

氏名・本籍	中崎 洋介 (兵庫県)
学位の種類	博士 (理学)
報告番号	甲第 89 号
学位授与の日付	平成 27 年 3 月 31 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当者
論文題目	分子シャペロン ClpB の基質糸通し活性の解析
審査委員	(主査) 准教授 渡辺 洋平 (副査) 教授 日下部 岳広 (副査) 教授 本多 大輔

## 論文内容の要旨

分子シャペロン ClpB は、一度凝集したタンパク質を可溶化し再生する「脱凝集」という他に類のない活性を持つ。ClpB は、AAA+とよばれるタンパク質ファミリーに属するが、その中には、物質輸送、膜融合、DNA 複製、タンパク質分解など様々な細胞機能に関わるタンパク質が含まれている。これらのタンパク質は、AAA+モジュールとよばれる特徴的な構造を持ち、そこで ATP を結合・加水分解する。また ClpB を含め、その多くはリング状の 6 量体を形成して機能する。ClpB は、AAA+タンパク質に共通する普遍的な構造を持ちながら、脱凝集という特殊な機能を発揮することから、その分子メカニズムが注目されている。

ClpB による脱凝集には、別の分子シャペロンである DnaK とその補助因子の協力が必要であり、脱凝集反応全体は、複数の反応の組み合わせからなると考えられる。その中で、ClpB が凝集体からポリペプチド鎖を引きずり出し、6 量体リングの中央の孔を通す「糸通し」が脱凝集の主要な過程であると考えられている。本研究は、ClpB の糸通し過程に注目し、その仕組みを明らかにすることで、脱凝集の分子メカニズムに迫ることを目的としている。

先行研究において作製された、大腸菌由来の ClpB の変異タンパク質である BAP は、ClpB の機能を持ったまま、筒型のプロテアーゼである ClpP に結合できる。BAP が糸通ししたタンパク質は、ClpP 内部へと送り込まれて分解されるため、糸通し反応を基質タンパク質の分解として検出することができる。またさらに、基質タンパク質としてモデル変性タンパク質であるカゼインを用いれば、DnaK とその補助因子非存在下でも、糸通し反応を検出することができる。

申請者は、解析の利便性を考慮し、結晶構造解析や様々な変異タンパク質の解析が進んでいる、好熱菌 *Thermus thermophilus* 由来の ClpB をもとに BAP (TBAP) を

作製し、精度の高い糸通し測定系を構築した。ClpB のサブユニットは、N 末端ドメイン、ミドルドメインと、2 つの AAA+モジュール (AAA1, AAA2) の 4 つのドメインからなる。N 末端ドメインは、可動性の高い球状ドメインで、ミドルドメインは、ロイシンジッパー様の構造で安定化された長いコイルドコイル構造からなる。また、2 つの AAA+モジュールは、機能上重要ないくつかの保存配列を共通して持つ。その中で、Walker A 配列は ATP の結合に、Walker B 配列は結合した ATP の加水分解に、また、アルギニンフィンガーとよばれる保存アルギニン残基は ATP の加水分解とサブユニット間の情報伝達に関与する。さらに、立体構造上リング中央の孔の位置には、中央孔残基とよばれる芳香族アミノ酸が保存されている。これらのドメインや保存配列に変異を導入した *T*BAP を作製し、糸通し活性にどのような影響を与えるかを詳細に調べた。その結果、ミドルドメインは脱凝集反応には必須だが、糸通し過程には必要ないことが示された。また N 末端ドメインは、基質の結合に直接関与し、それが動くことが糸通し速度の促進につながっていた。基質の結合には、2 つの AAA+モジュールへの ATP の結合や、中央孔の芳香族アミノ酸も重要であった。さらに 2 つの AAA+モジュールのヌクレオチド状態が糸通し速度に影響することや、ATP の加水分解なしでも糸通しが進行することなどを見いだした。

## 審査結果の要旨

分子シャペロン ClpB は、AAA+モジュールとよばれる様々な生命機能に関わるタンパク質に共通する構造を持ちながら、脱凝集という特殊な機能を発揮することから注目されている。しかし、ClpB による脱凝集反応は、多くの補助因子を必要とし、凝集体という不溶性で不均一な基質を対象とする複雑な反応であるため、これまで分子メカニズムにまで踏み込んだ、定量的な解析は困難であった。

申請者は、脱凝集の主要な過程である「糸通し」に注目し、糸通し活性の検出に適した ClpB 変異体である BAP を用いた解析を行った。BAP を用いた糸通し過程の検出方法は、先行研究によって示されていたものの、体系立てられた定量的な解析は行われていなかった。申請者はまず、蛍光標識した変性モデルタンパク質を用いて、糸通し活性の測定系の改良を行った。その結果、幅広い測定条件に対応でき、高い時間分解能と再現性を持った測定系を確立した。さらにこの測定系を用いて、ClpB の主要なドメイン、および保存配列への変異導入の影響を体系的に調べた。その結果、ClpB の N 末端ドメインは基質を直接結合し、その動きが糸通し過程を促進することを示した。また、2 つの AAA+モジュールへの ATP の結合・加水分解は、アルギニンフィンガーを介してリング中央の孔の構造を変化させ、その変化が、基質との親和性や糸通しの速度を調節していることを明らかにした。その一方で、脱凝集反応に必須のミドルドメインや ATP 加水分解活性は、糸通しには必須ではなく、さらに ClpB の糸通し速度と脱凝集活性の間には、直接的な正の相関がないことを示し、脱凝集には、糸通しの他にも重要な過程があることを示した。

これらの結果は、今後 ClpB による脱凝集反応の全容を明らかにする上で、重要な基盤知識となる。また、ClpB 以外の、生物学的に重要な多くの AAA+タンパク質の分

子メカニズムを考察する上でも重要な知見となるはずである。

本研究の成果は、「The 3rd International Symposium on Protein Community (2010年, 奈良)」、「第33回日本分子生物学会年会 第83回日本生化学会大会 合同大会 (2010年, 神戸)」、「第86回日本生化学会大会 (2013年, 横浜)」, および「第87回日本生化学会大会 (2014年, 京都)」などで発表されている。また, 成果の一部は, 国際学術誌 (副論文 3 編) に受理・掲載され, 国内外において高い評価を受けている。

2015年1月30日, 本学の学位規程に従い公開講演を行い, 本論文に関する説明と質疑応答を行った。申請者の説明は明快であり, 応答内容も十分満足できるものであった。

以上により審査委員は本論文提出者 (中崎洋介) が, 博士課程の修了に必要な所定の単位を修得し, かつ, 必要な研究指導を受け, 博士論文の審査及び最終試験に合格したので, 博士 (理学) の学位を授与せられるに充分なる資格をもつものであると認める。