体の糸通し速度を算出することが可能になった。N 末端ドメインを欠損させた TBAP2 Δ N は、TCEP の有無に関わらず、FITC- α -casein をほとんど糸通しできなかった。一方で、Cys 残基を導入した 3 つの変異体では、ジスルフィド結合で N 末端ドメインの動きが制限されることによって糸通し活性が低下した。これらのことから、N 末端ドメインが casein の糸通しに重要であり、その動きは糸通しを促進していると考えられる。また、TClpB Δ N による熱凝集

α -glucosidase や熱凝集 G6PDH の再生活性は TCEP の有無に関わらず *TClpB* よりも低かった。*Cys* 残基を導入した 3 つの変異体は、TCEP 存在下では *TClpB* と同等の凝集体の再生活性を持っていたが、TCEP 非存在下では *TClpB* Δ N と同等の凝集体の再生活性を持っていた。一方で、*TClpB* と *TClpB* Δ N の熱凝集 IPMDH の再生活性は TCEP の有無でほとんど差がなく、*Cys* 残基を導入した 3 つの変異体の再生活性は *TClpB* と *TClpB* Δ N の中間であった。これらの結果は、*ClpB* の凝集体の再生活性における N 末端ドメインの貢献度が基質タンパク質によって変化することと、N 末端ドメインの動きがこの貢献に重要であることを示唆している。

糸通し活性の測定を様々な FITC- α -casein 濃度条件で行なうことで、*TBAP2* の FITC- α -casein の糸通しにおける k_{cat} と K_m 値を求めた。 k_{cat} と K_m 値を求めることにより、基質結合と基質結合後の糸通しの能力を分けて評価することができると期待される。中央孔変異体である *TBAP2-1Y/A*、*TBAP2-2Y/A*、*TBAP2-1,2Y/A* による糸通しの k_{cat} は *TBAP2* とほぼ同程度であったが、 K_m は高くなった。これは、*ClpB* の AAA-1、AAA-2 のどちらか片方、あるいは両方の中央孔の *Tyr* 残基を変異させても、基質との親和性は減少するが、*ClpB* は十分な速度で変性タンパク質を糸通しできることを示している。このことから、AAA-1、AAA-2 の中央孔の *Tyr* 残基が基質結合に関わっており、*Ala* 残基に置換しても基質結合後の糸通しは可能であるということが示唆された。この結果は AAA-1、AAA-2 の中央孔の *Tyr* 残基が基質と直接結合するという以前の結果と一致する [13, 32]。一方で、*EClpB* の AAA-2 の中央孔残基を変異させると、AAA-1 を変異させた場合よりも著しく糸通し活性が低下したという報告がある [13]。この違いの原因が何かははっきりとはわからないが、*EClpB* の実験が基質過剰量で行なわれていなかったからかもしれない。

Walker A 変異体である *TBAP2-1KT/AA*、*TBAP2-2KT/AA* の糸通しの k_{cat} 、 K_m は *TBAP2* よりも高くなった。中央孔変異体の場合と同様に、*ClpB* の AAA-1、AAA-2 のどちらか片方の Walker A を変異させても、基質との親和性は減少するが十分な速度で変性タンパク質を糸通しすると考えられる。一方で、*TBAP2-1,2KT/AA* や ATP 非存在下での *TBAP2* は糸通し活性を持たなかった。これらの結果より、AAA-1、AAA-2 への ATP の結合が基質結合に関わっており、いずれかのドメインへの ATP の結合が糸通しに必要であるということが示唆された。

Walker B 変異体である *TBAP2-1E/Q*、*TBAP2-2E/Q*、*TBAP2-1,2E/Q* の糸通しの k_{cat} は *TBAP2* よりも極端に低く、 K_m はほとんど変わらなかった。これは、*ClpB* の ATP 加水分解は基質結合ではなく、基質結合後の糸通しに重要であることを示している。また、*TClpB* の AAA-1 の中央孔残基は ATP 結合状態で孔の中心に集まり、その結果、中央孔が狭くなるという報告がある [29]。この Walker B 変異体の遅い糸通しは、変異を導入した AAA モジュールの中央孔が狭いまま維持されていることが原因かもしれない。この仮説が正しければ、Walker A 変異体は、中央孔残基が孔の中心に集まらず、

中央孔が広いために、 k_{cat} と K_m が高めになっていると説明できる。

保存 Arg 残基変異体は WalkerB 変異体と同様に、ATP 加水分解が阻害される変異体であるが、糸通しの k_{cat} は Walker B 変異体よりも有意に高く、*7BAP2* の半分程度であった。これは、保存 Arg 残基変異体の中央孔残基は ATP 結合状態でさえも、孔の中心に集まりきっていないという可能性を示唆しているのかもしれない。その場合、保存 Arg 残基を介したサブユニット間の情報交換が ATP 結合で誘導される中央孔残基の構造変化に関与している可能性がある。この仮説は以前 Biter らによって提唱された、ClpB は保存 Arg 残基を介して隣のサブユニットのヌクレオチド状態を感知し、そのシグナルを伝え、最終的に pore loop の構造変化に繋がるというモデルと一致する [50]。

7BAP2-1KT/AA、*7BAP2-2KT/AA*、*7BAP2-2R/A* の ATP 加水分解活性は *7BAP2* よりも極端に低く、*7BAP2-1,2R/A* の ATP 加水分解活性は全くなかったが、糸通し速度は十分に速かった。これらの結果は、ClpB による変性タンパク質の糸通しには、ATP 加水分解のエネルギーは必要ないことを示している。非常に高い ATP 加水分解活性を持つ BAP 変異体が、野生型 BAP と同じ速度で FITC-casein を糸通ししたという以前の報告も、ATP 加水分解活性と糸通し速度が関係ないことを示しているのかもしれない [37]。また、Clp/Hsp100 ファミリーの ClpA は、ミドルドメインを持たないこと以外 ClpB と構造的によく似ているが、ClpA の Walker A 変異体は ATP 存在下でも casein を糸通しできない [51]。一方、AAA+ファミリータンパク質で 26S プロテアソームの 6 量体 ATPase のホモログとして知られる PAN は、ATP 加水分解なしでも casein を糸通しすることが報告されている [52]。これらのことから、ClpB は ClpA よりもむしろ PAN と同様の方法で、変性タンパク質を糸通しするのかもしれない。

7BAP2 の変性タンパク質の糸通しにおける速度論パラメータは ATP 加水分解活性よりも導入した変異の種類に影響されていた。また、ClpB は受動的に変性タンパク質を糸通しすることができ、その糸通し速度は 6 量体リング中央の孔の性質や広さに依存して変化すると考えられた。更に、AAA-1、AAA-2 のどちらに変異を導入しても、その効果はほとんど同じであったことから、変性タンパク質の糸通しにおいて、AAA-1 と AAA-2 の役割や貢献度はほぼ同等であると考えられる。本研究で得られた糸通し活性の解析結果から、ClpB による変性タンパク質の糸通しモデルを提唱した (図 3-16)。ミドルドメインの安定性は糸通しとはあまり関係がなく、N 末端ドメインとその動きは糸通しを促進している。更に、中央孔残基は基質の結合に関わり、中央孔が広いと、変性タンパク質は通りやすいが、中央孔が狭いと通りにくい状態である。この中央孔の広さを決めている中央孔残基の構造変化に保存 Arg 残基を介したサブユニットの情報伝達が関与している。また、AAA-1、AAA-2 の保存配列変異体の糸通し活性と脱凝集活性を比較したところ、高い糸通し活性を持つ *7BAP2* 変異体が必ずしも高い凝集体の再生活性を持つわけではなかった。この結果は、脱凝集には基質の糸通しの他にも重要な過程が存在することを示唆している。

5. 結語

ClpBによる脱凝集には、DnaKシステムとの協同、ATPの結合・加水分解とそれに伴うミドルドメインの構造変化、6量体リング中央の孔への凝集タンパク質の糸通しなど様々な過程が必要である。その中で、糸通しは基質に直接作用する主要な過程であり、Clp/Hsp100ファミリーに共通の過程でもある。ClpPと結合できるClpBの変異体BAPを用いれば、DnaKシステム非存在下でもClpBの基質糸通し活性を調べることができ、脱凝集活性と糸通し活性を分離して検出することができる。

本研究では、ClpBの基質糸通しのメカニズムを調べることで、脱凝集のメカニズムに迫るために、まず好熱菌型のBAPであるTBAPを作製し、糸通し活性の測定系を立ち上げた。更に、各ドメインの様々な変異を導入し、糸通し活性を含む様々な活性の解析を行なった。その結果、ミドルドメインの安定性が脱凝集過程における基質結合とその糸通し以外の過程に必要であることが分かった。また、N末端ドメインがcaseinの糸通しに重要であり、その動きは糸通しを促進していることを見出した。更に、AAA-1、AAA-2の中央孔のTyr残基はそれぞれ基質結合に関わっており、Ala残基に置換しても基質結合後の糸通しは可能であることが分かった。また、AAA-1、AAA-2のそれぞれのドメインへのATPの結合も基質結合に関わっており、どちらか片方へのATPの結合が基質結合後の糸通しに必要であることを明らかにした。更に、それぞれのドメインでのATPの加水分解は基質結合後の糸通しを促進しているが、必要ではないことを見出した。これまで、ClpBによる基質の糸通しはATPの結合・加水分解のエネルギーを使っていると考えられてきたが、ATP加水分解活性を全く持たない変異体でも十分な速度でcaseinを糸通しすることができた。このことから、ClpBによる変性タンパク質の糸通しには、ATPの加水分解のエネルギーは必要ではないことが分かった。これらの結果を総合的に考えて、ClpBによる変性タンパク質の新たな糸通しモデルを提唱した。AAA+ファミリーの中には、基質タンパク質の糸通し活性を持つものがたくさん存在するが、これまでATP加水分解非依存的な基質タンパク質の糸通しはまだあまり報告されてはいなかった。本研究の成果は、糸通し活性を共通に持つタンパク質の基質糸通しメカニズムの理解に役立つと期待される。また、糸通し活性の高さが必ずしも凝集体の再生活性の高さに反映されるわけではなかった。おそらく、変性タンパク質のようなひも状のものを糸通しするのであれば、ATPの加水分解のエネルギーは必要ではないが、凝集体のような複雑に絡み合ったものを糸通しするのであれば、DnaKシステムと協同し、ATPの加水分解のエネルギーを用いて強力なパワーを算出する必要があるのだと考えられる。この基質の糸通し活性が凝集体の再生活性にどのようにして貢献しているか、それを明らかにするのが今後の課題である。

6. 引用文献

- 1 小椋光、遠藤斗志也、森正敬、吉田賢右/編。(2004) 細胞における蛋白質の一生 生成・成熟・輸送・管理・分解・病態. . 蛋白質核酸酵素 増刊. 第49巻
- 2 遠藤斗志也、小椋光、永田和宏、森和俊、田口英樹、吉田賢右/編。(2008) キーワード: タンパク質の一生. . 蛋白質核酸酵素 増刊. 第53巻
- 3 Mogk, A., Tomoyasu, T., Goloubinoff, P., Rudiger, S., Roder, D., Langen, H. and Bukau, B. (1999) Identification of thermolabile *Escherichia coli* proteins: prevention and reversion of aggregation by DnaK and ClpB. EMBO J. **18**, 6934-6949
- 4 Motohashi, K., Watanabe, Y., Yohda, M. and Yoshida, M. (1999) Heat-inactivated proteins are rescued by the DnaK.J-GrpE set and ClpB chaperones. Proc Natl Acad Sci U S A. **96**, 7184-7189
- 5 Zolkiewski, M. (1999) ClpB cooperates with DnaK, DnaJ, and GrpE in suppressing protein aggregation. A novel multi-chaperone system from *Escherichia coli*. J Biol Chem. **274**, 28083-28086
- 6 Parsell, D. A., Kowal, A. S., Singer, M. A. and Lindquist, S. (1994) Protein disaggregation mediated by heat-shock protein Hsp104. Nature. **372**, 475-478
- 7 Glover, J. R. and Lindquist, S. (1998) Hsp104, Hsp70, and Hsp40: a novel chaperone system that rescues previously aggregated proteins. Cell. **94**, 73-82
- 8 Goloubinoff, P., Mogk, A., Zvi, A. P., Tomoyasu, T. and Bukau, B. (1999) Sequential mechanism of solubilization and refolding of stable protein aggregates by a bichaperone network. Proc Natl Acad Sci U S A. **96**, 13732-13737
- 9 Krzewska, J., Langer, T. and Liberek, K. (2001) Mitochondrial Hsp78, a member of the Clp/Hsp100 family in *Saccharomyces cerevisiae*, cooperates with Hsp70 in protein refolding. FEBS Lett. **489**, 92-96
- 10 Bukau, B. and Horwich, A. L. (1998) The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. Cell. **92**, 351-366
- 11 Mayer, M. P. and Bukau, B. (2005) Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. Cell Mol Life Sci. **62**, 670-684
- 12 Diamant, S., Ben-Zvi, A. P., Bukau, B. and Goloubinoff, P. (2000) Size-dependent disaggregation of stable protein aggregates by the DnaK chaperone machinery. J Biol Chem. **275**, 21107-21113
- 13 Weibezahn, J., Tessarz, P., Schlieker, C., Zahn, R., Maglica, Z., Lee, S., Zentgraf, H., Weber-Ban, E. U., Dougan, D. A., Tsai, F. T., Mogk, A. and Bukau, B. (2004) Thermotolerance requires refolding of aggregated proteins by substrate translocation

through the central pore of ClpB. *Cell*. **119**, 653-665

14 Parsell, D. A., Kowal, A. S. and Lindquist, S. (1994) *Saccharomyces cerevisiae* Hsp104 protein. Purification and characterization of ATP-induced structural changes. *J Biol Chem*. **269**, 4480-4487

15 Zolkiewski, M., Kessel, M., Ginsburg, A. and Maurizi, M. R. (1999) Nucleotide-dependent oligomerization of ClpB from *Escherichia coli*. *Protein Sci*. **8**, 1899-1903

16 Krzewska, J., Konopa, G. and Liberek, K. (2001) Importance of two ATP-binding sites for oligomerization, ATPase activity and chaperone function of mitochondrial Hsp78 protein. *J Mol Biol*. **314**, 901-910

17 Schlee, S., Groemping, Y., Herde, P., Seidel, R. and Reinstein, J. (2001) The chaperone function of ClpB from *Thermus thermophilus* depends on allosteric interactions of its two ATP-binding sites. *J Mol Biol*. **306**, 889-899

18 Watanabe, Y. H., Motohashi, K. and Yoshida, M. (2002) Roles of the two ATP binding sites of ClpB from *Thermus thermophilus*. *J Biol Chem*. **277**, 5804-5809

19 Mogk, A., Schlieker, C., Strub, C., Rist, W., Weibezahn, J. and Bukau, B. (2003) Roles of individual domains and conserved motifs of the AAA+ chaperone ClpB in oligomerization, ATP hydrolysis, and chaperone activity. *J Biol Chem*. **278**, 17615-17624

20 Akoev, V., Gogol, E. P., Barnett, M. E. and Zolkiewski, M. (2004) Nucleotide-induced switch in oligomerization of the AAA+ ATPase ClpB. *Protein Sci*. **13**, 567-574

21 Lee, S., Sowa, M. E., Watanabe, Y. H., Sigler, P. B., Chiu, W., Yoshida, M. and Tsai, F. T. (2003) The structure of ClpB: a molecular chaperone that rescues proteins from an aggregated state. *Cell*. **115**, 229-240

22 Woo, K. M., Kim, K. I., Goldberg, A. L., Ha, D. B. and Chung, C. H. (1992) The heat-shock protein ClpB in *Escherichia coli* is a protein-activated ATPase. *J Biol Chem*. **267**, 20429-20434

23 Park, S. K., Kim, K. I., Woo, K. M., Seol, J. H., Tanaka, K., Ichihara, A., Ha, D. B. and Chung, C. H. (1993) Site-directed mutagenesis of the dual translational initiation sites of the *clpB* gene of *Escherichia coli* and characterization of its gene products. *J Biol Chem*. **268**, 20170-20174

24 Barnett, M. E., Zolkiewska, A. and Zolkiewski, M. (2000) Structure and activity of ClpB from *Escherichia coli*. Role of the amino- and -carboxyl-terminal domains. *J Biol Chem*. **275**, 37565-37571

25 Beinker, P., Schlee, S., Groemping, Y., Seidel, R. and Reinstein, J. (2002) The N terminus of ClpB from *Thermus thermophilus* is not essential for the chaperone activity. *J Biol Chem*. **277**, 47160-47166

- 26 Barnett, M. E., Nagy, M., Kedzierska, S. and Zolkiewski, M. (2005) The amino-terminal domain of ClpB supports binding to strongly aggregated proteins. *J Biol Chem.* **280**, 34940-34945
- 27 Barnett, M. E. and Zolkiewski, M. (2002) Site-directed mutagenesis of conserved charged amino acid residues in ClpB from *Escherichia coli*. *Biochemistry.* **41**, 11277-11283
- 28 Tanaka, N., Tani, Y., Hattori, H., Tada, T. and Kunugi, S. (2004) Interaction of the N-terminal domain of *Escherichia coli* heat-shock protein ClpB and protein aggregates during chaperone activity. *Protein Sci.* **13**, 3214-3221
- 29 Lee, S., Choi, J. M. and Tsai, F. T. (2007) Visualizing the ATPase cycle in a protein disaggregating machine: structural basis for substrate binding by ClpB. *Mol Cell.* **25**, 261-271
- 30 Weibezahn, J., Schlieker, C., Bukau, B. and Mogk, A. (2003) Characterization of a trap mutant of the AAA+ chaperone ClpB. *J Biol Chem.* **278**, 32608-32617
- 31 Wang, J., Song, J. J., Franklin, M. C., Kamtekar, S., Im, Y. J., Rho, S. H., Seong, I. S., Lee, C. S., Chung, C. H. and Eom, S. H. (2001) Crystal structures of the HslVU peptidase-ATPase complex reveal an ATP-dependent proteolysis mechanism. *Structure.* **9**, 177-184
- 32 Schlieker, C., Weibezahn, J., Patzelt, H., Tessarz, P., Strub, C., Zeth, K., Erbse, A., Schneider-Mergener, J., Chin, J. W., Schultz, P. G., Bukau, B. and Mogk, A. (2004) Substrate recognition by the AAA+ chaperone ClpB. *Nat Struct Mol Biol.* **11**, 607-615
- 33 Doyle, S. M., Hoskins, J. R. and Wickner, S. (2012) DnaK chaperone-dependent disaggregation by caseinolytic peptidase B (ClpB) mutants reveals functional overlap in the N-terminal domain and nucleotide-binding domain-1 pore tyrosine. *J Biol Chem.* **287**, 28470-28479
- 34 Yamada-Inagawa, T., Okuno, T., Karata, K., Yamanaka, K. and Ogura, T. (2003) Conserved pore residues in the AAA protease FtsH are important for proteolysis and its coupling to ATP hydrolysis. *J Biol Chem.* **278**, 50182-50187
- 35 Yamasaki, T., Nakazaki, Y., Yoshida, M. and Watanabe, Y. H. (2011) Roles of conserved arginines in ATP-binding domains of AAA+ chaperone ClpB from *Thermus thermophilus*. *The FEBS journal.* **278**, 2395-2403
- 36 Watanabe, Y. H., Takano, M. and Yoshida, M. (2005) ATP binding to nucleotide binding domain (NBD)1 of the ClpB chaperone induces motion of the long coiled-coil, stabilizes the hexamer, and activates NBD2. *J Biol Chem.* **280**, 24562-24567
- 37 Oguchi, Y., Kummer, E., Seyffer, F., Berynsky, M., Anstett, B., Zahn, R., Wade, R. C., Mogk, A. and Bukau, B. (2012) A tightly regulated molecular toggle controls AAA+ disaggregase. *Nat Struct Mol Biol.* **19**, 1338-1346

- 38 Lipinska, N., Zietkiewicz, S., Sobczak, A., Jurczyk, A., Potocki, W., Morawiec, E., Wawrzycka, A., Gumowski, K., Slusarz, M., Rodziewicz-Motowidlo, S., Chrusciel, E. and Liberek, K. (2013) Disruption of ionic interactions between the nucleotide binding domain 1 (NBD1) and middle (M) domain in Hsp100 disaggregase unleashes toxic hyperactivity and partial independence from Hsp70. *J Biol Chem.* **288**, 2857-2869
- 39 Lee, J., Kim, J. H., Biter, A. B., Sielaff, B., Lee, S. and Tsai, F. T. (2013) Heat shock protein (Hsp) 70 is an activator of the Hsp104 motor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **110**, 8513-8518
- 40 Kityk, R., Kopp, J., Sinning, I. and Mayer, M. P. (2012) Structure and dynamics of the ATP-bound open conformation of Hsp70 chaperones. *Mol Cell.* **48**, 863-874
- 41 Bertelsen, E. B., Chang, L., Gestwicki, J. E. and Zuiderweg, E. R. (2009) Solution conformation of wild-type *E. coli* Hsp70 (DnaK) chaperone complexed with ADP and substrate. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **106**, 8471-8476
- 42 Guo, F., Maurizi, M. R., Esser, L. and Xia, D. (2002) Crystal structure of ClpA, an Hsp100 chaperone and regulator of ClpAP protease. *J Biol Chem.* **277**, 46743-46752
- 43 Bewley, M. C., Graziano, V., Griffin, K. and Flanagan, J. M. (2006) The asymmetry in the mature amino-terminus of ClpP facilitates a local symmetry match in ClpAP and ClpXP complexes. *J Struct Biol.* **153**, 113-128
- 44 Higuchi, R., Krummel, B. and Saiki, R. K. (1988) A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. *Nucleic Acids Res.* **16**, 7351-7367
- 45 Ho, S. N., Hunt, H. D., Horton, R. M., Pullen, J. K. and Pease, L. R. (1989) Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene.* **77**, 51-59
- 46 Watanabe, Y. H. and Yoshida, M. (2004) Trigonal DnaK-DnaJ complex versus free DnaK and DnaJ: heat stress converts the former to the latter, and only the latter can do disaggregation in cooperation with ClpB. *J Biol Chem.* **279**, 15723-15727
- 47 Motohashi, K., Yohda, M., Odaka, M. and Yoshida, M. (1997) K⁺ is an indispensable cofactor for GrpE stimulation of ATPase activity of DnaK x DnaJ complex from *Thermus thermophilus*. *FEBS Lett.* **412**, 633-636
- 48 Watanabe, Y. H., Nakazaki, Y., Suno, R. and Yoshida, M. (2009) Stability of the two wings of the coiled-coil domain of ClpB chaperone is critical for its disaggregation activity. *Biochem J.* **421**, 71-77
- 49 水野さやか. (2009) 分子シャペロン ClpB の N 末端ドメインの動きはいかにして脱凝集過程を促進するか. 修士論文, 1-56
- 50 Biter, A. B., Lee, S., Sung, N. and Tsai, F. T. (2012) Structural basis for intersubunit

- signaling in a protein disaggregating machine. Proc Natl Acad Sci U S A. **109**, 12515-12520
- 51 Singh, S. K. and Maurizi, M. R. (1994) Mutational analysis demonstrates different functional roles for the two ATP-binding sites in ClpAP protease from *Escherichia coli*. J Biol Chem. **269**, 29537-29545
- 52 Smith, D. M., Kafri, G., Cheng, Y., Ng, D., Walz, T. and Goldberg, A. L. (2005) ATP binding to PAN or the 26S ATPases causes association with the 20S proteasome, gate opening, and translocation of unfolded proteins. Mol Cell. **20**, 687-698

7. 公表論文

副論文

I Watanabe, Y. H., Nakazaki, Y., Suno, R. and Yoshida, M. (2009) Stability of the two wings of the coiled-coil domain of ClpB chaperone is critical for its disaggregation activity. *Biochem J.* **421**, 71-77

II Mizuno, S., Nakazaki, Y., Yoshida, M. and Watanabe, Y. H. (2012) Orientation of the amino-terminal domain of ClpB affects the disaggregation of the protein. *The FEBS journal.* **279**, 1474-1484

III Nakazaki, Y. and Watanabe, Y. H. (2014) ClpB chaperone passively threads soluble denatured proteins through its central pore. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms.* **19**, 891-900

参考論文

I Yamasaki, T., Nakazaki, Y., Yoshida, M. and Watanabe, Y. H. (2011) Roles of conserved arginines in ATP-binding domains of AAA+ chaperone ClpB from *Thermus thermophilus*. *FEBS J.* **278**, 2395-2403