

2015 年度博士論文

分子シャペロン ClpB のサブユニット間の協同性の解析

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

学籍番号 31322004

山崎 孝史

指導教員 渡辺 洋平 准教授

目次	1
略号	3
要旨	5
1. 序論	6
1-1. 分子シャペロン	
1-2. DnaK システムの機能	
1-3. ClpB の構造と特徴	
1-4. ClpB の変異体 BAP	
1-5. 本研究の目的	
2. 実験材料と実験方法	15
2-1. プラスミド DNA の作製	
2-2. タンパク質の大量発現	
2-3. タンパク質の精製	
2-4. タンパク質の濃度測定	
2-5. ヌクレオチド結合の測定	
2-6. ATP 加水分解活性の測定	
2-7. 糸通し活性の測定	
2-8. G6PDH を用いた 7ClpB の脱凝集活性の測定	
2-9. α -グルコシダーゼを用いた 7ClpB の脱凝集活性の測定	
2-10. 7ClpB のゲルろ過分析	
2-11. 7ClpB 変異体の ABD-F ラベル	
2-12. ミドルドメインの構造変化の検出	
2-13. 7ClpB 連結 2 量体の作製	
2-14. IPMDH を用いた 7ClpB の脱凝集活性の測定	
3. 結果	30
3-1. 7ClpB 保存 Arg 残基変異体の解析	
3-1-1. ヌクレオチド結合能	
3-1-2. ATP 加水分解活性	
3-1-3. 糸通し活性	
3-1-4. 脱凝集活性	
3-1-5. ゲルろ過分析	

3-1-6. ミドルドメインの構造変化の解析	
3-2. <i>TClpB</i> ヘテロ 6 量体の作製及び活性測定	
3-2-1. サブユニット間連結箇所の探索	
3-2-2. サブユニット間ジスルフィド結合の形成とその確認	
3-2-3. D1 ダイマー、D2 ダイマーのゲルろ過分析	
3-2-4. D1 ダイマー、D2 ダイマーの ATP 加水分解活性	
3-2-5. D1 ダイマー、D2 ダイマーの脱凝集活性	
3-2-6. <i>TClpB</i> ヘテロ 6 量体のヌクレオチド結合能	
3-2-7. Walker A 変異を含む <i>TClpB</i> ヘテロ 6 量体の ATP 加水分解活性	
3-2-8. 保存 Arg 残基変異を含む <i>TClpB</i> ヘテロ 6 量体の ATP 加水分解活性	
3-2-9. Walker B 変異を含む <i>TClpB</i> ヘテロ 6 量体の ATP 加水分解活性	
3-2-10. Walker A 変異を含む <i>TClpB</i> ヘテロ 6 量体の脱凝集活性	
3-2-11. 保存 Arg 残基変異を含む <i>TClpB</i> ヘテロ 6 量体の脱凝集活性	
3-2-12. Walker B 変異を含む <i>TClpB</i> ヘテロ 6 量体の脱凝集活性	
4. 考察	61
4-1. <i>TClpB</i> の保存 Arg 残基の機能解析	
4-2. <i>TClpB</i> ヘテロ 2 量体の作製とその機能解析	
4-3. <i>TClpB</i> へのヌクレオチド結合におけるサブユニット間の協同性の解析	
4-4. <i>TClpB</i> の ATP 加水分解におけるサブユニット間の協同性の解析	
4-5. <i>TClpB</i> の協同的な ATP の加水分解と脱凝集活性との関係	
4-6. D1 ダイマー、D2 ダイマーのゲルろ過分析	
5. 結語	69
6. 参考文献	70
7. 公表論文	76

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	ampicilin
AMPPNP	adenosine 5'- (beta, gamma-imino) triphosphate
ATP	adenosine 5'-triphosphate
ATPyS	adenosine 5'- <i>O</i> - (thiotriphosphate)
BAP	ClpB-ClpA-P loop
BSA	bovine serum albumin
CBB	coomassie brilliant blue
Clp	caseinolytic protease
DEAE	diethyl-aminoethyl
DTT	dithiothreitol
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EMDB	electron microscopy data bank
FITC	fluorescein-4-isothiocyanate
G6P	glucose 6-phosphate
G6PDH	glucose 6-phosphate dehydrogenase
HPLC	high performance liquid chromatography
Hsl	heat shock locus
Hsp	heat shock protein
IPM	isopropylmalate
IPMDH	3-isopropylmalate dehydrogenase
LB	lulia broth
LDH	lactate dehydrogenase
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
NBD	nucleotide binding domain
Mant-ADP	2' (3')- <i>O</i> - <i>N'</i> -methylaniloyl aminoadenosine 5'-diphosphate
MOPS	3-morpholinopropanesulfonic acid
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PCR	polymerase chain reaction
PDB	protein data bank

PEP	phosphoenolpyruvic acid
PK	pyruvate kinase
<i>p</i> -NGP	<i>p</i> -nitrophenyl- α - <i>D</i> -glucopyranoside
SBD	substrate binding domain
SDS	sodium dodecylsulfate
TB	terrific broth
TCA	trichloroacetic acid
TCEP	tris (2-carboxyethyl) phosphine
<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、別のシャペロンである DnaK、DnaJ、GrpE と協力して、熱によって凝集したタンパク質をほぐし、活性のある立体構造へと戻すことができる。この凝集体を解きほぐす過程を脱凝集という。ClpB は ATPases associated with diverse cellular activities (AAA+) タンパク質ファミリーに属しており、ATP 依存的に 6 量体のリング構造を形成して働く。ClpB のサブユニット 1 つは、N 末端ドメイン、2 つの ATP 加水分解ドメイン (AAA-1、AAA-2)、その間にあるミドルドメインの 4 つのドメインで構成されている。ClpB は 2 つの ATP 加水分解ドメインでの ATP の結合・加水分解のサイクルに応じて、凝集体を 6 量体リング中央の孔に通し（糸通し）、脱凝集すると考えられている。凝集体を糸通しするための大きな力を生み出すため、ClpB の各サブユニットでの反応や構造変化は、協同的に起こると考えられているが、その詳細は分かっていない。本研究では、ClpB のサブユニット間にどのような協同性があり、脱凝集反応にどう関わるのかを明らかにする。

ClpB の ATP 加水分解ドメインには、AAA+タンパク質ファミリーで高度に保存されているアルギニン (Arg) 残基がある。この保存 Arg 残基は、隣接するサブユニットの ATP 結合部位に近接しており、相互作用することで、隣のサブユニットでの反応や構造変化に関与すると考えられる。ClpB の保存 Arg 残基をアラニン (Ala) 残基に置換した変異体を作製し、解析したところ、保存 Arg 残基は ATP の結合に関与しないが、その加水分解には必須であることが分かった。また、保存 Arg 残基変異体の糸通し活性、及び脱凝集活性は、野生型に対して大きく低下していた。このことから、保存 Arg 残基は隣接するサブユニットの ATP 加水分解に関わり、糸通しや脱凝集に必要な構造変化を誘起すると考えられた。

一方で、ClpB のサブユニット界面にシステイン (Cys) 残基を変異導入し、ジスルフィド結合で隣接するサブユニット 2 つを連結した。この連結 2 量体の各サブユニットは、Cys 残基の導入部位が異なるため、6 量体を形成すると、2 種のサブユニットが必ず交互に並ぶことになる。このうち一方のサブユニットに、さらに別の変異を導入すると、その変異が導入されたサブユニットが 1 つおきに並んだヘテロ 6 量体を作製することができる。これを利用して、ATP が結合できない変異、ATP を加水分解できない変異、保存 Arg 残基変異を持つサブユニットが交互に並んだヘテロ 6 量体をそれぞれ作製し、活性を調べた。その結果、ATP はサブユニットごとにランダムに結合するが、その加水分解は AAA-1、AAA-2 リング内で協同的に起こることを見出した。さらに脱凝集反応には、このリング内の協同的な ATP の加水分解が必須であることが分かった。

1. 序論

1-1. 分子シャペロン

アミノ酸がペプチド結合によって多数つながったタンパク質は、イオン間相互作用、ファンデルワールス力、水素結合、疎水相互作用などのアミノ酸側鎖同士の複雑な相互作用によって自発的に折りたたまれ（フォールディング）、立体構造を形成する。しかし、リボソームによって合成された新生ポリペプチド鎖の全てが、アミノ酸配列によって既定された立体構造へとフォールディングできるとは限らない。例えば大腸菌では、細胞内のタンパク質濃度が $100 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 以上と言われており [1]、新生ポリペプチド鎖がフォールディングする前に、別の新生ポリペプチド鎖、またはタンパク質と相互作用してしまい、フォールディングに失敗することがある。フォールディングに失敗したポリペプチド鎖は多数集まって、細胞に有害な不溶性の凝集体を形成する。また、一度立体構造を形成したタンパク質でも、熱や pH などの環境変化によって立体構造が崩れると（変性）、それらが無秩序に会合することで凝集体を形成する [2]。こういったタンパク質の凝集を防ぎ、正常なフォールディングへと導く働きを持つ一群のタンパク質を分子シャペロンといい、様々な生物が多様な分子シャペロンを持っている。多くの分子シャペロンは、熱によってタンパク質の発現が誘導される熱ショックタンパク質（Hsp）である。細胞が熱ストレスにさらされると、分子シャペロンの発現レベルが上昇し、熱によって変性したタンパク質の凝集を抑制、フォールディングを促進する [3]。その結果、過酷なストレス環境下でも細胞は生き残ることができる。こうした機能を持つ分子シャペロンとして、GroEL や DnaK などが知られているが、どちらも一度凝集してしまったタンパク質を、元の正常な立体構造に戻すことはできない [4]。しかし、分子シャペロン ClpB は、別のシャペロンである DnaK、DnaJ、GrpE（DnaK システム）と協力することで、凝集したタンパク質をほぐし、再生することができる [5-11]。この凝集体をほぐす反応を脱凝集反応という。

1-2. DnaK システムの機能

DnaK とそのホモログである Hsp70 は、原核生物から真核生物に至る多くの生物種が保有する分子シャペロンである。DnaK は、ATP 加水分解活性を持つヌクレオチド結合ドメイン（NBD）と、基質結合ドメイン（SBD）から成り、それらがリンカーでつながった構造をしている（図 1-1）[12]。DnaK は ATP 結合状態で SBD が開いた状態になり、変性タンパク質などの基質が結合可能になる（図 1-1.A）。ATP を加水分解して ADP 結合状態へと遷移すると、SBD が閉じた状態へと変化し、その際に形成される基

質結合ポケットに基質タンパク質を挟み込むことで、基質と強く結合する (図 1-1.B)。そして、結合した ADP が解離して、再び ATP が結合すると、SBD が開いた状態へと戻り、基質タンパク質を解離する。DnaK はこうした一連のサイクルを繰り返すことで、変性タンパク質の凝集を抑制し、フォールディングを促進する。この DnaK の働きには DnaJ と GrpE と呼ばれる補助因子も必要である。DnaJ は変性タンパク質を結合し、それを DnaK に受け渡すと同時に、DnaK の ATP 加水分解を促進する。一方、GrpE は DnaK に結合した ADP の解離を促進する [4]。また、DnaK システムは変性タンパク質のフォールディングだけでなく、小さな凝集体の再生もできる。しかし、厳しいストレス条件下で形成された大きな凝集体の再生には、ClpB と DnaK システムの協力が必要である [6, 13]。その際、DnaK システムが凝集体の表面に結合し、それを ClpB に受け渡すと考えられている [14]。

1-3. ClpB の構造と特徴

ClpB とそのホモログである Hsp104 は、原核生物から真核生物に広く保存されている。ClpB は ATPases associated with diverse cellular activities (AAA+) タンパク質ファミリーに属している [15]。AAA+タンパク質は、RecA 様のヌクレオチド結合ドメイン (ラージドメイン) と、その C 末端側の α -ヘリックスに富んだサブドメイン (スモールドメイン) から構成される AAA+モジュール (ATP 加水分解ドメイン) を 1 つ、または 2 つ持つ。AAA+タンパク質の多くはリング状のオリゴマーを形成して機能する [16]。ClpB は塩濃度、ヌクレオチド結合状態、タンパク質濃度に依存して、6 量体のリング構造を形成する (図 1-2.A) [17-23]。ClpB はこのリング中央に形成される半径 10 Å 程度の孔に、凝集体からポリペプチド鎖を引き抜きながら通す (糸通し) ことで、脱凝集すると考えられている (図 1-3) [14]。

好熱菌 *Thermus thermophilus* 由来の ClpB (TClpB) では、すでに結晶構造が解かれており、そのサブユニット 1 つは、N 末端ドメイン、2 つの AAA+モジュール (AAA-1、AAA-2)、その間にあるミドルドメインの 4 つのドメインから構成される (図 1-2.B) [24]。N 末端ドメインは、 α -ヘリックスに富んだ可動性の高い球状のドメインで、基質タンパク質との結合に重要である (図 1-2.B) [25, 26]。また、ミドルドメインは長さ 85 Å のコイルドコイル構造から成る可動性の高いドメインで [24]、N 末端側半分を Wing-2、C 末端側半分を Wing-1 と呼ぶ (図 1-2.B) [27]。AAA+モジュールには、Walker A 配列 (GXXGXGKT : G はグリシン残基、K はリジン残基、T はスレオニン残基、X は任意のアミノ酸残基) と Walker B 配列 (hhhhDE : D はアスパラギン酸残基、E はグルタミン酸残基、h は疎水性アミノ酸残基) と呼ばれるモチーフと、アルギニン (Arg) フィンガーと呼ばれる保存 Arg 残基が 1 つ、または 2 つある (図 1-4) [15, 24, 28]。2 つあ

る場合は、N 末端側からそれぞれポジション 2 (P2)、ポジション 1 (P1) と呼ばれている [28]。Walker A 配列は ATP などのヌクレオチドの結合に、Walker B 配列は ATP の加水分解に重要な配列であることが知られている [29]。一方、保存 Arg 残基は、隣接するサブユニットに結合した ATP の γ 位のリン酸基と相互作用し、その 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ことが知られている [28, 30]。

1-4. ClpB の変異体 BAP

AAA+タンパク質ファミリーに属し、ClpB と良く似た立体構造の ClpA は、IGF モチーフと呼ばれるループ部分で、プロテアーゼ活性を有する ClpP と結合し、ClpAP 複合体を形成する [31]。ClpA は、不完全な mRNA を基に合成されたタンパク質に付加される ssrA タグと呼ばれるアミノ酸配列を認識して、糸通しし、ClpP に送り込むことで分解する。ClpA の IGF モチーフを、ClpB に移植した変異体である BAP は、ClpB としての脱凝集機能を保持したまま、ClpP との結合活性を有する。そのため、DnaK システム共存下では、BAP-ClpP 複合体は、凝集体を脱凝集し、分解することができる。また、DnaK システム非共存下では、モデル変性タンパク質であるカゼインを分解することができる [14, 32]。BAP-ClpP のシステムを用いれば、ClpB による脱凝集反応のうち、DnaK システム非依存的な糸通し活性のみを評価することができる。

1-5. 本研究の目的

ClpB 6 量体は、合計 12 個ある AAA+モジュールへの ATP の結合とその加水分解によって、個々のサブユニットの構造を変化させ、凝集体の中央孔への引き込みという複雑な機能を発揮する。その際、各サブユニットが独立して凝集体の引き込みにつながるような構造変化を起こすのではなく、複数、または全てのサブユニットがタイミングを合わせて、協同的に構造を変化させると考えられている [33]。本研究では、この協同の仕組みを明らかにすることを目的とした。

まず、AAA+タンパク質ファミリーで高度に保存されている Arg 残基の機能解析を行った。この保存 Arg 残基は、隣接するサブユニットの ATP 結合ポケットに近接しているため (図 1-4)、サブユニット間の相互作用に関与すると考えられる。ClpB は保存 Arg 残基を AAA-1 に 2 つ、AAA-2 に 1 つ持つ。これまでの大腸菌 ClpB を用いた研究から、AAA-1 の保存 Arg 残基 (ポジション 1) 変異体は脱凝集活性の低下と 6 量体構造の不安定化が、AAA-2 の保存 Arg 残基変異体は脱凝集活性と ATP 加水分解活性が低下する

ことが知られている [17]。しかし、AAA-1 のポジション 2 の保存 Arg 残基の役割や、それぞれの AAA+モジュールにおける個々の保存 Arg 残基の詳細な役割は分かっていない。また、ClpB 以外の AAA+タンパク質においても、ポジション 1 と 2 の機能上の違いについてはほとんど報告されていない。そこで、3 つの保存 Arg 残基をアラニン (Ala) 残基に置換した変異体をそれぞれ作製し、その変異体の各種活性を測定することで、3 つの保存 Arg 残基の役割を明らかにする。

一方で、サブユニット間の協同性を調べるためには、6 量体の特定のサブユニットに変異を導入し、全体の活性への影響を評価することが有効である。これまでも、ClpB の野生型と変異体を様々な比率で混合し、両者が混在するヘテロ 6 量体を作製し、その活性を測定することで、サブユニット間の協同性について議論されてきた [34-38]。しかし、2 種の ClpB を混合した溶液中で形成されるヘテロ 6 量体には、様々な状態のものが存在している。例えば、野生型と変異体を 1:1 で混合した場合、6 量体中に変異サブユニットを 3 つ含んだものや 4 つ含んだもの、あるいは全く含まないものなど様々である。さらにはヘテロ 6 量体中の 2 種のサブユニットの配置も多様であり、それぞれの活性も異なると考えられる。このように、溶液中にホモ 6 量体や、不均一なヘテロ 6 量体を含んだ状態では、結果の解釈が非常に困難である。そこで、このような不都合を解消するために、サブユニット界面にシステイン (Cys) 残基を導入した 2 種の ClpB サブユニットをジスルフィド結合でつなぎ、連結 2 量体を作製することを考えた。連結 2 量体はそれ自身が 3 つ集まることで、6 量体を形成すると思われるが、その際、異なる 2 種の連結変異体が交互に並ぶことになる (図 1-5)。ここでさらに、一方のサブユニットに別の変異を導入すると、その変異が導入されたサブユニットが 1 つおきに並んだヘテロ 6 量体を作製することができる。また、2 種の連結変異体に異なる変異を導入すれば、異なる変異を持った 2 種のサブユニットが交互に並んだヘテロ 6 量体も作製できる。すなわち、このようなサブユニット間を連結する新たな手法を用いれば、2 種の異なるサブユニットの配置が一定なヘテロ 6 量体のみを作製できる。まずは、サブユニット間で効率よくジスルフィド結合を形成する組み合わせを探索する。連結変異体の組み合わせが決まれば、そこにヌクレオチドの結合を阻害する Walker A 変異を組み合わせる。このヘテロ 6 量体へのヌクレオチドの結合能を調べることで、ヌクレオチドの結合にサブユニット間で協同性があるのかを明らかにする。同様に、連結変異体に Walker B 変異、または保存 Arg 残基変異を組み合わせ、ATP の加水分解にサブユニット間で協同性があるのかを明らかにする。さらに、様々なヘテロ 6 量体の脱凝集活性を測定する。以上の結果から、ATP の結合・加水分解によって引き起こされる各サブユニットの構造変化が、6 量体全体としてどのように統合され、効率的な脱凝集につながっているのか、その分子メカニズムに迫る。

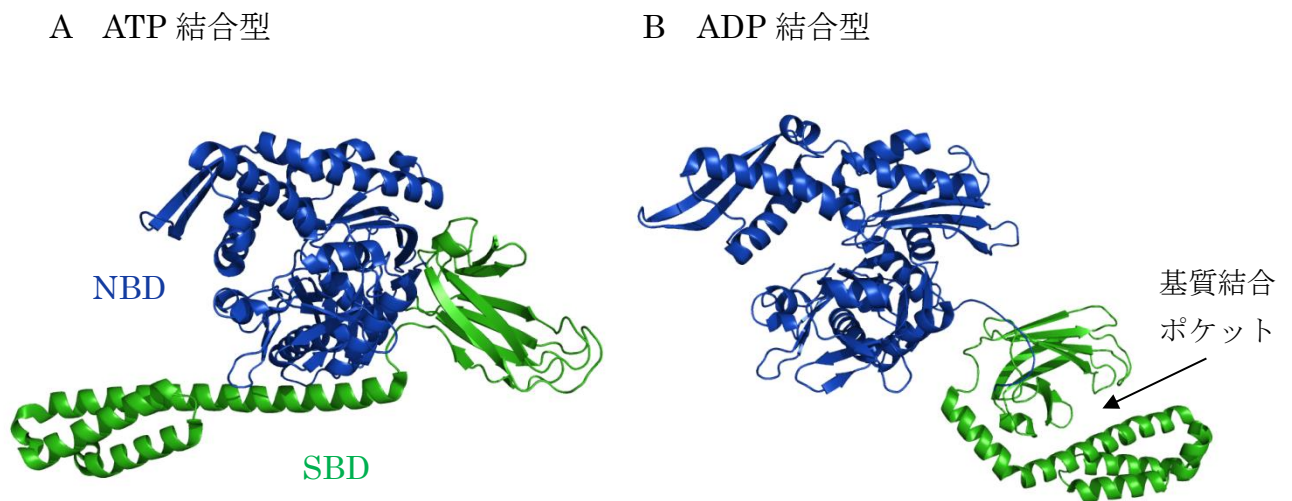


図 1-1. 大腸菌由来 DnaK の立体構造

(A) は ATP 結合状態 (PDB: 4B9Q) [39]、(B) は ADP 結合状態 (PDB: 2KHO) [40] の立体構造モデル。NBD を青で、SBD を緑で示した。

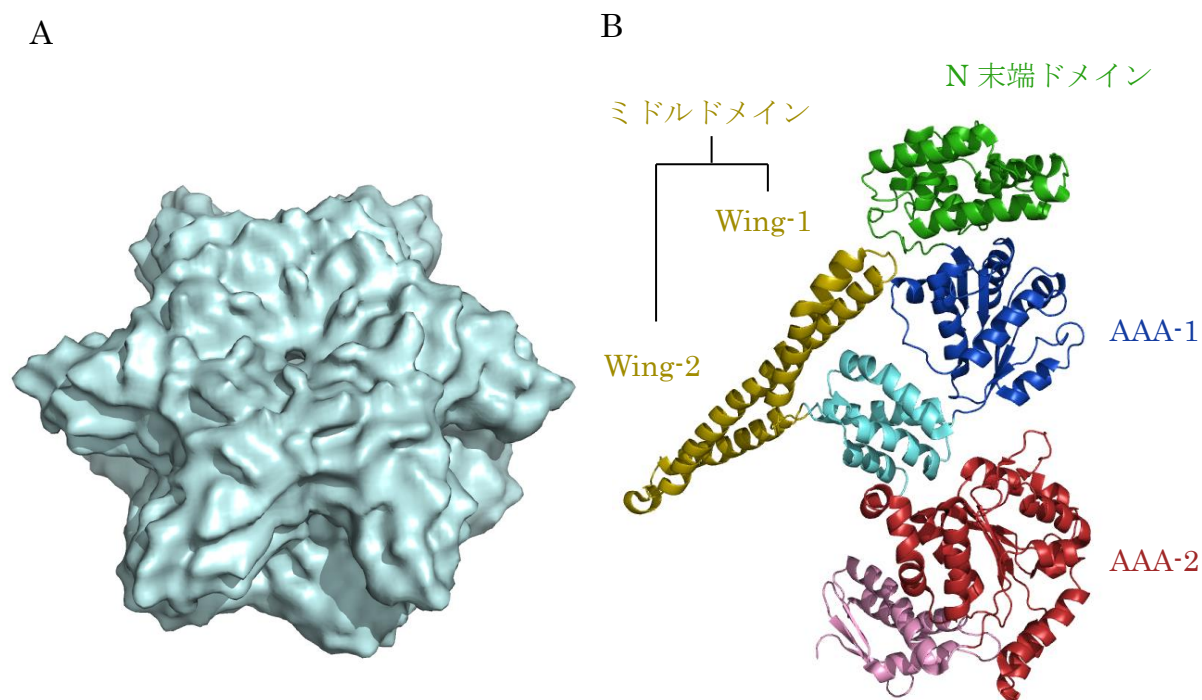


図 1-2. 7ClpB の立体構造

A) 透過型電子顕微鏡像の 3 次元再構成によって作成された 6 量体の立体構造モデル (EMDB: 1244) [41]。B) 単量体の立体構造モデル (PDB: 1QVR) [24]。N 末端ドメインを緑、AAA-1 ラージドメインを青、AAA-1 スモールドメインをシアン、ミドルドメインを黄、AAA-2 ラージドメインを赤、AAA-2 スモールドメインをピンクで示した。

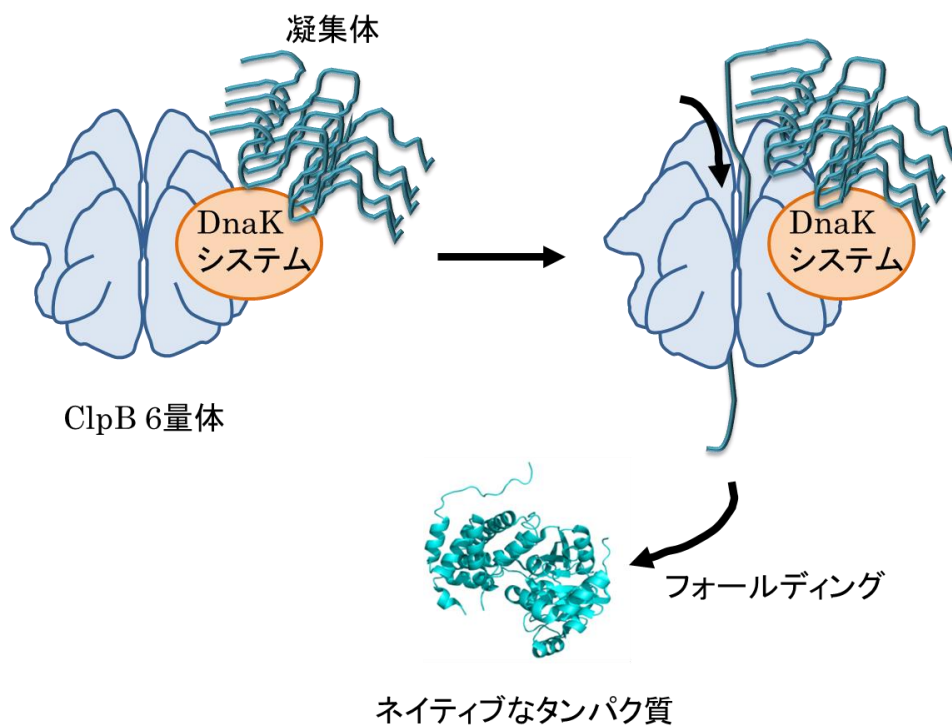
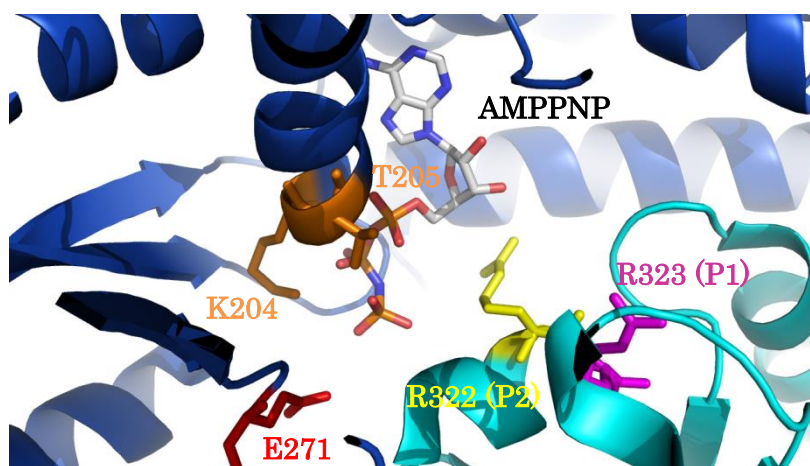


図 1-3. ClpB の脱凝集モデル

凝集体を結合した DnaK システムが、ClpB 6 量体に結合する。ClpB は ATP の結合・加水分解のサイクルを繰り返すことで、凝集体からポリペプチド鎖を引き抜く力を生み出し、糸通しする。リング中央孔を通過したポリペプチド鎖は、自発的、または分子シャペロンの補助を受けてフォールディングする。

A AAA-1



B AAA-2

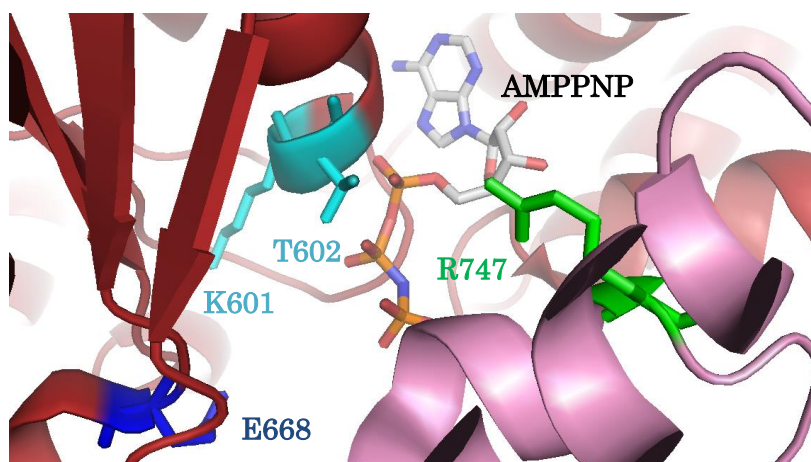


図 1-4. *TClpB* 6 量体のサブユニット界面

A) AAA-1 のサブユニット界面の構造。隣接する 2 つのサブユニットを青とシアンで示し、Walker A 配列の K204 と T205 を橙、Walker B 配列の E271 を赤、保存 Arg 残基の R322 (P2) と R323 (P1) をそれぞれ黄とマゼンタで示した。B) AAA-2 のサブユニット界面の構造。隣接する 2 つのサブユニットを赤とピンクで示し、Walker A 配列の K601 と T602 をシアン、Walker B 配列の E668 を青、保存 Arg 残基の R747 を緑で示した。

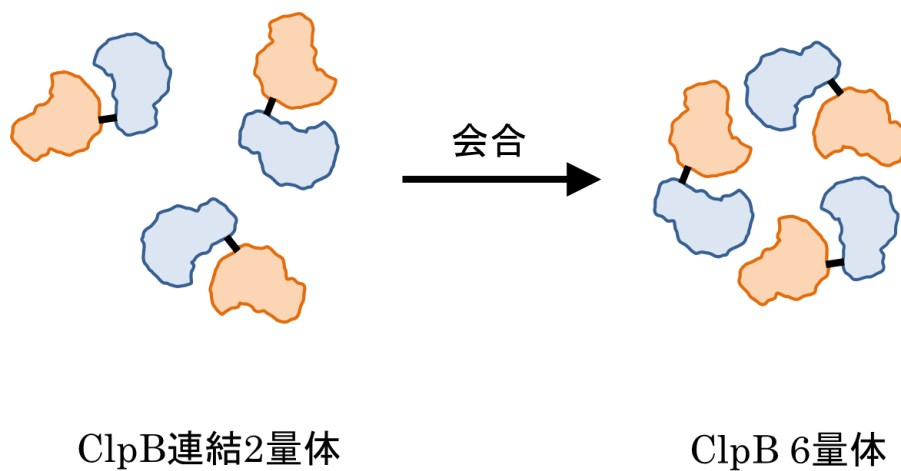


図 1-5. *T*ClpB 連結 2 量体の概念

*T*ClpB が 6 量体を形成した際に、サブユニット界面で互いに近接するような部位に Cys 残基を導入した変異体をそれぞれ作製し、橙と青で示した。これらの変異体間でジスルフィド結合を特異的に形成させ、連結 2 量体とする。連結 2 量体が 3 つ集まって 6 量体を形成すると、これら 2 種のサブユニットが交互に並ぶことになる。連結 2 量体の一方、または両サブユニットに、連結変異以外の変異をさらに組み合わせると、その変異が規則正しく並んだヘテロ 6 量体を作製することができる。

2. 実験材料と実験方法

2-1. プラスミド DNA の作製

TClpB 発現用プラスミドの作製を次の操作で行った。まず、*pET21c* ベクター (Novagen) のマルチクローニングサイトに、*TClpB* 遺伝子が導入されたプラスミドである *pET21c-TClpB* (N6S0)、またはその変異導入プラスミドをテンプレートとして、表 2-1 に示すプライマー、Ex taq DNA ポリメラーゼ (TAKARA) を用いて、2 段階の PCR 反応 (オーバーラップ伸長 PCR) を行った (図 2-1) [42, 43]。作製するプラスミドに対応したテンプレートとプライマーの組み合わせを表 2-2 に示す。PCR 反応溶液をアガロースゲルで電気泳動し、目的長の DNA 断片を切り出し、GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare) を用いて精製した。得られた PCR 産物を制限酵素で切断し、その制限酵素反応溶液をアガロースゲルで電気泳動することで、変異配列を含む DNA 断片のみを GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit を用いて精製した。ベクターとなる DNA 断片も同様の方法で処理し、DNA リガーゼを用いてそれらの断片をライゲーションし、大腸菌 JM109 を形質転換した。作製するプラスミドに対応した DNA 断片の組み合わせを表 2-3 に示す。形質転換した JM109 を、 $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 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) に塗布し、 37°C で 16~18 時間培養した。形成されたコロニーを、 $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ の Amp を含む 3 mL の LB 液体培地 (1 L あたり、5 g Bacto Yeast Extract、10 g Bacto tryptone、10 g NaCl) で、 37°C 、160 rpm で 16~18 時間振とう培養した。培養した菌体を $16,400 g$ で 1 分間遠心することで回収し、AccuPrep Plasmid Mini Extraction Kit (BIONEER) を用いてプラスミドを抽出・精製した。プラスミドに目的の配列が導入されていることを、ABI PRISM 310 を用いて DNA シーケンス解析を行うことで確認した。また、変異体 *TClpB* 発現用プラスミドの一部は、既存のプラスミド同士を制限酵素と DNA リガーゼを用いて切り貼りすることで作製した。その際、形質転換からプラスミドの抽出までは、先ほどと同様の方法で行った。目的のプラスミドが作製されていることの確認は、変異部分にあらかじめ導入した制限酵素サイトが切断されるかどうかで判断した。*pET21c-BAP* (N6S0) は当研究室の中崎が作製したものをを用いた。また、*pET21c-TClpB* (N6S0) に R576C、A821C 変異を導入したプラスミドは当研究室の中村が、Q184C-1KT/AA、Q184C-2KT/AA、Q184C-1KT/AA-2KT/AA、Q184C-1E/Q、Q184C-2E/Q、Q184C-1E/Q-2E/Q、Q184C-1R/A、Q184C-2R/A、A390C-1KT/AA、A390C-2KT/AA、A390C-1KT/AA-2KT/AA、A390C-1E/Q、A390C-2E/Q、A390C-1E/Q-2E/Q、A390C-1R/A、A390C-2R/A 変異を導入したものは当研究室の大畑がそれぞれ作製したものをを用いた。

2-2. タンパク質の大量発現

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 プレート培地に塗布し、37°C で 16~18 時間培養した。形成されたコロニーを、50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ の Amp を含む 500 mL の TB 培地 (1 L あたり、24 g Bacto Yeast Extract、12 g Bacto tryptone、4 mL グリセロール、178 mM リン酸カリウム、pH 7.2) で、37°C、120 rpm で 16~18 時間振とう培養した。培養した菌体を 6,797 g で 5 分間遠心することで回収し、約 25 mL の菌体回収バッファー (10 mM Tris-HCl, pH 7.5、150 mM NaCl) で懸濁し、さらに 7,900 g、10 分間の遠心で菌体を回収した。菌体の収量は 9~15 g で、精製時まで -80°C で保存した。

2-3. タンパク質の精製

7ClpB の各変異タンパク質を発現した菌体を、25 mL の Buffer B (25 mM Tris-HCl, pH 7.5、1 mM EDTA) に懸濁した。その懸濁液を氷冷しながら超音波破碎機 SONIFIER 250 (BRANSON) を用いて、output 6、duty cycle 20、2 分間、細胞を破碎した。細胞破碎液を 80°C、30 分間熱処理することで夾雑タンパク質の多くを凝集させ、9,700 g、4°C、30 分間遠心した。遠心上清を 0.22 μm のフィルターで滅菌し、Buffer B を加えて 50 mL にしたものを、Buffer B で平衡化した DEAE-Toyopearl カラム (Tosoh) 約 10 mL にアプライした。15 mL の Buffer B で DEAE-Toyopearl カラムに吸着しない夾雑タンパク質を洗い流した後、25 mL の 100 mM 塩化ナトリウムを含む Buffer B で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 (Tosoh) 約 5 mL にアプライした。15 mL の 3.3% 硫酸アンモニウムを含む Buffer B で夾雑タンパク質を取り除いた後、10 mL の Buffer B で目的タンパク質を溶出させ、1 mL ずつ分取した。Cys 残基を持つ変異体 (Q184C、R189C、Y348C、H351C、A390C、A419C、R568C、D572C、R576C、L581C、R776C、E779C、A821C、Q822C) に関しては、ここまでの作業を全て 1 mM DTT 存在下で行った。各精製画分を SDS-PAGE にかけて、目的のタンパク質を含む画分を、PD10 ゲルろ過カラム (GE Healthcare) を用いて、BAP は 50 mM MOPS-NaOH, pH 7.5、その他の 7ClpB 変異体は r.b. (50 mM MOPS-NaOH, pH 7.5、150 mM KCl、5 mM MgCl_2) に置換した。ただし、Q184C、R189C、Y348C、H351C、A390C は、5 mM TCEP または 1 mM DTT を含むバッファー (r.b. または 50 mM MOPS-NaOH, pH 7.5) に置換した。得られたタンパク質を液体窒素で凍結し、-80°C で保存した。なお、7DnaK [44]、7DnaJ [44]、7GrpE [45]、IPMDH [44]、及び野生型 7ClpB は、当研究室で発現、精

製されたものを用いた。また、BAP、及び *TClpP* は当研究室の中崎が発現、精製した
ものを用いた [46]。

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。 $2.0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ の BSA (Sigma) を用いて $0.0\sim 0.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ の 2 倍希釈系列を調製した。5 倍希釈した Brad Ford Protein Assay (Bio Rad) 溶液 $500 \mu\text{L}$ に、2 倍希釈系列の BSA 溶液 $5 \mu\text{L}$ をそれぞれ添加し、室温で 10 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、線形近似することで検量線を作成した。精製したタンパク質を $0.20\sim 0.25 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ になるように希釈し、5 倍希釈した Brad Ford Protein Assay 溶液 $500 \mu\text{L}$ に、希釈液 $5 \mu\text{L}$ を添加し、室温で 10 分間インキュベートした。 595 nm の吸光度を測定し、BSA の検量線から、精製したタンパク質の濃度を計算した。モル濃度は、*TDnaK*、*TDnaJ*、FITC- α -カゼイン、G6PDH、 α -グルコシダーゼ、IPMDH は単量体、*TGrpE* は 2 量体、*TClpB* 及びその変異体は 6 量体、*TClpP* は 14 量体でそれぞれ計算した。

2-5. ヌクレオチド結合の測定

$1 \mu\text{M}$ *TClpB* を含む r.b. を、 55°C で 10 分間、セル内でインキュベートし、励起光 360 nm で、 $400\sim 500 \text{ nm}$ の蛍光スペクトルを、蛍光分光光度計 FP-6500 (JASCO) で測定した。その後、Mant-ADP (Life Technologies) を一定量加え、 55°C で 1 分間インキュベートし、同条件で蛍光を測定した。この操作を、溶液中の Mant-ADP 濃度が $25 \mu\text{M}$ になるまで繰り返し行った。コントロールとして、*TClpB* を含まない r.b. についても同様に蛍光スペクトルを測定した。*TClpB* 存在下での 440 nm の蛍光強度から、*TClpB* 非存在下での蛍光強度を差し引いた値を Mant-ADP の濃度に対してプロットした。*TClpB* 単量体に対する Mant-ADP の解離定数 K_d は、*TClpB* 単量体と Mant-ADP が 1:1 で結合するモデルを用いて、以下の式から算出した。*TClpB* と Mant-ADP が式(1)のような平衡状態にあるとき、 K_d は式(2)のように表せる。



$$K_d = \frac{[\text{E}][\text{F}]}{[\text{EF}]} \quad (2)$$

[E]は非結合状態の *TClpB* 濃度、[F]は非結合状態の Mant-ADP 濃度、[EF]は結合状態の *TClpB*-Mant-ADP 濃度を表す。このとき、反応溶液中の *TClpB* と Mant-ADP の全濃度[E₀]と[F₀]は、それぞれ以下の式(3)と式(4)で表すことができる。

$$[E_0] = [E] + [EF] \quad (3)$$

$$[F_0] = [F] + [EF] \quad (4)$$

式(3)と式(4)を変形する。

$$[E] = [E_0] - [EF] \quad (5)$$

$$[F] = [F_0] - [EF] \quad (6)$$

式(2)に式(5)と式(6)を代入する。

$$K_d = \frac{([E_0] - [EF])([F_0] - [EF])}{[EF]} \quad (7)$$

式(7)を[EF]について整理する。

$$[EF]^2 - ([E_0] + [F_0] + K_d)[EF] + [E_0][F_0] = 0 \quad (8)$$

式(8)を[EF]について解く。

$$[EF] = \frac{[E_0] + [F_0] + K_d - \sqrt{([E_0] + [F_0] + K_d)^2 - 4[E_0][F_0]}}{2} \quad (9)$$

440 nm の蛍光強度の差 ΔFL は、結合状態の *TClpB*-Mant-ADP の濃度に依存するため、

$$\Delta FL = C[EF] \quad (10)$$

と表すことができる。このとき、*C*は定数で、結合状態の *TClpB*-Mant-ADP 1 μM の蛍光強度を意味する。式(9)を式(10)に代入する。

$$\Delta FL = C \cdot \frac{[E_0] + [F_0] + K_d - \sqrt{([E_0] + [F_0] + K_d)^2 - 4[E_0][F_0]}}{2} \quad (11)$$

得られた実験データから、式(11)を用いた非線形のカーブフィッティングによって、ヌクレオチド結合可能な *TClpB* 単量体に対する Mant-ADP の K_d を求めた。

1 μM *TClpB* と指定の濃度の Mant-ADP (野生型、及び 1KT/AA 変異体は 12.5 μM 、2KT/AA 変異体は 35 μM) を含む r.b. を、55°C で 10 分間、セル内でインキュベートし、励起光 360 nm で、400~500 nm の蛍光スペクトルを測定した。その後、Mg-ADP、または Mg-ATP を一定量加えて、55°C で 1 分間インキュベートし、蛍光スペクトルを測定する操作を繰り返し行った。440 nm の蛍光強度を、Mg-ADP、または Mg-ATP の濃度に対してプロットした。*TClpB* 単量体に対する ADP、または ATP の解離定数 K_d は、ADP、または ATP が Mant-ADP と競争的に結合するモデルを用いて、以下の式から算出した。*TClpB* と Mant-ADP が式(1)のような平衡状態にあるとき、*TClpB* 単量体に対する Mant-ADP の解離定数 K_{d1} は式(12)のように表せる。また、*TClpB* と ADP、または ATP が式(13)のような平衡状態にあるとき、*TClpB* 単量体に対する ADP または ATP の解離定数 K_{d2} は式(14)のように表せる。

$$K_{d1} = \frac{[E][F]}{[EF]} \quad (12)$$



$$K_{d2} = \frac{[E][S]}{[ES]} \quad (14)$$

[E]は非結合状態の *TClpB* 濃度、[F]は非結合状態の Mant-ADP 濃度、[EF]は結合状態の *TClpB*-Mant-ADP 濃度、[S]は非結合状態の ADP または ATP 濃度、[ES]は結合状態の *TClpB*-ADP または *TClpB*-ATP 濃度を表す。反応溶液中では、式(1)と式(13)の両反応が平衡状態にあると仮定する。式(12)を変形すると、

$$[E] = \frac{K_{d1} \cdot [EF]}{[F]} \quad (15)$$

と表され、さらに式(14)に式(15)を代入して整理する。

$$K_{d2} = \frac{K_{d1} \cdot [EF][S]}{[ES][F]} \quad (16)$$

反応溶液中の *TCIpB* の全濃度 $[E_0]$ 、*Mant*-ADP の全濃度 $[F_0]$ 、ADP または ATP の全濃度 $[S_0]$ は、それぞれ以下の式(17~19)で表すことができる。

$$[E_0] = [E] + [EF] + [ES] \quad (17)$$

$$[F_0] = [F] + [EF] \quad (18)$$

$$[S_0] = [S] \quad (\because [S] \gg [ES]) \quad (19)$$

式(17)と式(18)をそれぞれ変形する。

$$[E] = [E_0] - [EF] - [ES] \quad (20)$$

$$[F] = [F_0] - [EF] \quad (21)$$

式(14)を変形する。

$$[ES] = \frac{[E][S]}{K_{d2}} \quad (22)$$

式(20)を式(22)に代入して整理する。

$$[ES] = \frac{([E_0] - [EF])[S]}{K_{d2} + [S]} \quad (23)$$

式(16)に式(19)、式(21)、式(23)を代入する。

$$K_{d2} = \frac{K_{d1} \cdot [EF][S_0]}{\frac{([E_0] - [EF])[S_0]}{K_{d2} + [S_0]} \cdot ([F_0] - [EF])} \quad (24)$$

式(24)を変形して、 $[EF]$ について整理する。

$$K_{d2} \cdot [EF]^2 - (K_{d2} \cdot [E_0] + K_{d2} \cdot [F_0] + K_{d1} \cdot [S_0] + K_{d1} \cdot K_{d2})[EF] + K_{d2} \cdot [E_0][F_0] = 0 \quad (25)$$

式(25)を[EF]について解く。

$$[EF] = \frac{1}{2 \cdot K_{d2}} \cdot (K_{d2} \cdot [E_0] + K_{d2} \cdot [F_0] + K_{d1} \cdot [S_0] + K_{d1} \cdot K_{d2} - \sqrt{(K_{d2} \cdot [E_0] + K_{d2} \cdot [F_0] + K_{d1} \cdot [S_0] + K_{d1} \cdot K_{d2})^2 - 4 \cdot K_{d2}^2 \cdot [E_0][F_0]}) \quad (26)$$

440 nm の蛍光強度 FL は、反応溶液中の Mant-ADP の濃度と、結合状態の TClpB-Mant-ADP の濃度に依存するため、

$$FL = C_1 + C_2[EF] \quad (27)$$

と表すことができる。このとき、 C_1 と C_2 は定数で、それぞれ反応溶液中の Mant-ADP が全て非結合状態のときの蛍光強度と、結合状態の TClpB-Mant-ADP 1 μM の蛍光強度を意味する。式(26)を式(27)に代入する。

$$FL = C_1 + \frac{C_2}{2 \cdot K_{d2}} \cdot (K_{d2} \cdot [E_0] + K_{d2} \cdot [F_0] + K_{d1} \cdot [S_0] + K_{d1} \cdot K_{d2} - \sqrt{(K_{d2} \cdot [E_0] + K_{d2} \cdot [F_0] + K_{d1} \cdot [S_0] + K_{d1} \cdot K_{d2})^2 - 4 \cdot K_{d2}^2 \cdot [E_0][F_0]}) \quad (28)$$

得られた実験データから、式(28)を用いた非線形のカーブフィッティングによって、ヌクレオチド結合可能な TClpB 単量体に対する ADP、または ATP の K_d を求めた。

2-6. ATP 加水分解活性の測定

反応溶液 (50 mM MOPS-NaOH, pH7.5、150 mM KCl、5 mM MgCl₂、2.5 mM PEP、0.2 mM NADH、50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ PK (ウサギ筋肉由来 : Roche)、50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ LDH (ウサギ筋肉由来:Roche)) をセル内で 55°C、2 分間インキュベートした後、NADH の 340 nm の吸光度の時間変化を、分光光度計 V-650 (JASCO) で測定した。測定開始後、順次 ATP を 3 mM、TClpB を 0.05 μM 、または 0.25 μM 添加し、反応を開始した。また、必要があれば、TClpB の基質で、変性モデルタンパク質である κ -カゼインを 0.1 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 加え、測定を続けた。TClpB 単量体による ATP 加水分解のターンオーバー数は、NADH の 340 nm の吸光度変化と、NADH の分子吸光係数 ($\epsilon_{340} = 6220 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) から求めた (図 2-2)。

2-7. 糸通し活性の測定

反応溶液 (50 mM MOPS-NaOH, pH7.5、150 mM KCl、5 mM MgCl₂、3 mM ATP、0.5 μ M 7ClpP、3 μ M FITC- α -カゼイン) をセル内で 55°C、2 分間インキュベートし、FITC の 490 nm の励起光による 520 nm の蛍光の時間変化を、蛍光分光光度計 FP-6500 で測定した。FITC- α -カゼインは、当研究室の中崎が調製し、ラベル率が約 186% のものを使用した [47]。測定開始後、BAP を 0.05 μ M 添加することで反応を開始させ、その後 30 分間測定を続けた。反応開始 30 分後の反応溶液に、10% (v/v) となるように TCA を加えて攪拌し、10 分間氷冷した後、21,900 *g* で 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。得られた沈殿を SDS-PAGE (14%ポリアクリルアミドゲル) にかけて、CBB で染色した。残存する FITC- α -カゼインのバンドを、Molecular Imager FX (Bio Rad) を用いて定量した。電気泳動図から見積もられた FITC- α -カゼインの分解量に対して、反応終了時の蛍光強度の上昇量をプロットし、線形回帰することで、蛍光強度と分解量の関係式を求め、検量線とした。検量線と反応開始 2~3 分の蛍光変化から、BAP 6 量体による FITC- α -カゼイン分解のターンオーバー数を算出した。

2-8. G6PDH を用いた 7ClpB の脱凝集活性の測定

r.b.中に 0.2 μ M G6PDH、3 mM ATP、必要に応じて 1 mM DTT を含む反応溶液を、72°C で 8 分間熱処理することで、G6PDH を変性・凝集させた。その後、7DnaK、7DnaJ、7GrpE、7ClpB あるいはその変異体を、それぞれ 0.6 μ M、0.2 μ M、0.1 μ M、0.05 μ M 加え、55°C で 90 分間インキュベートした。熱処理前、熱処理後、55°C インキュベート後の G6PDH の酵素活性を測定し、酵素活性が熱処理前の何%回復するかを求めた。G6PDH の酵素活性は、55°C の活性測定溶液 (100 mM Tris-HCl, pH 8.8、40 mM MgCl₂、1 mM NADP⁺、3 mM G6P) 1200 μ L に、反応溶液 10 μ L を加え (最終濃度 1.67 nM G6PDH)、生成される NADPH の 340 nm の吸光度を、分光光度計 V-650 を用いて測定することで求めた。

2-9. α -グルコシダーゼを用いた 7ClpB の脱凝集活性の測定

r.b.中に 0.2 μ M α -グルコシダーゼ、3 mM ATP、必要に応じて 1 mM DTT または 5 mM TCEP を含む反応溶液を、73°C で 10 分間熱処理することで、 α -グルコシダーゼを変性・凝集させた。その後、7DnaK、7DnaJ、7GrpE、7ClpB あるいはその変異体を、それぞれ 0.6 μ M、0.2 μ M、0.1 μ M、0.05 μ M 加え、55°C で 90 分間インキュベートし

た。熱処理前、熱処理後、55°C インキュベート後の α -グルコシダーゼの酵素活性を測定し、酵素活性が熱処理前の何%回復するかを求めた。 α -グルコシダーゼの酵素活性は、55°C の活性測定溶液 (50 mM リン酸ナトリウム, pH 6.8, 10 mM *p*-NGP) 600 μ L に、反応溶液 10 μ L を加え (最終濃度 3.33 nM α -グルコシダーゼ)、生成される *p*-ニトロフェノールの 405 nm の吸光度を、分光光度計 V-650 を用いて測定することで求めた。

2-10. *TClpB* のゲルろ過分析

1 mg \cdot mL⁻¹ の *TClpB* を含む試料溶液 (50 mM MOPS-NaOH, pH 7.5, 150~800 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 2 mM ATP) を、55°C で 1 分間インキュベートした後、21,900 *g* で 1 分間遠心した。100 μ L の上清を、試料溶液と同じ組成のランニングバッファーで平衡化した HPLC ゲルろ過カラム TSK G3000SWXL (Tosoh) にアプライした。ゲルろ過は 55°C、流速 0.5 mL \cdot min⁻¹で行い、タンパク質の溶出を 290 nm の吸光度で検出した。

2-11. *TClpB* 変異体の ABD-F ラベル

4 mg \cdot mL⁻¹ *TClpB* を含む溶液 (50 mM MOPS-NaOH, pH 7.5, 150 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM TCEP) に、ABD-F を 1 mM 加え、55°C で 2 時間インキュベートした。未反応の ABD-F を、HPLC ゲルろ過カラム TSK G3000SWXL にアプライすることで取り除いた。384 nm の吸光度と、ABD-F の分子吸光係数 ($\epsilon_{384} = 7800 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) から、溶液中の ABD-F の濃度を求めた。また、ブラッドフォード法により *TClpB* の濃度を求め、*TClpB* の ABD-F ラベル率を算出した。

2-12. ミドルドメインの構造変化の検出

ABD-F でラベルされた 0.1 mg \cdot mL⁻¹ の *TClpB* を含む溶液 (50 mM MOPS-NaOH, pH 7.5, 150 または 300 mM KCl, 5 mM MgCl₂) をセル内で 55°C、2 分間インキュベートした後、390 nm の励起光による 400~600 nm の蛍光スペクトルを、蛍光分光光度計 FP-6500 で測定した。その後、ATP、ADP、または ATP γ S を 3 mM になるように加え、55°C で 2 分間インキュベートした後、再度蛍光スペクトルを測定した。

2-13. *T*ClpB 連結 2 量体の作製

2 種類の *T*ClpB 連結変異体を等モル含む反応溶液 (50 mM MOPS-NaOH, pH 7.5、150 mM KCl、5 mM MgCl₂) に、3 mM ATP 存在下・非存在下で CuCl₂ を 50 μM 加え、55°C で 60 分間インキュベートした。反応溶液中の CuCl₂ を、Zeba Desalt Spin Columns (Thermo Fisher Scientific)、NAP5 ゲルろ過カラム (GE Healthcare)、または PD10 ゲルろ過カラムを用いて取り除き、2-メルカプトエタノール非存在下で SDS-PAGE にかけて (6%ポリアクリルアミドゲル)、CBB で染色した。*T*ClpB 連結 2 量体と、未反応の単量体 *T*ClpB のバンドを、Molecular Imager FX を用いて定量し、*T*ClpB 連結 2 量体の形成効率を算出した。形成効率が 90%に満たないものは、50 mM MOPS-NaOH, pH 7.5、500 mM KCl、5 mM MgCl₂、2 mM ADP のランニングバッファで平衡化した HPLC ゲルろ過カラム TSK G3000SWXL にアプライすることで、連結 2 量体を精製し、その純度を 90%以上にした。その後、Zeba Desalt Spin Columns、NAP5 ゲルろ過カラム、または PD10 ゲルろ過カラムを用いて、*T*ClpB 連結 2 量体のバッファを r.b.、または 50 mM MOPS-NaOH, pH 7.5 に置換した。

2-14. IPMDH を用いた *T*ClpB の脱凝集活性の測定

r.b.中に 0.2 μM IPMDH、3 mM ATP、必要に応じて 5 mM TCEP を含む反応溶液を、89°C で 30 分間熱処理することで、IPMDH を変性・凝集させた。その後、*T*DnaK、*T*DnaJ、*T*GrpE、*T*ClpB あるいはその変異体を、それぞれ 0.6 μM、0.2 μM、0.1 μM、0.05 μM 加え、55°C で 90 分間インキュベートした。熱処理前、熱処理後、55°C インキュベート後の IPMDH の酵素活性を測定し、酵素活性が熱処理前の何%回復するかを求めた。IPMDH の酵素活性は、55°C の活性測定溶液 (120 mM リン酸カリウム, pH 7.8、1.2 M KCl、1.2 mM MgCl₂、0.96 mM NAD⁺、0.48 mM IPM) 600 μL に、反応溶液 100 μL を加え (最終濃度 28.6 nM IPMDH)、生成される NADH の 340 nm の吸光度を、分光光度計 V-650 を用いて測定することで求めた。

表 2-1. 使用プライマー

Primer	Sequence (5' - 3')
<i>TClpB_T7F24</i>	GAAATTAATACGACTCACTATAGG
<i>TClpB_f1</i>	AGCTCAAGGACCGCTACGTG
<i>TClpB_f2.5</i>	CACCGTGGTGGGGGCAGGCAAG
<i>TClpB_f3.8</i>	CCCAAGCTGGAGGCCGAGGTGGAG
<i>TClpB_f4.7</i>	GAGGAGGCCCTACTCGGTC
<i>TClpB_r0</i>	GTGGTGGTGCTCGAGTGCGG
<i>TClpB_r1.5</i>	CCGAATCCTCCTCGAGGTG
<i>TClpB_r2.5</i>	TCCTTCTCAATCTCCCGGTACTC
<i>TClpB_R322A_f</i>	CTGGAGGCGCGCTTCCAGCCCGTG
<i>TClpB_R322A_r</i>	CGCGCCTCCAGGGCGGGGTCTTCTCAATCTCCCGGTAC
<i>TClpB_R323A_f</i>	CCTGGAGCGCGCCTTCCAGCCCGTGTACG
<i>TClpB_R323A_r</i>	AAGGCGCGCTCCAGGGCGGGGTCTTCTCAATCTCCCGGTAC
<i>TClpB_R747A_f</i>	CTGAACGCGTTGGACGAGATC
<i>TClpB_R747A_r</i>	GTCCAACGCGTTCAGGAACTCGGGGCGGAAGTG
<i>TClpB_2KT/AA_f</i>	CCTCGGGCCACGCGGGGTGGGGGCCGCGGAGCTCGCCAAGAC
<i>TClpB_2KT/AA_r</i>	GTCTTGCGGAGCTCCGCGGCCCCCACCCTCGTGGGCCCCGAGG
<i>TClpB_2E/Q_f</i>	CATCCTCTTTGATCAGATTGAGAAGGCCCAACCCGACG
<i>TClpB_2E/Q_r</i>	CGTCGGGGTGGGCCTTCTCAATCTGATCAAAGAGGATG
<i>TClpB_Q184C_f</i>	TCCGACGCGTGATCTGCATCCTCCTCCGGC
<i>TClpB_Q184C_r</i>	GGATGCAGATCACGCGTCGGATCTCCTCGTCCCGG
<i>TClpB_R189C_f</i>	GATCCAGATCTTGCTCCGGTGACCAAGAACAAC
<i>TClpB_R189C_r</i>	TGGTGACACCGGAGCAAGATCTGGATCA
<i>TClpB_Y348C_f</i>	AAGTGCGAGGTCCACCATGGGGTGCGCATCT
<i>TClpB_Y348C_r</i>	CCCCATGGTGGACCTCGCACTTCTCCTT
<i>TClpB_H351C_f</i>	AGGTCTGCCATGGGGTGCGCATCTCCGA
<i>TClpB_H351C_r</i>	GCACCCCATGGCAGACCTCGTAC
<i>TClpB_A390C_f</i>	CGGCATGCCGCTGCGCATGG
<i>TClpB_A390C_r</i>	CAGGCGGCATGCCGCCTCGTCA

表 2-2. 使用プライマーの組み合わせ

Plasmid	PCR	Forward primer	Reverse primer	Template
pET21c- <i>T</i> ClpB (N6S0)-1R/A (P1)	1st	<i>T</i> ClpB_R323A_f	<i>T</i> ClpB_r1.5	pET21c- <i>T</i> ClpB (N6S0)
		<i>T</i> ClpB_f1	<i>T</i> ClpB_R323A_r	
	2nd	<i>T</i> ClpB_f1	<i>T</i> ClpB_r1.5	1st PCR産物
pET21c- <i>T</i> ClpB (N6S0)-1R/A (P2)	1st	<i>T</i> ClpB_R322A_f	<i>T</i> ClpB_r1.5	pET21c- <i>T</i> ClpB (N6S0)
		<i>T</i> ClpB_f1	<i>T</i> ClpB_R322A_r	
	2nd	<i>T</i> ClpB_f1	<i>T</i> ClpB_r1.5	1st PCR産物
pET21c- <i>T</i> ClpB (N6S0)-2R/A	1st	<i>T</i> ClpB_R747A_f	<i>T</i> ClpB_r0	pET21c- <i>T</i> ClpB (N6S0)
		<i>T</i> ClpB_f4.7	<i>T</i> ClpB_R747A_r	
	2nd	<i>T</i> ClpB_f4.7	<i>T</i> ClpB_r0	1st PCR産物
pET21c-BAP (N6S0)-2R/A	1st	<i>T</i> ClpB_R747A_f	<i>T</i> ClpB_r0	pET21c-BAP (N6S0)
		<i>T</i> ClpB_f4.7	<i>T</i> ClpB_R747A_r	
	2nd	<i>T</i> ClpB_f4.7	<i>T</i> ClpB_r0	1st PCR産物
pET21c- <i>T</i> ClpB (N6S0)-R576C-2KT/AA	1st	<i>T</i> ClpB_2KT/AA_f	<i>T</i> ClpB_r0	pET21c- <i>T</i> ClpB (N6S0)-R576C
		<i>T</i> ClpB_f3.8	<i>T</i> ClpB_2KT/AA_r	
	2nd	<i>T</i> ClpB_f3.8	<i>T</i> ClpB_r0	1st PCR産物
pET21c- <i>T</i> ClpB (N6S0)-R576C-2E/Q	1st	<i>T</i> ClpB_2E/Q_f	<i>T</i> ClpB_r0	pET21c- <i>T</i> ClpB (N6S0)-R576C
		<i>T</i> ClpB_f3.8	<i>T</i> ClpB_2E/Q_r	
	2nd	<i>T</i> ClpB_f3.8	<i>T</i> ClpB_r0	1st PCR産物
pET21c- <i>T</i> ClpB (N6S0)-R576C-2R/A	1st	<i>T</i> ClpB_R747A_f	<i>T</i> ClpB_r0	pET21c- <i>T</i> ClpB (N6S0)-A821C
		<i>T</i> ClpB_f4.7	<i>T</i> ClpB_R747A_r	
	2nd	<i>T</i> ClpB_f4.7	<i>T</i> ClpB_r0	1st PCR産物
pET21c- <i>T</i> ClpB (N6S0)-Q184C	1st	<i>T</i> ClpB_Q184C_f	<i>T</i> ClpB_r1.5	pET21c- <i>T</i> ClpB (N6S0)
		<i>T</i> ClpB_f1	<i>T</i> ClpB_Q184C_r	
	2nd	<i>T</i> ClpB_f4.7	<i>T</i> ClpB_r0	1st PCR産物
pET21c- <i>T</i> ClpB (N6S0)-R189C	1st	<i>T</i> ClpB_R189C_f	<i>T</i> ClpB_r2.5	pET21c- <i>T</i> ClpB (N6S0)
		<i>T</i> ClpB_T7F24	<i>T</i> ClpB_R189C_r	
	2nd	<i>T</i> ClpB_T7F24	<i>T</i> ClpB_r2.5	1st PCR産物
pET21c- <i>T</i> ClpB (N6S0)-Y348C	1st	<i>T</i> ClpB_Y348C_f	<i>T</i> ClpB_r1.5	pET21c- <i>T</i> ClpB (N6S0)
		<i>T</i> ClpB_f2.5	<i>T</i> ClpB_Y348C_r	
	2nd	<i>T</i> ClpB_f2.5	<i>T</i> ClpB_r1.5	1st PCR産物
pET21c- <i>T</i> ClpB (N6S0)-H351C	1st	<i>T</i> ClpB_H351C_f	<i>T</i> ClpB_r1.5	pET21c- <i>T</i> ClpB (N6S0)
		<i>T</i> ClpB_f2.5	<i>T</i> ClpB_H351C_r	
	2nd	<i>T</i> ClpB_f2.5	<i>T</i> ClpB_r1.5	1st PCR産物
pET21c- <i>T</i> ClpB (N6S0)-A390C	1st	<i>T</i> ClpB_A390C_f	<i>T</i> ClpB_r1.5	pET21c- <i>T</i> ClpB (N6S0)
		<i>T</i> ClpB_f2.5	<i>T</i> ClpB_A390C_r	
	2nd	<i>T</i> ClpB_f2.5	<i>T</i> ClpB_r1.5	1st PCR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 fragment (bp)	
pET21c- <i>TCI</i> pB (N6S0)-1R/A (P1)	2nd PCR 産物	pET21c- <i>TCI</i> pB (N6S0)	EcoT22I csp45I	約1,100 約6,900	Insert Vector
pET21c- <i>TCI</i> pB (N6S0)-1R/A (P2)					
pET21c- <i>TCI</i> pB (N6S0)-Q184C					
pET21c- <i>TCI</i> pB (N6S0)-1R/A (P1)-2KT/AA	pET21c- <i>TCI</i> pB (N6S0)-1R/A (P1)	pET21c- <i>TCI</i> pB (N6S0)-2KT/AA			
pET21c- <i>TCI</i> pB (N6S0)-2R/A	2nd PCR 産物	pET21c- <i>TCI</i> pB (N6S0)	AatII SacII	約500 約7,500	Insert Vector
pET21c- <i>TCI</i> pB (N6S0)-A821C-2R/A					
pET21c-BAP (N6S0)-2R/A					
pET21c-BAP (N6S0)-1R/A (P1)					
pET21c-BAP (N6S0)-1R/A (P2)					
pET21c- <i>TCI</i> pB (N6S0)-R576C-2KT/AA	2nd PCR 産物	pET21c- <i>TCI</i> pB (N6S0)-R576C	csp45I EcoRI	約1,000 約7,000	Insert Vector
pET21c- <i>TCI</i> pB (N6S0)-R576C-2E/Q					
pET21c- <i>TCI</i> pB (N6S0)-R576C-A419C					
pET21c- <i>TCI</i> pB (N6S0)-R576C-1KT/AA					
pET21c- <i>TCI</i> pB (N6S0)-R576C-1E/Q					
pET21c- <i>TCI</i> pB (N6S0)-R189C	2nd PCR 産物	pMCB1- <i>TCI</i> pB (N6S0)	NdeI NheI	約900 約7,100	Insert Vector
pET21c- <i>TCI</i> pB (N6S0)-Y348C	2nd PCR 産物	pET21c- <i>TCI</i> pB (N6S0)	NheI csp45I	約700 約7,300	Insert Vector
pET21c- <i>TCI</i> pB (N6S0)-H351C					
pET21c- <i>TCI</i> pB (N6S0)-A390C					
pET21c- <i>TCI</i> pB (N6S0)-1R/A (P2)-2KT/AA	pET21c- <i>TCI</i> pB (N6S0)-1R/A (P2)	pET21c- <i>TCI</i> pB (N6S0)-2KT/AA	NdeI csp45I	約1,600 約6,400	Insert Vecotr
pET21c- <i>TCI</i> pB (N6S0)-1KT/AA-2R/A	pET21c- <i>TCI</i> pB (N6S0)-1KT/AA	pET21c- <i>TCI</i> pB (N6S0)-2R/A			
pET21c- <i>TCI</i> pB (N6S0)-R576C-1R/A	pET21c- <i>TCI</i> pB (N6S0)-1R/A (P2)	pET21c- <i>TCI</i> pB (N6S0)-R576C			
pET21c- <i>TCI</i> pB (N6S0)-A821C-1R/A		pET21c- <i>TCI</i> pB (N6S0)-A821C			
pET21c- <i>TCI</i> pB (N6S0)-R576C-1E/Q-2E/Q	pET21c- <i>TCI</i> pB (N6S0)-1E/Q	pET21c- <i>TCI</i> pB (N6S0)-R576C-2E/Q			
pET21c- <i>TCI</i> pB (N6S0)-A821C-1E/Q-2E/Q		pET21c- <i>TCI</i> pB (N6S0)-A821C-2E/Q			
pET21c- <i>TCI</i> pB (N6S0)-1R/A (P2)-A419C	pET21c- <i>TCI</i> pB (N6S0)-A419C	pET21c- <i>TCI</i> pB (N6S0)-1R/A (P2)	AgeI csp45I	約500 約7,500	Insert Vector
pET21c- <i>TCI</i> pB (N6S0)-A821C-1KT/AA	pET21c- <i>TCI</i> pB (N6S0)-A821C	pET21c- <i>TCI</i> pB (N6S0)-1KT/AA	AatII EcoRI	約600 約7,400	Insert Vector
pET21c- <i>TCI</i> pB (N6S0)-A821C-2KT/AA		pET21c- <i>TCI</i> pB (N6S0)-2KT/AA			
pET21c- <i>TCI</i> pB (N6S0)-A821C-1E/Q		pET21c- <i>TCI</i> pB (N6S0)-1E/Q			
pET21c- <i>TCI</i> pB (N6S0)-A821C-2E/Q		pET21c- <i>TCI</i> pB (N6S0)-2E/Q			
pET21c- <i>TCI</i> pB (N6S0)-R576C-2R/A	pET21c- <i>TCI</i> pB (N6S0)-R576C	pET21c- <i>TCI</i> pB (N6S0)-2R/A	csp45I AatII	約400 約7,600	Insert Vector

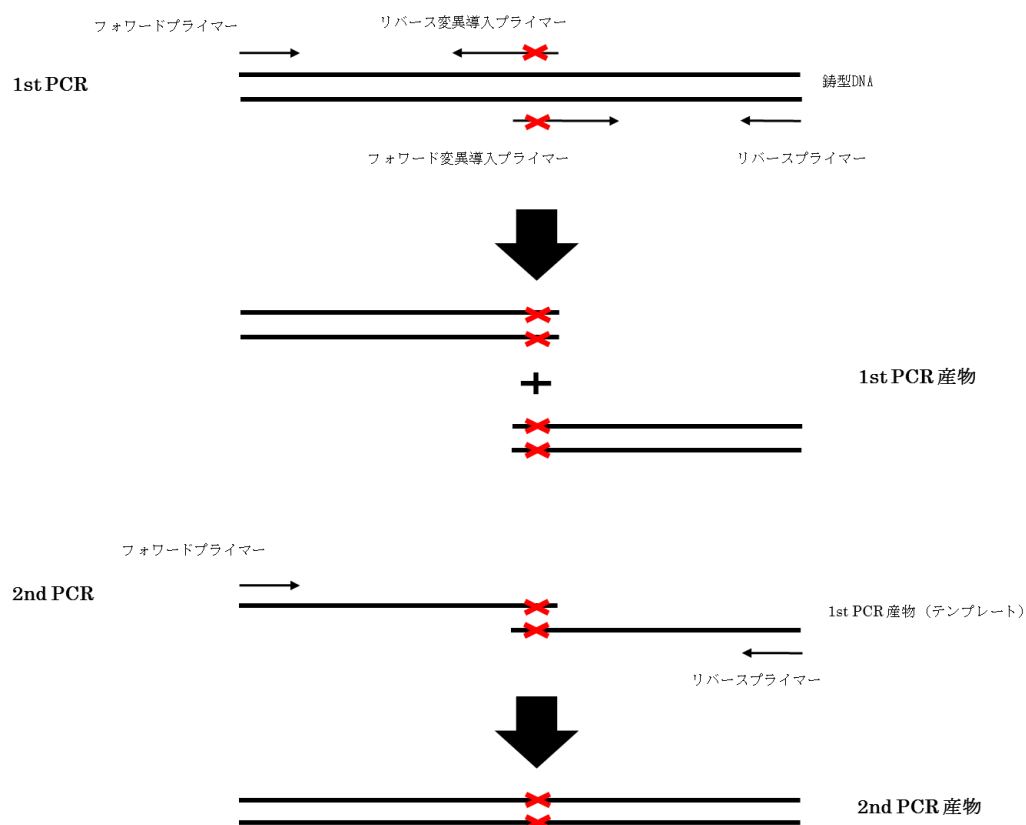


図 2-1. オーバーラップ伸長 PCR 法

フォワードプライマー、リバース変異導入プライマー、鋳型 DNA を組み合わせ、変異導入部分の 5'末端側の配列を、もう一方はリバースプライマー、フォワード変異導入プライマー、鋳型 DNA を組み合わせ、変異導入部分の 3'末端側の配列を増幅する (1st PCR)。2 つの 1st PCR 産物を混合した後、1st PCR で使用したフォワードプライマーとリバースプライマーを使って、全長の変異導入 DNA 断片を増幅する (2nd PCR)。

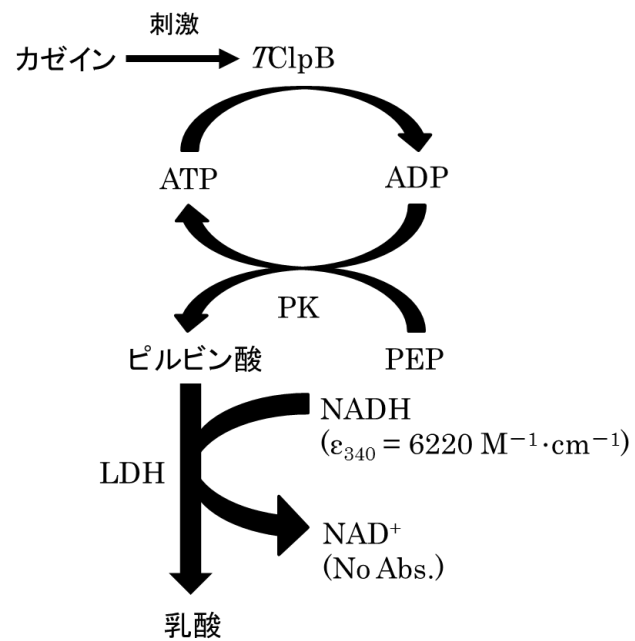


図 2-2. ATP 加水分解活性の測定

PK と LDH によって、TClpB 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. *TClpB* 保存 Arg 残基変異体の解析 (副論文 I)

3-1-1. ヌクレオチド結合能

TClpB の保存 Arg 残基 (R322、R323、R747) は、隣接したサブユニットに結合したヌクレオチドの近傍に位置しているため、その結合に重要である可能性が考えられた。そこで、保存 Arg 残基を Ala 残基に置換した変異体である R322A (1R/A、P2)、R323A (1R/A、P1)、R747A (2R/A) をそれぞれ作製した。AAA-1 の Walker A 変異体 K204A/T205A (1KT/AA) と AAA-2 の Walker A 変異体 K601A/T602A (2KT/AA) では、それぞれ変異を導入した AAA+モジュールへのヌクレオチドの結合が完全に阻害される [22]。そこで、保存 Arg 残基変異体の変異を導入していない方の AAA+モジュールに、Walker A 変異を組み合わせた変異体である 1R/A (P1)-2KT/AA、1R/A (P2)-2KT/AA、1KT/AA-2R/A を作製した。これらの組み合わせ変異体では、保存 Arg 残基変異を導入していない AAA+モジュールのヌクレオチド結合能は、完全に失われているため、保存 Arg 残基変異によるヌクレオチド結合への影響を評価することができる。*TClpB* へのヌクレオチドの結合は、直接検出することができないため、蛍光分子が結合した ATP 類似体である Mant-ADP を用いた。Mant-ADP は *TClpB* に結合すると、蛍光強度が増大するため、Mant-ADP 濃度に対する蛍光強度の上昇の飽和曲線を描くことで、*TClpB* と Mant-ADP の解離定数 K_d を算出することができる。野生型 *TClpB* に Mant-ADP を添加すると、有意な蛍光強度の増大が見られ、Mant-ADP の K_d は $1.00\ \mu\text{M}$ と算出された (図 3-1.A、表 3-1)。1KT/AA、2KT/AA、1R/A (P1)-2KT/AA、1R/A (P2)-2KT/AA、1KT/AA-2R/A でも Mant-ADP の添加による蛍光強度の上昇が見られ、 K_d はそれぞれ $0.30\ \mu\text{M}$ 、 $11.0\ \mu\text{M}$ 、 $14.5\ \mu\text{M}$ 、 $25.8\ \mu\text{M}$ 、 $0.71\ \mu\text{M}$ であった (図 3-1.A、表 3-1)。Mant-ADP を結合した野生型 *TClpB* に、ADP または ATP を加えると、ヌクレオチドの交換が起こり、蛍光強度が減少した。この性質を利用して、ADP または ATP 濃度に対する蛍光強度の減少の飽和曲線を描き、野生型 *TClpB* の ADP または ATP の K_d を算出した (それぞれ $8.08\ \mu\text{M}$ 、 $31.1\ \mu\text{M}$) (図 3-1.B, D、表 3-1)。1KT/AA、2KT/AA、1R/A (P1)-2KT/AA、1R/A (P2)-2KT/AA、1KT/AA-2R/A でも同様の実験を行い、ADP 及び ATP の K_d を算出した (図 3-1.B-E、表 3-1)。その結果、Walker A 変異体と、そこにさらにもう一方のドメインに保存 Arg 残基変異を組み合わせた変異体の、各ヌクレオチドの K_d は、ほぼ同等の値であった (表 3-1)。このことから、3 つの保存 Arg 残基はヌクレオチドの結合に関与しないことが明らかとなった。

3-1-2. ATP 加水分解活性

保存 Arg 残基変異体の ATP 加水分解活性を測定した。3 mM ATP、55°C の条件下で、野生型 *7ClpB* は 60 min^{-1} の速さで ATP を加水分解したのに対し、1R/A (P1)、1R/A (P2)、2R/A はそれぞれ野生型の 19%、17%、3% の加水分解速度であった (図 3-2.A)。カゼイン存在下では、野生型 *7ClpB* の ATP 加水分解活性は 1.7 倍に促進され、保存 Arg 残基変異体でも同等の促進が見られた (図 3-2.A)。また、1KT/AA、2KT/AA の ATP 加水分解活性はそれぞれ 3 min^{-1} 、 1 min^{-1} と大きく低下したが、カゼインによる ATP 加水分解活性の促進は見られた (図 3-2.B)。しかし、保存 Arg 残基変異と Walker A 変異の組み合わせ変異体では、カゼインの有無に関わらず、有意な ATP 加水分解活性は確認されなかった (図 3-2.B)。

3-1-3. 糸通し活性

ClpB と同じ AAA+タンパク質ファミリーに属している *ClpA* は、プロテアーゼ活性を持つ *ClpP* と結合して *ClpAP* 複合体として働く。*ClpA* は不完全な mRNA によって合成された異常なタンパク質のみを選別し、*ClpP* へと送り込み、分解する。*ClpA* の *ClpP* との結合に必要な部分を *ClpB* に移植した BAP は、DnaK システム非存在下でも、モデル変性タンパク質であるカゼインを *ClpP* 内部に送り込み、分解することができる [14, 32]。BAP が *ClpP* 内部に送り込んだ基質タンパク質の分解速度から、BAP の糸通し活性を見積もることが可能である。BAP に保存 Arg 残基変異を導入した変異体、BAP-1R/A (P1)、BAP-1R/A (P2)、BAP-2R/A を作製し、糸通し活性を測定した。BAP の基質タンパク質として、蛍光色素である FITC で過剰にラベルされた α -カゼイン (FITC- α -カゼイン) を用いた。蛍光色素同士が近接した状態にあると、自己消光が起こり、蛍光強度が低下することが知られている。そのため、消光状態の FITC- α -カゼインが *ClpP* によって分解され、蛍光色素同士の距離が離れると、自己消光が解消され、蛍光強度が上昇する (図 3-3.A)。55°C、ATP 存在下で、BAP、及び BAP に保存 Arg 残基変異を組み合わせた変異体のいずれにおいても、FITC- α -カゼインの分解による蛍光の上昇が検出された (図 3-3.B)。BAP、BAP-1R/A (P1)、BAP-1R/A (P2)、BAP-2R/A の FITC- α -カゼイン分解の初速度は、それぞれ 0.14 sec^{-1} 、 0.07 sec^{-1} 、 0.04 sec^{-1} 、 0.05 sec^{-1} で、保存 Arg 残基変異によって糸通し活性が低下した (図 3-3.C)。

3-1-4. 脱凝集活性

ATP と DTT 存在下で G6PDH を熱凝集させ、7DnaK システムと 7ClpB 野生型、及び保存 Arg 残基変異体を加えた。その後、55°C で 90 分間インキュベートし、G6PDH の酵素活性を測定した。野生型 7ClpB は熱凝集 G6PDH を 64%回復させることができたが、1R/A (P1)、1R/A (P2)、2R/A による回復率は、それぞれ 15%、6%、14%であった (図 3-4.A)。また、熱凝集 α -グルコシダーゼを基質タンパク質として用いた場合、野生型 7ClpB は 50%回復させることができたが、1R/A (P1)、1R/A (P2)、2R/A による回復率は、それぞれ 7%、2%、6%であった (図 3-4.B)。

3-1-5. ゲルろ過分析

7ClpB は 55°C、ATP 結合状態、高タンパク質濃度、低塩濃度条件で、安定な 6 量体構造を形成する [17-23]。HPLC ゲルろ過クロマトグラフィーで分析したところ、55°C、ATP 存在下、150 mM KCl 条件下では、野生型 7ClpB、及び 2R/A は 12.4 分に溶出のピークが見られた (図 3-5.A)。しかし、1R/A (P1)、1R/A (P2) は野生型の場合よりもわずかに溶出のピークが遅れ、それぞれ 12.5 分、12.6 分であった (図 3-5.A)。また、7ClpB の 6 量体構造が不安定化する 300 mM KCl 条件下でも、ゲルろ過クロマトグラフィーで分析したところ、野生型、及び 2R/A の溶出ピークは 12.7 分で、150 mM KCl 条件下よりも溶出が少し遅れた (図 3-5.B)。一方、1R/A (P1)、1R/A (P2)の溶出ピークは、それぞれ 13.1 分、13.9 分で、野生型の場合よりも溶出の遅れが大きかった (図 3-5.B)。これらの結果から、AAA-1 の 2 つの保存 Arg 残基は、7ClpB の 6 量体構造の安定化に関わっており、さらにポジション 1 よりもポジション 2 の Arg 残基の方が重要であると考えられる。

3-1-6. ミドルドメインの構造変化の解析

7ClpB が 6 量体構造を形成した際、ミドルドメインは 6 量体リングの外側に張り出している [24, 41]。AAA-1 にヌクレオチドが結合すると、ミドルドメインの Wing-2 は持ち上がり、Wing-1 は AAA-1 に寄り掛かるように動くことが知られている。このヌクレオチド結合に依存する構造変化は、6 量体構造を安定化させる [27]。そこで、1R/A (P2) の 6 量体構造が不安定である原因が、ミドルドメインの構造変化にあるのかを検証した。Wing-2 の先端にある 419 番目の Ala 残基を Cys 残基に置換した変異体 A419C、1KT/AA-A419C、1R/A (P2)-A419C を作製し、Cys 残基を ABD-F でラベルした

(A419-ABD)。ABD-Fはそれ自身が置かれた環境に応じて、大きく蛍光強度が変化する蛍光色素である。150 mM KCl 条件下で ATP を添加すると、A419-ABD の蛍光強度は 46%まで低下した (図 3-6.A,G)。また、1KT/AA-A419-ABD の場合には 80%までしか低下しなかったが (図 3-6.B,G)、1R/A (P2)-A419-ABD では A419-ABD と同等の 49%まで低下した (図 3-6.C,G)。ADP、または ATP γ S を添加した場合でも同様の結果が得られた (図 3-6.A-C,G)。また、6 量体構造が不安定な 300 mM KCl 条件下でも、全体的に蛍光強度は低いですが、同様の結果が得られた (図 3-6.D-F,H)。

3-2. *TClpB* ヘテロ 6 量体の作製及び活性測定 (副論文 II)

3-2-1. サブユニット間連結箇所の探索

TClpB 6 量体の結晶構造はいまだ解かれていないため、6 量体形成時にサブユニット間で近接するアミノ酸残基の詳細な位置関係は分からない。そのため、*TClpB* のサブユニット間で連結可能なほど近接しているアミノ酸残基の組み合わせを、*TClpB* と同じ AAA+タンパク質ファミリーである *ClpC* と *HslU* の 6 量体の結晶構造を基に探索した。*ClpC* はアダプター分子である *MecA* と共に *MecA-ClpC* 6 量体を形成する (図 3-7.A) [48]。 *MecA-ClpC* はさらに *ClpP* プロテアーゼと複合体を形成して、*ClpC* の基質タンパク質を *ClpP* 内部に送り込んで分解する。また、*MecA-ClpC* は、*ClpP* と複合体を形成していない場合は、凝集体を脱凝集することもできる [49]。 *ClpC* は 2 つのスクレオチド結合ドメインである D1 と D2 を持ち (図 3-7.B)、それぞれ *ClpB* の AAA-1 と AAA-2 と高い相同性を持つ [50]。一方、*HslU* は 6 量体を形成し (図 3-8.A)、*HslV* プロテアーゼと複合体を形成して、ATP 依存プロテアーゼとして働く [51]。 *HslU* は I ドメイン、 $\alpha\beta$ ドメイン、 α ヘリックスドメインから成り (図 3-8.B) [52]、 $\alpha\beta$ ドメイン、及び α ヘリックスドメインは、それぞれ *ClpB* の AAA-2 ラージドメイン、及び AAA-2 スモールドメインと高い相同性を持つ [53]。 *ClpC* 6 量体の結晶構造から、隣接するサブユニットの D1 同士で連結可能な 3 組の候補 (E194 と S400、R199 と Y358、R199 と H361) を見出した (図 3-9.A)。 *TClpB* の AAA-1 でこれらのアミノ酸残基に相当する 3 組は、Q184 と A390、R189 と Y348、R189 と H351 であった (図 3-9.B)。これらのアミノ酸残基を Cys 残基に置換した変異体である Q184C、R189C、Y348C、H351C、A390C をそれぞれ作製した。一方、*HslU* の立体構造情報を用いた探索は、当研究室の中村が行った [54]。 *HslU* 6 量体の結晶構造から、サブユニット界面に位置する連結候補のアミノ酸残基 (I29、R36、L40、L358、T361、S407、Y408) を見出した (図 3-10.A)。 *TClpB* の AAA-2 でこれらのアミノ酸残基に相当するアミノ酸側鎖 (図 3-10.B) を Cys 残基に置換した変異体である R568C、D572C、R576C、L581C、R776C、E779C、A821C、Q822C をそれぞれ作製した。

3-2-2. サブユニット間ジスルフィド結合の形成とその確認

作製した AAA-1 連結変異体、及び AAA-2 連結変異体がジスルフィド結合により連結 2 量体を形成するのを確認した。各変異体を特定の組み合わせで等モル混合し、ATP 存在下・非存在下で酸化した後、非還元条件下で SDS-PAGE にかけた。その結果、全ての組み合わせで、200~250 kDa 付近にシフトアップしたバンドが現れた (図

3-11.A-C)。7ClpB 野生型は Cys 残基を持たないため、このバンドは連結 2 量体である。AAA-1 連結変異体の場合は、ATP 非存在下の Q184C と A390C の組み合わせが (図 3-11.A)、AAA-2 連結変異体の場合では、ATP 存在下の R576C と A821C の組み合わせが (図 3-11.B,C)、最もシフトアップしたバンドの割合が多くなった。次に、このバンドが Q184C と A390C、または R576C と A821C のヘテロ 2 量体であることを確認するために、連結変異体をそれぞれ単独で酸化した。その結果、混合して酸化した場合とは異なる位置にバンドが見られたことから (図 3-11.A,D)、Q184C と A390C、R576C と A821C をそれぞれ組み合わせた場合に生じるバンドはヘテロ 2 量体であることが分かった。また、Q184C と A390C、及び R576C と A821C のヘテロ 2 量体のバンドを定量したところ、それぞれ 86%、94%であった。以後、Q184C と A390C のヘテロ 2 量体を D1 ダイマー、R576C と A821C のヘテロ 2 量体を D2 ダイマーと呼ぶ。

3-2-3. D1 ダイマー、D2 ダイマーのゲルろ過分析

55°C、ATP 存在下、150 mM KCl 条件下で、野生型 7ClpB は 12.6 分、D1 ダイマー、及び D2 ダイマーは 12.5 分に溶出のピークが見られ、いずれも安定な 6 量体を形成していることが分かった (図 3-12.A)。ランニングバッファーの塩濃度を 500 mM KCl に増やした場合、野生型の溶出ピークは大きく遅れ、13.2 分であった (図 3-12.A)。ところが、D1 ダイマー、D2 ダイマーの場合は、いずれも 12.8 分で、野生型の場合ほど溶出は遅れなかった (図 3-12.A)。バッファー中の塩濃度が 800 mM KCl の場合では、野生型の溶出ピークが 13.7 分でさらに遅れたが、D1 ダイマー、D2 ダイマーではわずかに遅れず、いずれも 12.9 分であった (図 3-12.A)。

3-2-4. D1 ダイマー、D2 ダイマーの ATP 加水分解活性

D1 ダイマーと D2 ダイマーの ATP 加水分解活性を、還元剤である TCEP 存在下・非存在下で 55°C で測定した。非還元条件下での野生型 7ClpB、D1 ダイマー、D2 ダイマーの ATP 加水分解活性は、それぞれ 46 min^{-1} 、 36 min^{-1} 、 27 min^{-1} であった (図 3-12.B)。一方、還元条件下では、野生型の ATP 加水分解活性は 49 min^{-1} で、非還元条件下とほぼ同等であった (図 3-12.B)。しかし、D1 ダイマーの場合は 50 min^{-1} 、D2 ダイマーでは 17 min^{-1} で、非還元条件下の場合と異なる活性を示した (図 3-12.B)。

3-2-5. D1 ダイマー、D2 ダイマーの脱凝集活性

還元・非還元条件下で、熱凝集 α -グルコシダーゼを基質タンパク質として、D1 ダイマーと D2 ダイマーの脱凝集活性を測定した。還元条件下で、TClpB 野生型は熱凝集 α -グルコシダーゼの活性を 46%回復させ、D1 ダイマーと D2 ダイマーはそれぞれ 41%、29%回復させることができた (図 3-12.C)。一方、非還元条件下では、野生型、D1 ダイマー、D2 ダイマーは熱凝集 α -グルコシダーゼをそれぞれ 34%、19%、25%回復させた (図 3-12.C)。また、基質タンパク質として熱凝集 IPMDH を用いた場合、還元条件下で、TClpB 野生型、D1 ダイマー、D2 ダイマーはそれぞれ 50%、44%、38%の回復率であった (図 3-12.D)。一方、非還元条件下では、野生型、D1 ダイマー、D2 ダイマーは熱凝集 IPMDH をそれぞれ 48%、32%、34%回復させた (図 3-12.D)。いずれの条件においても、D1 ダイマーと D2 ダイマーは、野生型の 55%以上の脱凝集活性を示した (図 3-12.C,D)。

3-2-6. TClpB ヘテロ 6 量体のヌクレオチド結合能

ヌクレオチドの結合にサブユニット間で協同性があるのかを調べるために、Walker A 変異である K204A/T205A (以後 1A と呼ぶ) と K601A/T602A (以後 2A と呼ぶ) を導入したヘテロ 2 量体を作製した (表 3-2)。例えば、1A 変異サブユニットと 1A と 2A の両変異を持つサブユニット (以後 12A と呼ぶ) から成る D1 ダイマーは、Q184C/1A と A390C/12A、または Q184C/12A と A390C/1A の組み合わせで酸化することで作製できる (それぞれ 1A*12A_{D1}、12A*1A_{D1} と呼ぶ)。同様に、Q184C/1A と A390C/1A を混合して酸化することで、1A*1A_{D1} を作製した。1A*12A_{D1} または 12A*1A_{D1} から成る 6 量体の AAA-2 リング内には、野生型ドメインと Walker A 変異ドメインが交互に並んだ状態になっている。一方、1A*1A_{D1} から成る 6 量体では、全ての AAA-2 が野生型ドメインである。もし、AAA-2 へのヌクレオチドの結合がサブユニット間で協同的であるならば、1A*12A_{D1} または 12A*1A_{D1} へのヌクレオチドの親和性は、1A*1A_{D1} への親和性と大きく異なることが予想される。蛍光ヌクレオチド Mant-ADP との親和性 K_d は、ヘテロ 6 量体に Mant-ADP を加えた際の蛍光強度の上昇を、Mant-ADP の濃度に対してプロットし、式 (11) でフィッティングすることで算出した。1A*1A_{D1} の K_d は 0.87 μ M で、12A*1A_{D1} (2.7 μ M) 及び 1A*12A_{D1} (2.3 μ M) の K_d と同等であった (図 3-13.A、表 3-3)。一方、2A*2A_{D1} (12 μ M) の K_d も、12A*2A_{D1} (16 μ M) 及び 2A*12A_{D1} (12 μ M) と同等であった (図 3-13.A、表 3-3)。ADP または ATP の K_d は、ヘテロ 6 量体と Mant-ADP を共存させた溶液に、ADP または ATP を加え、その蛍光強度の減少を、ADP または ATP の濃度に対してプロットし、式 (28) でフィッティングすることで算

出した。その結果、ADP、及び ATP の親和性は Mant-ADP の親和性よりも低いが、 $1A*1A_{D1}$ は $12A*1A_{D1}$ と $1A*12A_{D1}$ 、 $2A*2A_{D1}$ は $12A*2A_{D1}$ と $2A*12A_{D1}$ の K_d 値と同等であった (図 3-14.A,C、図 3-15.A,C、表 3-3)。また、D2 ダイマーを用いた場合でも、D1 ダイマーの場合と K_d 値は異なるが、同様の傾向が見られた (図 3-13.B,D、図 3-14.B,D、図 3-15.B,D、表 3-3)。以上の結果から、TClpB はサブユニットごとに独立してヌクレオチドを結合することが分かった。次に、ヌクレオチド結合能を測定した D1 ダイマー、及び D2 ダイマーをゲルろ過 HPLC にかける、安定な 6 量体を形成しているのかを確認した。 $1A*12A_{D1}$ 、 $12A*1A_{D1}$ 、 $2A*12A_{D1}$ 、 $2A*12A_{D2}$ は、6 量体の分子量よりも大きな位置に溶出したが、それ以外のダイマーは、6 量体相当の位置に溶出した (図 3-16)。

3-2-7. Walker A 変異を含む TClpB ヘテロ 6 量体の ATP 加水分解活性

単一の Walker A 変異を含むヘテロ 6 量体である $1A*W$ 、 $W*1A$ 、 $1A*1A$ 、 $2A*W$ 、 $W*2A$ 、 $2A*2A$ を作製し (表 3-2)、それらの ATP 加水分解活性を測定した。 $1A*1A_{D1}$ 、 $2A*2A_{D1}$ の ATP 加水分解活性は、それぞれ 4.6 min^{-1} 、 0.6 min^{-1} で、いずれも $W*W_{D1}$ の 15% 以下の活性であった (図 3-17.A)。D2 ダイマーを用いた場合でも同様に、 $1A*1A_{D2}$ 、 $2A*2A_{D2}$ は、 $W*W_{D2}$ の 15% 以下の ATP 加水分解活性であった (図 3-17.A)。また、野生型と Walker A 変異サブユニットから成るヘテロ 6 量体である $1A*W_{D1}$ 、 $2A*W_{D1}$ 、 $W*2A_{D1}$ 、 $1A*W_{D2}$ 、 $W*1A_{D2}$ 、 $2A*W_{D2}$ の ATP 加水分解活性は、 $W*W$ の活性の 1.8~18% であった (図 3-17.A)。この活性は、Walker A 変異サブユニットのみから成る 6 量体の活性と同等か、わずかに高かった (図 3-17.A)。一方で、 $W*1A_{D1}$ と $W*2A_{D2}$ は、例外的に野生型の 34% と 33% の ATP 加水分解活性を示した (図 3-17.A)。この値はそれぞれ $1A*1A_{D1}$ の約 3 倍、 $2A*2A_{D2}$ の約 2 倍に相当する (図 3-17.A)。また、ATP 加水分解活性を測定した Walker A 変異を含む D1 ダイマー、及び D2 ダイマーをゲルろ過 HPLC にかけた結果、 $W*1A_{D1}$ のみが 6 量体よりも大きな分子量に相当する位置に溶出のピークが見られたが、それ以外のダイマーは、6 量体相当の位置に溶出した (図 3-16)。

3-2-8. 保存 Arg 残基変異を含む TClpB ヘテロ 6 量体の ATP 加水分解活性

保存 Arg 残基変異である R322A (以後 1R と呼ぶ) と R747A (以後 2R と呼ぶ) を導入したヘテロ 2 量体を作製し (表 3-2)、それらの ATP 加水分解活性を測定した。 $1R*1R_{D1}$ 、 $1R*1R_{D2}$ 、 $2R*2R_{D1}$ 、 $2R*2R_{D2}$ の ATP 加水分解活性は、それぞれ 6.0 min^{-1} 、

0.3 min^{-1} 、 1.2 min^{-1} 、 5.9 min^{-1} で、いずれも W*W の活性の 22%以下であった (図 3-17.B)。野生型と保存 Arg 残基変異サブユニットから成るヘテロ 6 量体のほとんど ($1R^*W_{D1}$ 、 W^*1R_{D1} 、 $2R^*W_{D1}$ 、 W^*2R_{D1} 、 $1R^*W_{D2}$ 、 W^*1R_{D2} 、 W^*2R_{D2}) は、W*W の活性の 1.0 ~ 33%の ATP 加水分解活性を示した (図 3-17.B)。唯一例外的に、 $2R^*W_{D2}$ は W*W の 54%の活性を示した (図 3-17.B)。また、保存 Arg 残基変異を含む D1 ダイマー、及び D2 ダイマーをゲルろ過 HPLC にかけた結果、全てのダイマーで 6 量体相当の位置に溶出のピークが見られた (図 3-16)。

3-2-9. Walker B 変異を含む *TClpB* ヘテロ 6 量体の ATP 加水分解活性

AAA-1 の Walker B 変異体 E271Q (以後 1B と呼ぶ)、AAA-2 の Walker B 変異体 E668Q (以後 2B と呼ぶ) は、変異を導入した AAA+モジュールで ATP の加水分解が完全に阻害される [22]。これらの Walker B 変異を導入したヘテロ 2 量体を作製し (表 3-2)、ATP 加水分解活性を測定した。 $1B^*1B_{D1}$ 、 $1B^*1B_{D2}$ 、 $2B^*2B_{D1}$ 、 $2B^*2B_{D2}$ の ATP 加水分解活性は、それぞれ 45 min^{-1} 、 30 min^{-1} 、 45 min^{-1} 、 14 min^{-1} で、W*W に近い活性を示したが、 $2B^*2B_{D2}$ の活性は $2B^*2B_{D1}$ の活性よりも有意に低かった (図 3-17.C)。また、野生型と単一の Walker B 変異サブユニットから成るいずれのヘテロ 6 量体も ($1B^*W$ 、 W^*1B 、 $2B^*W$ 、 W^*2B)、W*W と同等の ATP 加水分解活性 (W*W の 66~110%) を示した (図 3-17.C)。 $12B^*12B$ は、6 量体中の全ての AAA+モジュールに Walker B 変異が導入されているため、ATP 加水分解活性は示さなかった (図 3-17.D)。 $12B$ と野生型から成るヘテロ 6 量体 ($12B^*W$ 、 W^*12B) の ATP 加水分解活性は、野生型に対して大きく低下した (W*W の 20~32%) (図 3-17.D)。この 6 量体は、両方のリング内に ATP を加水分解できないドメインを 3 つずつ含んでいるため、野生型ドメインの数は 6 個で、野生型 6 量体のちょうど半分になっている。もし、各リング内で ATP の加水分解が協同的でないならば、 $12B$ と野生型から成るヘテロ 6 量体の ATP 加水分解活性は、野生型の半分になると考えられる。しかし、このヘテロ 6 量体は W*W の活性の半分以下であったことから (図 3-17.D)、*TClpB* 6 量体は一方、あるいは両方のリング内で ATP を協同的に加水分解すると考えられる。各リング内の協同性の有無を明確にするために、単一 Walker B 変異体と二重 Walker B 変異体から成るヘテロ 6 量体 ($12B^*1B$ 、 $1B^*12B$ 、 $12B^*2B$ 、 $2B^*12B$) の ATP 加水分解活性を測定した。その結果、これらのヘテロ 6 量体の ATP 加水分解活性は、W*W の活性の 14%以下であった (図 3-17.D)。すなわち、AAA-1、または AAA-2 のみでしか ATP を加水分解できない $2B^*2B$ (W*W の 53~123%)、または $1B^*1B$ (W*W の 119~126%) に、それぞれ 1B、または 2B 変異ドメインをさらに 3 つ並び入れると、大きく活性が低下した。このことから、*TClpB* 6 量体のそれぞれのリング内では、ATP を協同的に加水分解することが分かった。

Walker B 変異を含む D1 ダイマー、及び D2 ダイマーをゲルろ過 HPLC にかけた結果、全てのダイマーで 6 量体相当の位置に溶出のピークが見られた (図 3-16)。

3-2-10. Walker A 変異を含む TClpB ヘテロ 6 量体の脱凝集活性

熱凝集 α -グルコシダーゼを基質タンパク質として、Walker A 変異を含む D1 ダイマーと D2 ダイマーの脱凝集活性を測定した。Walker A 変異を含むいずれの TClpB ヘテロ 6 量体でも、熱凝集 α -グルコシダーゼをほとんど脱凝集できなかった (W*W の 1.1~3.9%) (図 3-18.A)。また、基質タンパク質が熱凝集 IPMDH の場合でも、ほぼ同様の結果が得られた (W*W の 3.7~6.5%) (図 3-18.B)。

3-2-11. 保存 Arg 残基変異を含む TClpB ヘテロ 6 量体の脱凝集活性

1R*1R と 2R*2R は、熱凝集 α -グルコシダーゼ、及び熱凝集 IPMDH をほとんど回復させることができなかった (W*W の 0.6~26%) (図 3-18.C,D)。野生型と保存 Arg 残基変異サブユニットから成る 6 量体の、両基質タンパク質の脱凝集活性は、W*W の 6~46% で、部分的に回復させることはできたが、W*W の半分には至らなかった (図 3-18.C,D)。

3-2-12. Walker B 変異を含む TClpB ヘテロ 6 量体の脱凝集活性

基質タンパク質として熱凝集 α -グルコシダーゼを用いた場合、1B*1B と 2B*2B の脱凝集効率は W*W の活性の 20~40%であった (図 3-18.E)。野生型と単一 Walker B 変異サブユニットから成る 6 量体では、W*W の活性の 60~85%回復させることができた。この活性は、W*W と 1B*1B、または W*W と 2B*2B のほぼ中間的な値であった (図 3-18.E)。また、12B*12B は熱凝集 α -グルコシダーゼをほとんど脱凝集できず (W*W の 1.1~1.4%)、そこに野生型サブユニットを半分組み込んだ 6 量体である 12B*W と W*12B でも、わずかしき脱凝集できなかった (W*W の 3.2~6.6%) (図 3-18.E)。熱凝集 IPMDH を基質とする場合、熱凝集 α -グルコシダーゼの場合よりも全体的に脱凝集活性は高くなるが、同様の傾向が見られた (図 3-18.F)。

表 3-1. *TClpB* 変異体の各ヌクレオチドの解離定数

<i>TClpB</i>	K_d for Mant-ADP (μM)	K_d for ADP (μM)	K_d for ATP (μM)
Wild-type	1.00 \pm 0.09	8.08 \pm 0.17	31.1 \pm 1.7 ^a
1KT/AA	0.30 \pm 0.15	4.36 \pm 0.07	30.7 \pm 0.4 ^a
2KT/AA	11.0 \pm 1.1	9.44 \pm 0.55	56.4 \pm 15.9 ^a
1R/A (P1)-2KT/AA	14.5 \pm 0.4	13.5 \pm 5.1	133 \pm 73
1R/A (P2)-2KT/AA	25.8 \pm 4.9	41.2 \pm 24.5	96.4 \pm 26.6
1KT/AA-2R/A	0.71 \pm 0.13	8.34 \pm 0.37	81.9 \pm 29.6

Mant-ADP の K_d は、図 3-1.A のデータを *TClpB* 単量体と Mant-ADP が 1:1 で結合するモデル (式 11) でフィッティングすることで求めた。ADP と ATP の K_d は、図 3-1.B-E のデータを ADP、または ATP が Mant-ADP と競争的に結合するモデル (式 28) でフィッティングすることで求めた。独立した実験を 3 回行い、標準偏差を示した。a は *TClpB* が ATP 加水分解活性を持つため、 K_d の下限値を示す。

表 3-2. 作製した *TClpB* 連結 2 量体

Name	Mutation	Diagram	Name	Mutation	Diagram
W*W	W*W _{D1}		W*1B	W*1B _{D1}	
	W*W _{D2}			W*1B _{D2}	
W*1A	W*1A _{D1}		1B*W	1B*W _{D1}	
	W*1A _{D2}			1B*W _{D2}	
1A*W	1A*W _{D1}		1B*1B	1B*1B _{D1}	
	1A*W _{D2}			1B*1B _{D2}	
1A*1A	1A*1A _{D1}		W*2B	W*2B _{D1}	
	1A*1A _{D2}			W*2B _{D2}	
W*2A	W*2A _{D1}		2B*W	2B*W _{D1}	
	W*2A _{D2}			2B*W _{D2}	
2A*W	2A*W _{D1}		2B*2B	2B*2B _{D1}	
	2A*W _{D2}			2B*2B _{D2}	
2A*2A	2A*2A _{D1}		W*12B	W*12B _{D1}	
	2A*2A _{D2}			W*12B _{D2}	
1A*12A	1A*12A _{D1}		12B*W	12B*W _{D1}	
	1A*12A _{D2}			12B*W _{D2}	
12A*1A	12A*1A _{D1}		12B*12B	12B*12B _{D1}	
	12A*1A _{D2}			12B*12B _{D2}	
2A*12A	2A*12A _{D1}		1B*12B	1B*12B _{D1}	
	2A*12A _{D2}			1B*12B _{D2}	
12A*2A	12A*2A _{D1}		12B*1B	12B*1B _{D1}	
	12A*2A _{D2}			12B*1B _{D2}	
W*1R	W*1R _{D1}		2B*12B	2B*12B _{D1}	
	W*1R _{D2}			2B*12B _{D2}	
1R*W	1R*W _{D1}		12B*2B	12B*2B _{D1}	
	1R*W _{D2}			12B*2B _{D2}	
1R*1R	1R*1R _{D1}				
	1R*1R _{D2}				
W*2R	W*2R _{D1}				
	W*2R _{D2}				
2R*W	2R*W _{D1}				
	2R*W _{D2}				
2R*2R	2R*2R _{D1}				
	2R*2R _{D2}				

アスタリスクは連結された 2 つのサブユニット間のジスルフィド結合を意味する。それぞれの *TClpB* 連結 2 量体が、6 量体を形成した際の変異ドメインの位置を図で示した。図では変異を導入したドメインをグレーで示し、Walker A 変異を A、Walker B 変異を B、保存 Arg 残基変異を R で示した。

表 3-3. D1 ダイマー、D2 ダイマーの各ヌクレオチドの解離定数

<i>TClpB</i>	K_d for Mant-ADP (μM)	K_d for ADP (μM)	K_d for ATP (μM) ^a
W*W _{D1}	2.8 \pm 0.6	17 \pm 2	93 \pm 34
1A*1A _{D1}	0.87 \pm 0.17	7.8 \pm 0.8	58 \pm 1
12A*1A _{D1}	2.7 \pm 1.2	16 \pm 2	120 \pm 8
1A*12A _{D1}	2.3 \pm 1.1	19 \pm 3	180 \pm 30
2A*2A _{D1}	12 \pm 5	9.1 \pm 2.0	100 \pm 38
12A*2A _{D1}	16 \pm 3	17 \pm 7	330 \pm 86
2A*12A _{D1}	12 \pm 5	18 \pm 12	140 \pm 66
W*W _{D2}	3.0 \pm 1.2	16 \pm 1	80 \pm 9
1A*1A _{D2}	1.6 \pm 1.0	12 \pm 1	110 \pm 16
12A*1A _{D2}	3.2 \pm 0.7	17 \pm 3	170 \pm 23
1A*12A _{D2}	2.2 \pm 1.1	21 \pm 3	140 \pm 54
2A*2A _{D2}	47 \pm 15	20 \pm 6	180 \pm 68
12A*2A _{D2}	33 \pm 4	15 \pm 3	180 \pm 64
2A*12A _{D2}	33 \pm 9	17 \pm 1	250 \pm 69

Mant-ADP の K_d は、図 3-13 のデータを *TClpB* 単量体と Mant-ADP が 1:1 で結合するモデル (式 11) でフィッティングすることで求めた。ADP と ATP の K_d は、図 3-14、図 3-15 のデータを ADP、または ATP が Mant-ADP と競争的に結合するモデル (式 28) でフィッティングすることで求めた。独立した実験を 3~5 回行い、標準偏差を示した。a は *TClpB* が ATP 加水分解活性を持つため、 K_d の下限値を示す。

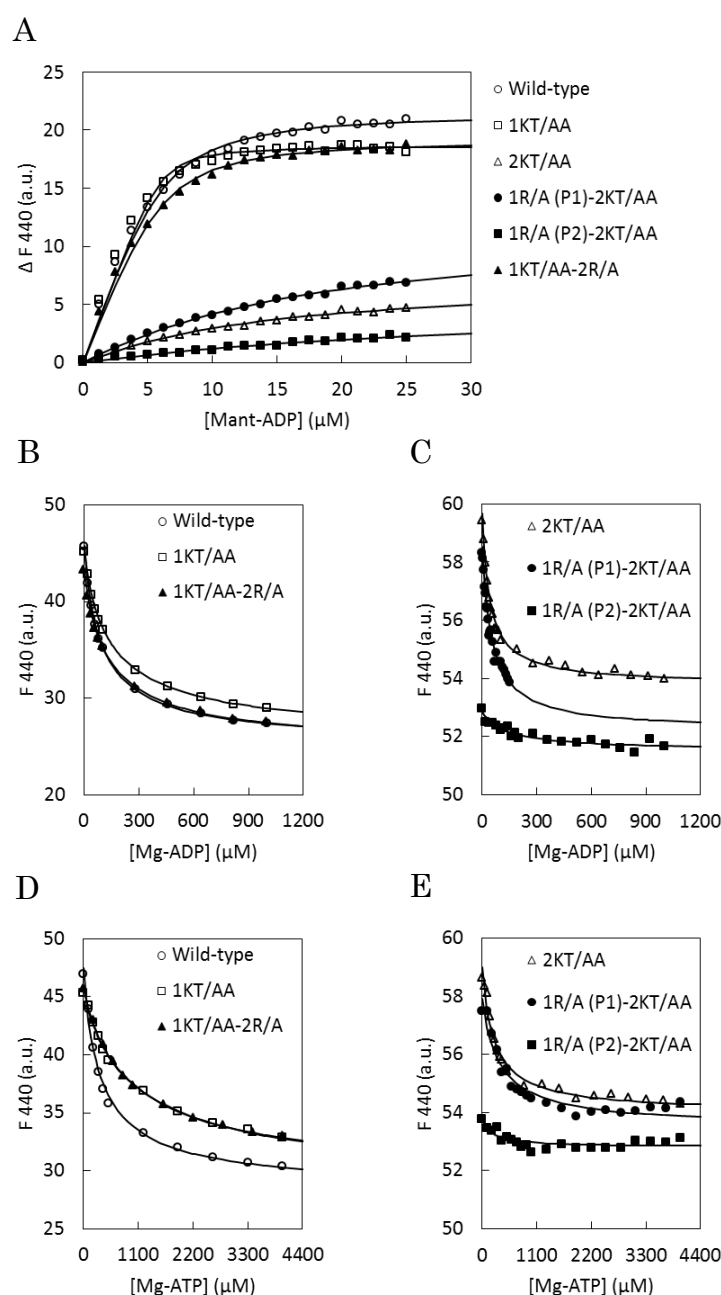


図 3-1. 保存 Arg 残基変異体への Mant-ADP の結合と ADP または ATP の置換滴定

A) 55°C でインキュベートした 1 μ M TClpB に、様々な濃度になるように Mant-ADP を逐次添加していき、その都度、励起波長 360 nm における 440 nm の蛍光強度を測定した。その蛍光強度から、Mant-ADP のみの蛍光強度を差し引いた値を Mant-ADP の濃度に対してプロットし、式 (11)を用いてフィッティングした。B-E) 1 μ M TClpB と 12.5 μ M (B,D)、または 35 μ M (C,E) の Mant-ADP を含む溶液を 55°C でインキュベートし、様々な濃度になるように Mg-ADP (B,C)、または Mg-ATP (D,E) を逐次添加した。その都度、励起波長 360 nm における 440 nm の蛍光強度を測定し、その蛍光強度を Mg-ADP または Mg-ATP の濃度に対してプロットし、式 (28)を用いてフィッティングした。

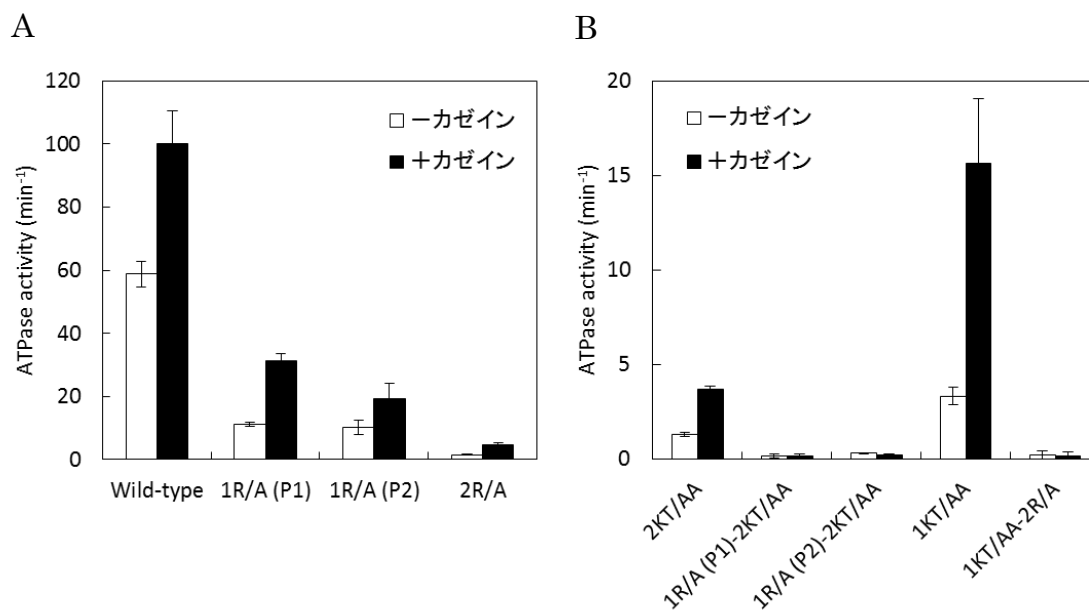


図 3-2. 保存 Arg 残基変異体の ATP 加水分解活性

55°C、3 mM ATP 条件下、0.1 mg・mL⁻¹ κ-カゼイン存在下・非存在下で、*TClpB* 野生型、あるいはその変異体の ATP 加水分解活性を測定した。野生型 *TClpB* と保存 Arg 残基変異体は、*TClpB* 濃度 0.05 μM (A)、Walker A 変異を持つ変異体は 0.25 μM (B) で測定した。ATP 加水分解活性は、*TClpB* 単量体のターンオーバー数で示した。独立した測定を 3 回行い、標準偏差をエラーバーとして示した。

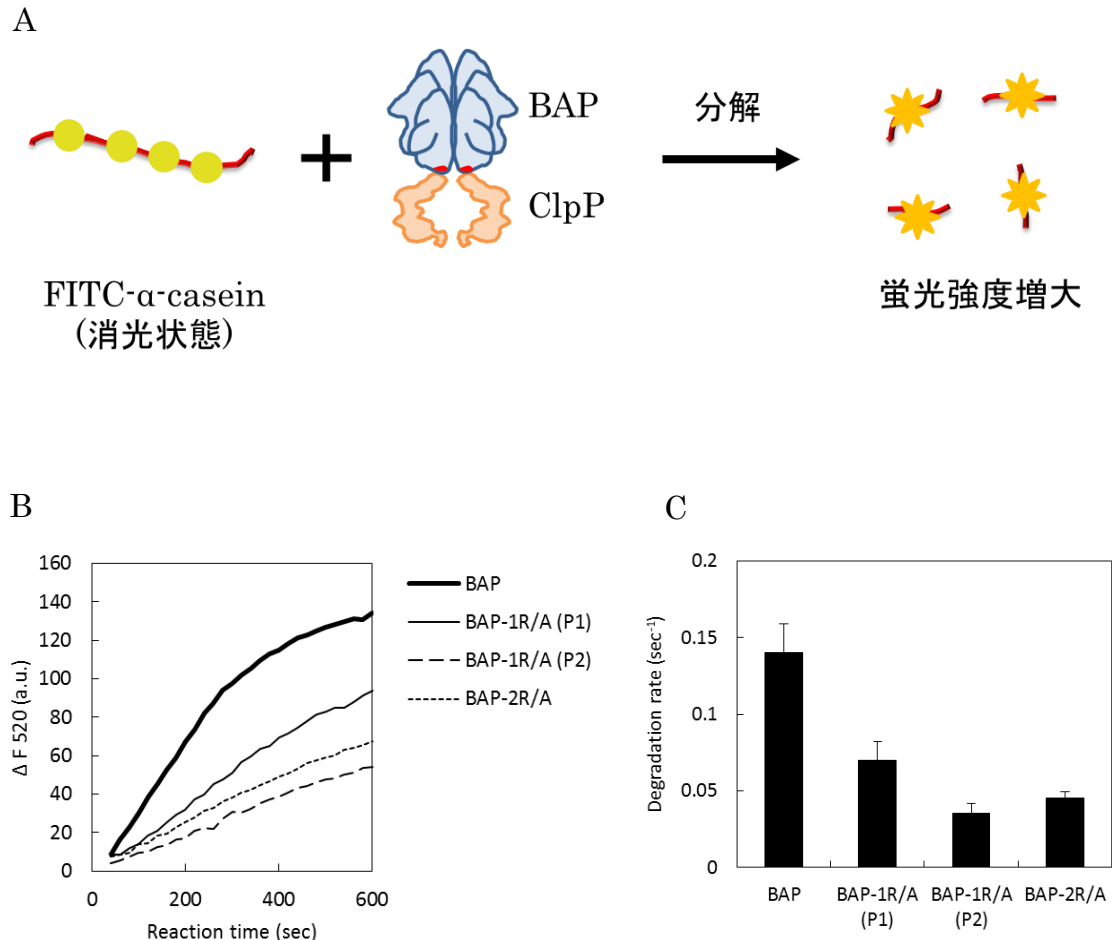


図 3-3. 保存 Arg 残基変異体の糸通し活性

A) 糸通し活性測定の原理。FITC で過剰にラベルされた α -カゼイン (FITC- α -カゼイン) は、蛍光分子同士が近接しているため、消光を起こす。FITC- α -カゼインが BAP-ClpP によって分解され、蛍光分子同士が離れると、消光が解消され、蛍光強度が増大する。そのため、FITC- α -カゼインの分解を蛍光強度の増大として検出することができる。B) 3 μ M FITC- α -カゼインを、0.05 μ M BAP、0.5 μ M 7ClpP、3 mM ATP 存在下で、55°C でインキュベートし、励起波長 490 nm における 520 nm の蛍光強度の時間変化を測定した。C) FITC- α -カゼインの分解の初速度を、BAP 6 量体のターンオーバー数で示した。独立した測定を 3 回行い、標準偏差をエラーバーとして示した。

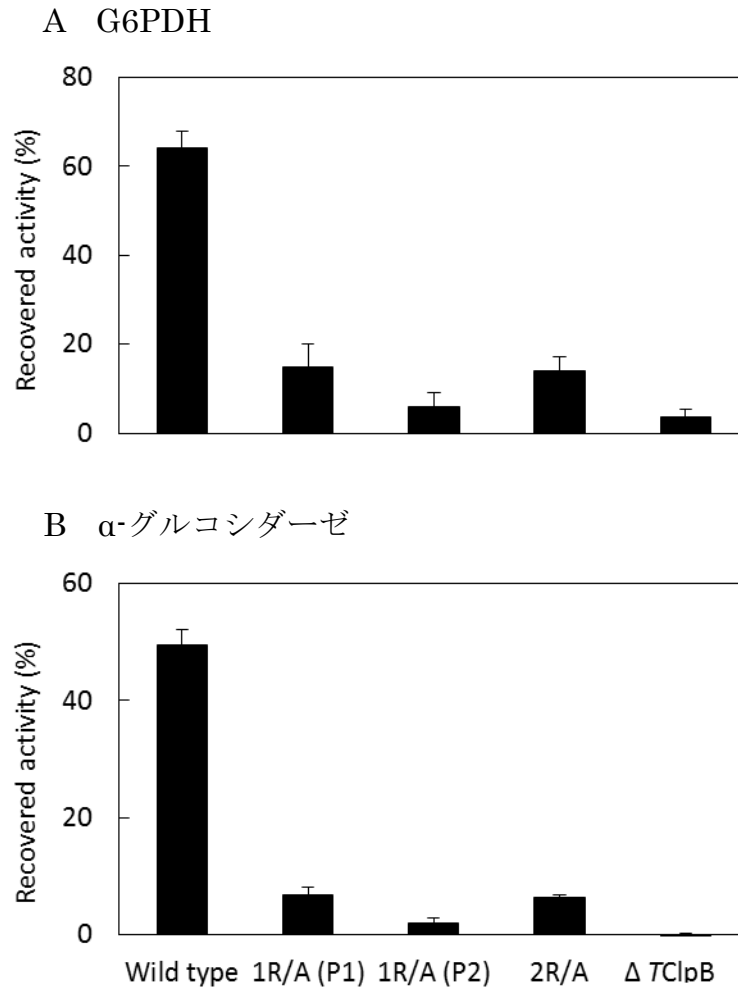


図 3-4. 保存 Arg 残基変異体の脱凝集活性

A) 0.2 μM G6PDH、3 mM ATP、1 mM DTT を含む溶液を、72°C で 8 分間インキュベートし、7DnaK システム (0.6 μM 7DnaK、0.2 μM 7DnaJ、0.1 μM 7GrpE) と TClpB 野生型、あるいはその変異体 (0.05 μM) を加えた。55°C で 90 分間インキュベートした後、反応溶液中の G6PDH の酵素活性を測定した。縦軸は G6PDH の回復率で、熱処理前の酵素活性を 100%とした相対値で示した。B) 0.2 μM α-グルコシダーゼ、3 mM ATP、1 mM DTT を含む溶液を、73°C で 10 分間インキュベートし、7DnaK システム (0.6 μM 7DnaK、0.2 μM 7DnaJ、0.1 μM 7GrpE) と TClpB 野生型、あるいはその変異体 (0.05 μM) を加えた。55°C で 90 分間インキュベートした後、反応溶液中の α-グルコシダーゼの酵素活性を測定した。縦軸は α-グルコシダーゼの回復率で、熱処理前の酵素活性を 100%とした相対値で示した。独立した測定を 3 回行い、標準偏差をエラーバーとして示した。

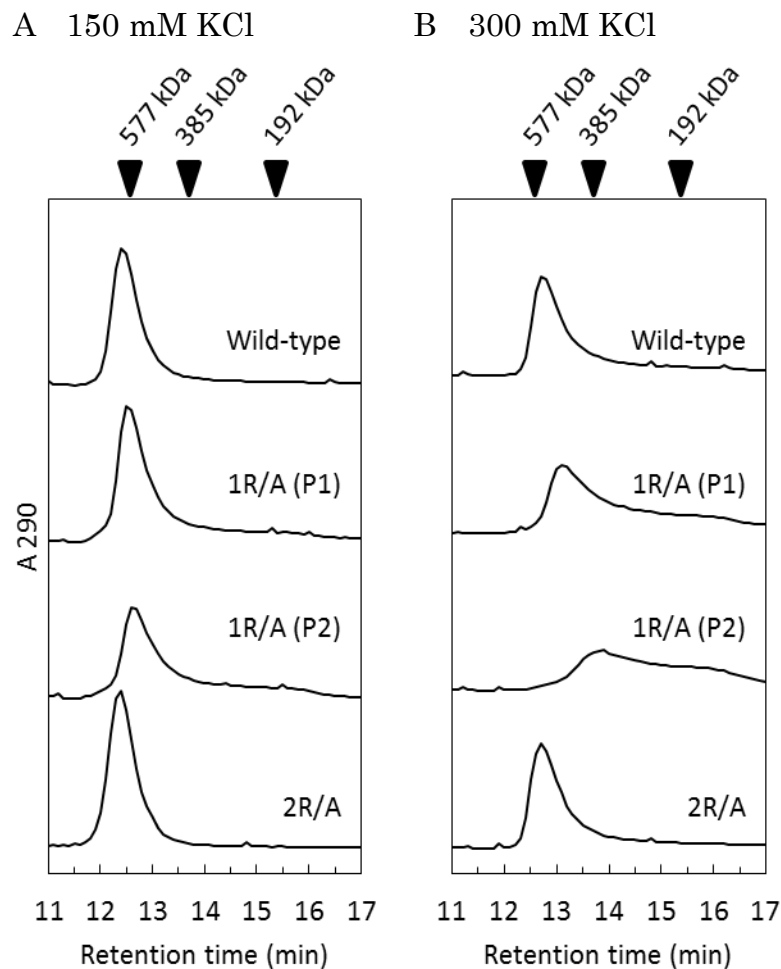


図 3-5. 保存 Arg 残基変異体のゲルろ過分析

50 mM MOPS-NaOH, pH 7.5、150 mM (A)、または 300 mM (B) の KCl、5 mM MgCl_2 、2 mM ATP から成るランニングバッファーで平衡化したゲルろ過カラム TSK G3000SWXL に、 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ の *TClpB* 100 μL をアプライし、 55°C 、 $0.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ で溶出させた。*TClpB* の溶出は、290 nm の吸光度で検出した。分子量マーカーから計算した *TClpB* 6 量体 (577 kDa)、4 量体 (385 kDa)、2 量体 (192 kDa) の溶出ピークの位置を矢尻で示した。

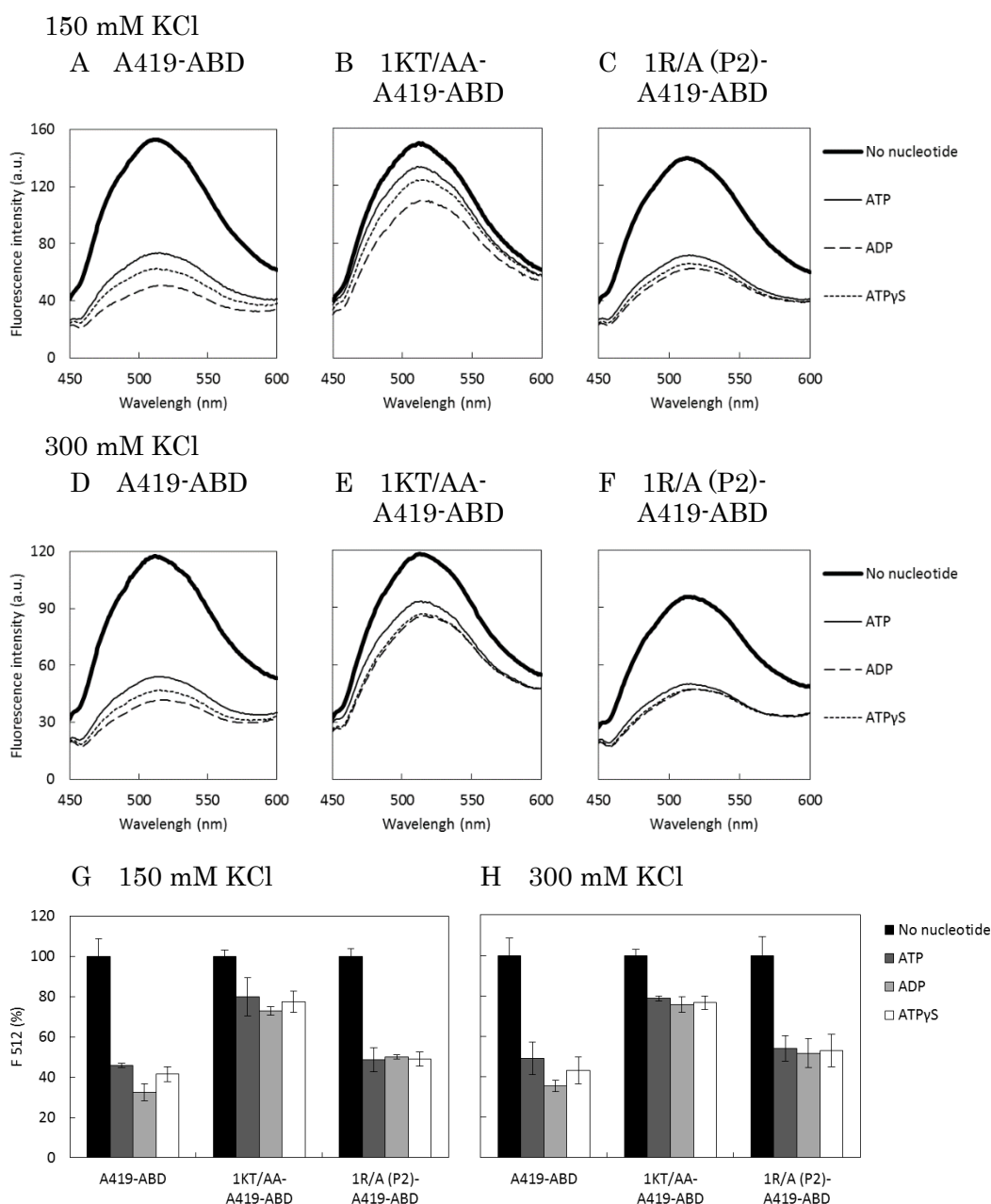


図 3-6. 保存 Arg 残基変異体のヌクレオチド依存的なミドルドメインの構造変化

A-F) $0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ の ABD-F でラベルされた *T*ClpB 変異体、A419-ABD (A,D)、1KT/AA-A419-ABD (B,E)、1R/A (P2)-A419-ABD (C,F) を、ATP、ADP または ATPyS 存在下、ヌクレオチド非存在下で 55°C 、2 分間インキュベートした後、励起波長 390 nm における蛍光スペクトルを測定した。(A-C) は反応溶液中の塩濃度が 150 mM KCl の場合、(D-F) は 300 mM KCl の場合の結果を示す。G,H) 励起波長 390 nm における 512 nm の各ヌクレオチド存在下の蛍光強度を、ヌクレオチド非存在下のときの値を 100% とした相対値で示した。(G) は反応溶液中の塩濃度が 150 mM KCl の場合、(H) は 300 mM KCl の場合の結果を示す。独立した 3 回の実験を行い、標準偏差をエラーバーとして示した。

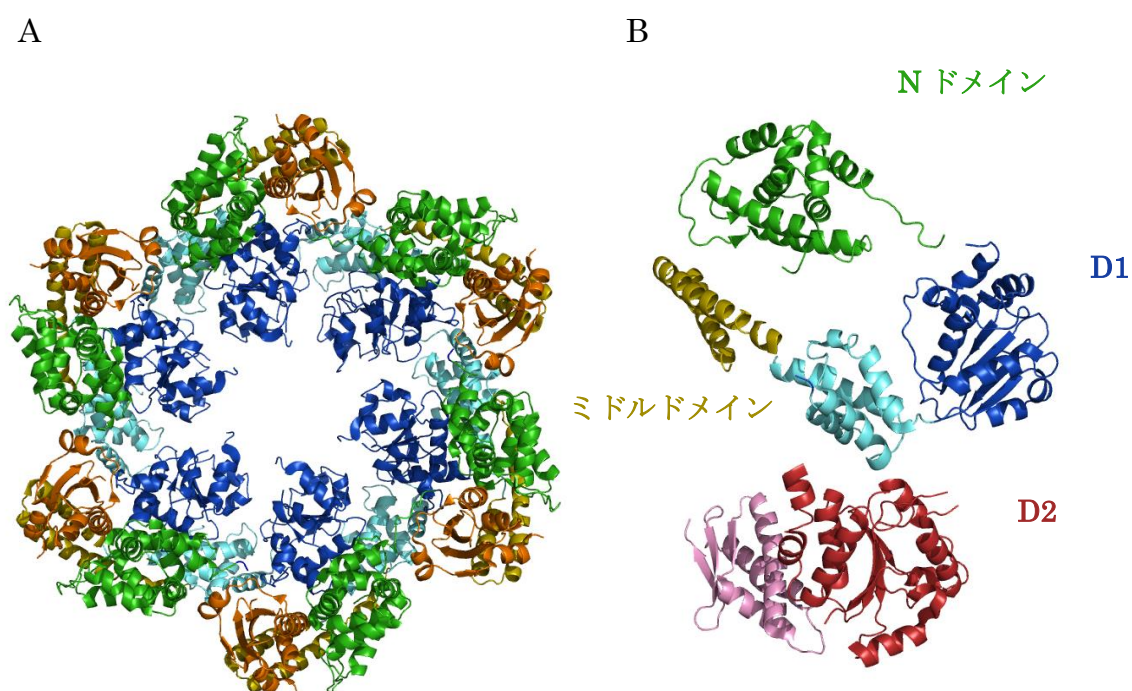
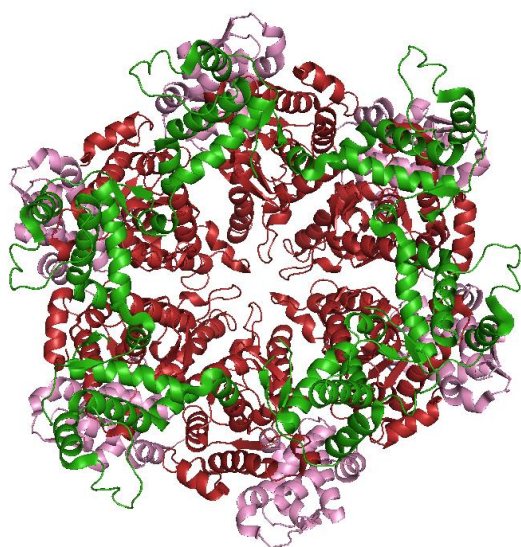


図 3-7. 枯草菌由来 ClpC の立体構造

(A) MecA-ClpC 複合体の 6 量体立体構造モデル (PDB: 3PXG)、及び (B) ClpC 単量体の立体構造モデル (PDB: 3PXI) [55]。N ドメインを緑、D1 ラージドメインを青、D1 スモールドメインをシアン、ミドルドメインを黄、D2 ラージドメインを赤、D2 スモールドメインをピンク、MecA を橙で示した。

A



B



図 3-8. 大腸菌由来 HslU の立体構造

(A) HslU 6 量体の立体構造モデル (PDB: 1DO0)、及び (B) HslU 単量体の立体構造モデル (PDB: 1DO0) [52]。αβ ドメインを赤、I ドメインを緑、α ヘリックスドメインをピンクで示した。

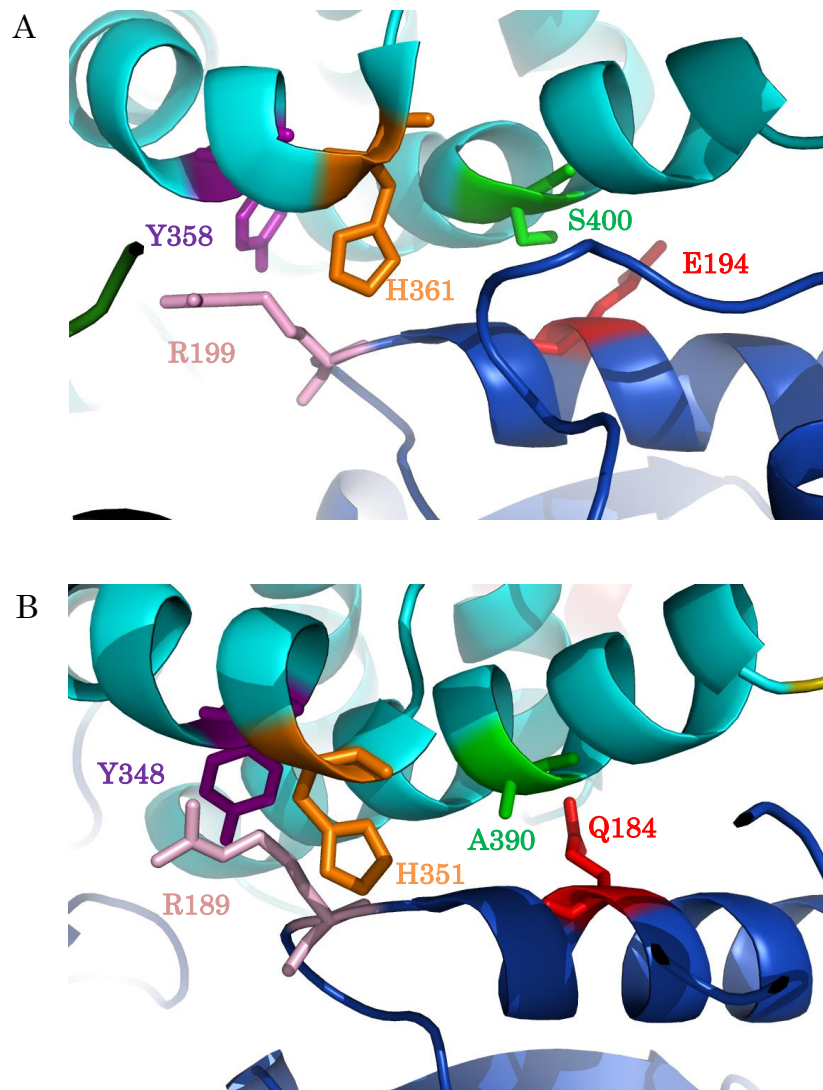


図 3-9. ClpC と ClpB のサブユニット界面

A) ClpC の D1 ドメインのサブユニット界面の構造、及び B) ClpB の AAA-1 のサブユニット界面の構造。異なるサブユニットの D1 ドメイン、及び AAA-1 を青とシアンで示し、連結のための Cys 残基導入場所の候補となるアミノ酸をスティックで表示した。ClpC の E194 を赤、R199 をピンク、Y358 を紫、H361 を橙、S400 を緑で示した。また、*T*ClpB において、ClpC と相同な候補のアミノ酸を同じ色で示した。

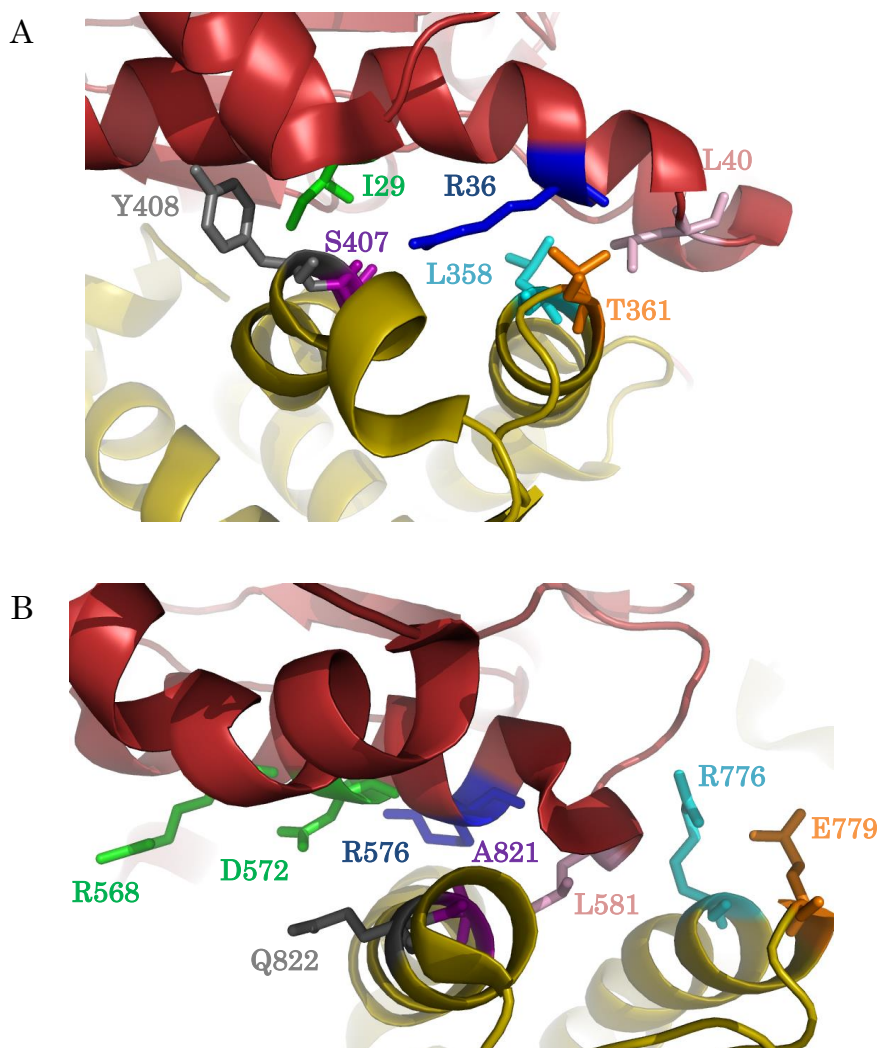


図 3-10. HslU と ClpB のサブユニット界面

A) HslU の $\alpha\beta$ ドメインと隣接するサブユニットの α ヘリックスドメインの界面の構造。B) ClpB の AAA-2 間のサブユニット界面の構造。HslU の $\alpha\beta$ ドメインを赤、隣接するサブユニットの α ヘリックスドメインを黄で示した。また、ClpB の異なるサブユニットの AAA-2 を赤と黄で示した。いずれも連結のための Cys 残基導入場所の候補となるアミノ酸をスティックで表示した。HslU の I29 を緑、R36 を青、L40 をピンク、L358 をシアン、T361 を橙、S407 を紫、Y408 をグレーで示した。また、*T*ClpB において、HslU と相同な候補のアミノ酸を同じ色で示した。

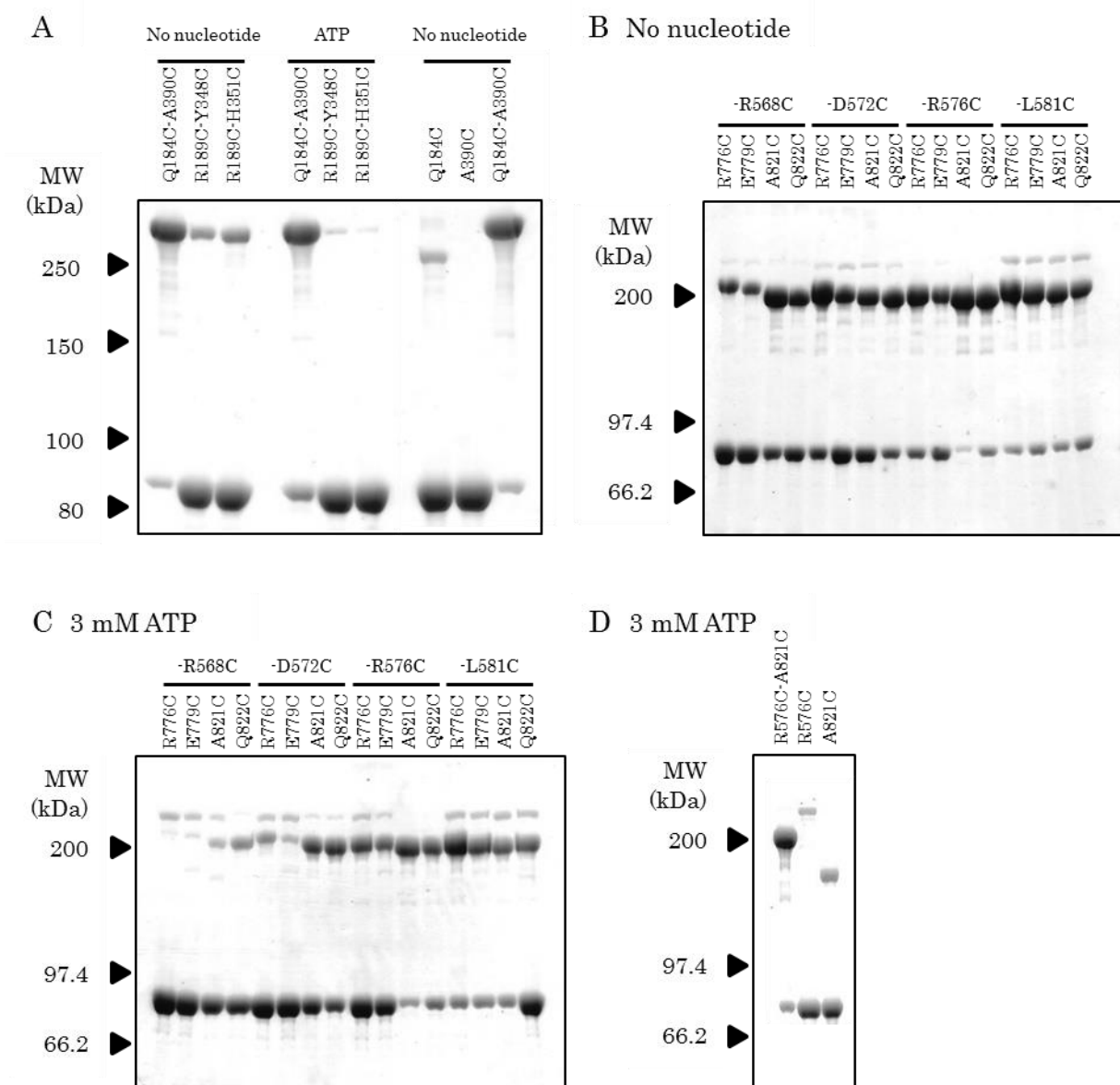


図 3-11. *TClpB* 連結変異体のサブユニット間ジスルフィド結合形成の確認

様々な組み合わせで *TClpB* 連結変異体を等モル混合し、3 mM ATP 存在下・非存在下で、50 μ M CuCl_2 を添加し、55°C で 60 分間インキュベートした。また、Q184C、A390C、R576C、A821C に関しては、それぞれ単独でもインキュベートした。反応後、2-メルカプトエタノール非存在下で SDS-PAGE にかける (6% アクリルアミドゲル)、CBB で染色した。(A) は AAA-1 連結変異体、(B-D) は AAA-2 連結変異体 [54] の場合の電気泳動図を示した。

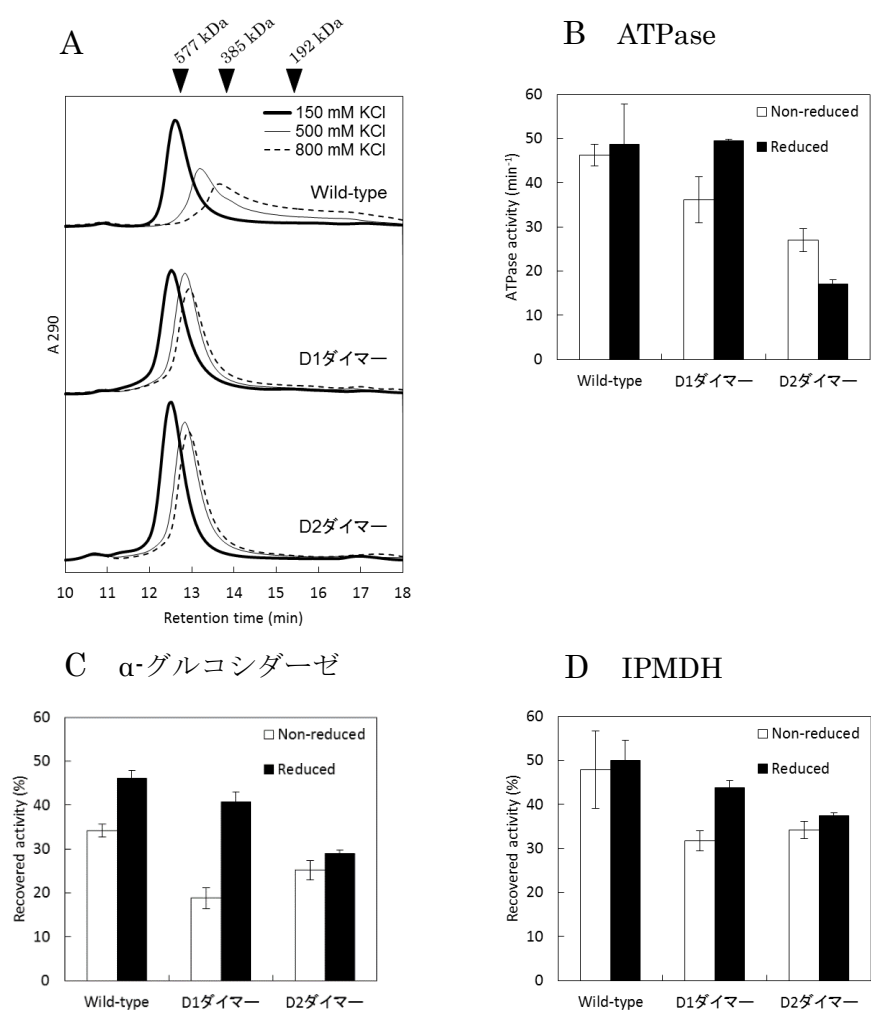


図 3-12. D1 ダイマー、D2 ダイマーの性質

A) 150 mM、500 mM、または 800 mM KCl を含むランニングバッファー (50 mM MOPS-NaOH, pH 7.5、5 mM MgCl₂、2 mM ATP) で平衡化したゲルろ過カラム TSK G3000SWXL に、1 mg・mL⁻¹ の TClpB 100 μL をアプライし、55°C、0.5 mL・min⁻¹ で溶出させた。TClpB の溶出は、290 nm の吸光度で検出した。B) 55°C、3 mM ATP、0.05 μM TClpB、5 mM TCEP 存在下・非存在下で、TClpB の ATP 加水分解活性を測定した。ATP 加水分解活性は、TClpB 単量体のターンオーバー数で示した。C,D) 5 mM TCEP 存在下・非存在下で、0.2 μM の α-グルコシダーゼ (C)、または IPMDH (D) と 3 mM ATP を含む溶液を、73°C で 10 分間 (C)、または 89°C で 30 分間 (D) インキュベートし、TDnaK システム (0.6 μM TDnaK、0.2 μM TDnaJ、0.1 μM TGrpE) と TClpB (0.05 μM) を加えた。55°C で 90 分間 インキュベートした後、反応溶液中の酵素活性を測定した。縦軸は酵素活性の回復率で、熱処理前の酵素活性を 100% とした相対値で示した。(B-D) は独立した測定を 3 回行い、標準偏差をエラーバーとして示した。

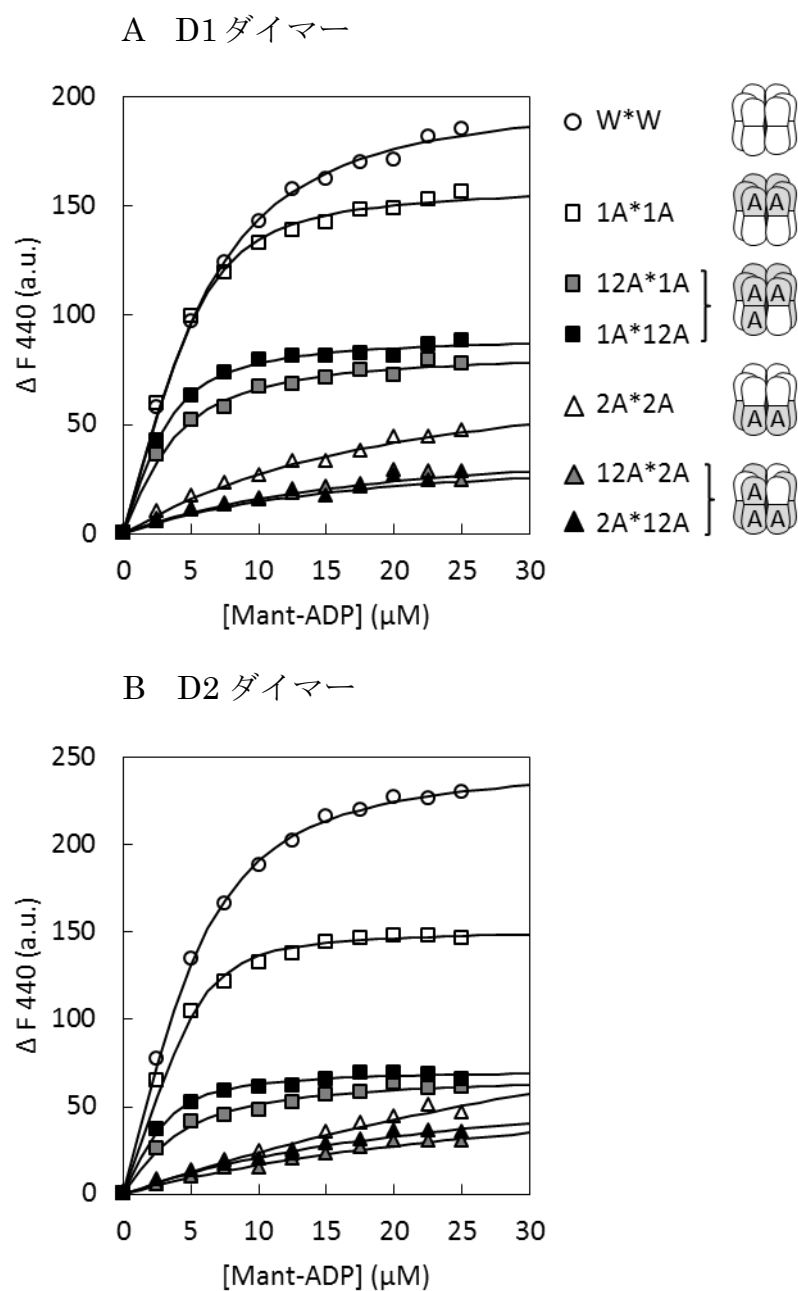


図 3-13. D1 ダイマー、D2 ダイマーへの Mant-ADP の結合

55°C でインキュベートした 1 μM の D1 ダイマー (A)、または D2 ダイマー (B) に、様々な濃度になるように Mant-ADP を逐次添加していき、その都度、励起波長 360 nm における 440 nm の蛍光強度を測定した。その蛍光強度から、Mant-ADP のみの蛍光強度を差し引いた値を Mant-ADP の濃度に対してプロットし、式 (11) を用いてフィッティングした。

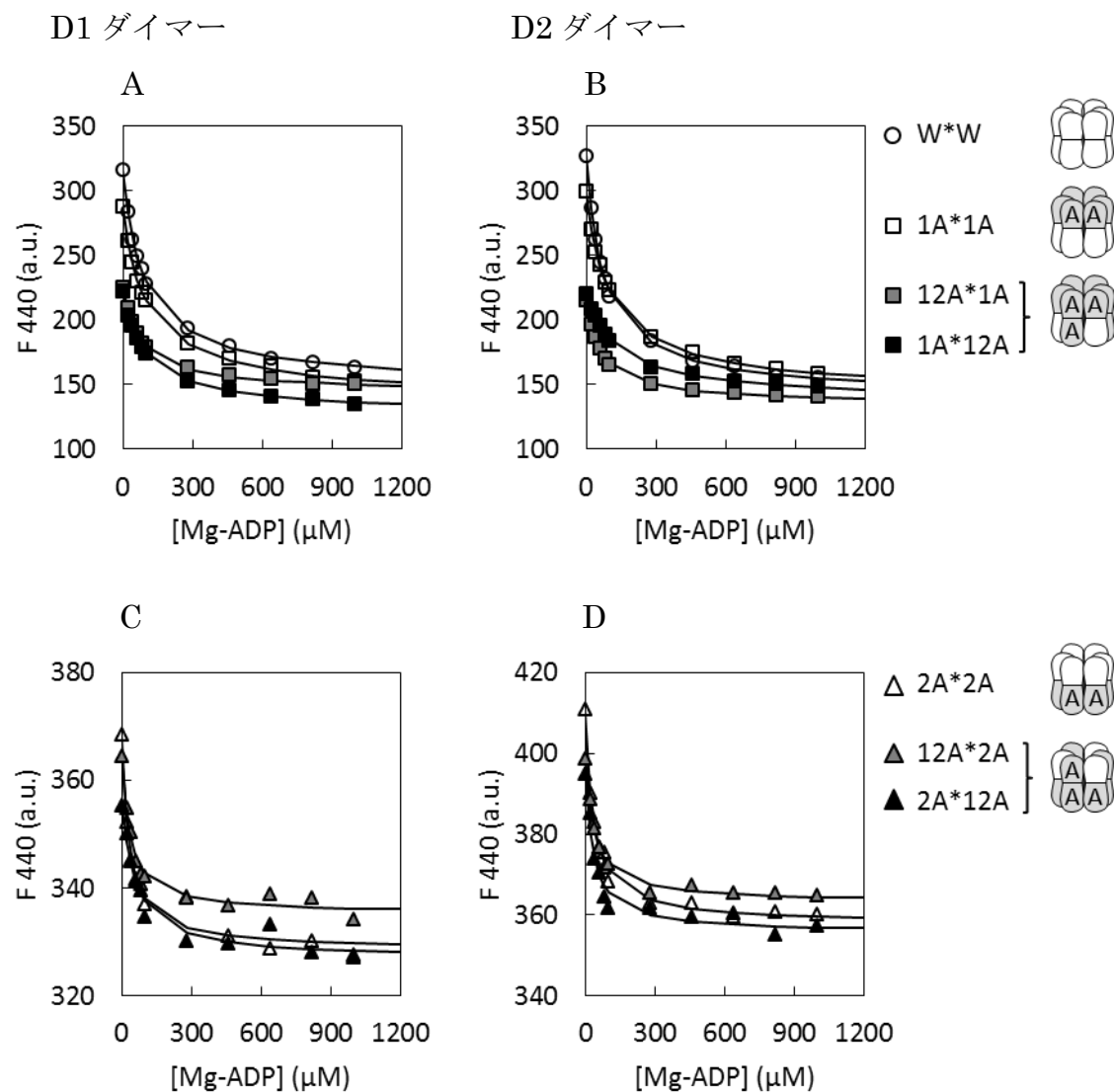


図 3-14. D1 ダイマー、D2 ダイマーの Mant-ADP に対する ADP の置換滴定

1 μM の D1 ダイマー(A,C)、または D2 ダイマー (B,D) と、12.5 μM (A,C)、または 35 μM (B,D) の Mant-ADP を含む溶液を 55°C でインキュベートし、様々な濃度になるように Mg-ADP を逐次添加した。その都度、励起波長 360 nm における 440 nm の蛍光強度を測定し、その蛍光強度を Mg-ADP の濃度に対してプロットし、式 (28)を用いてフィッティングした。

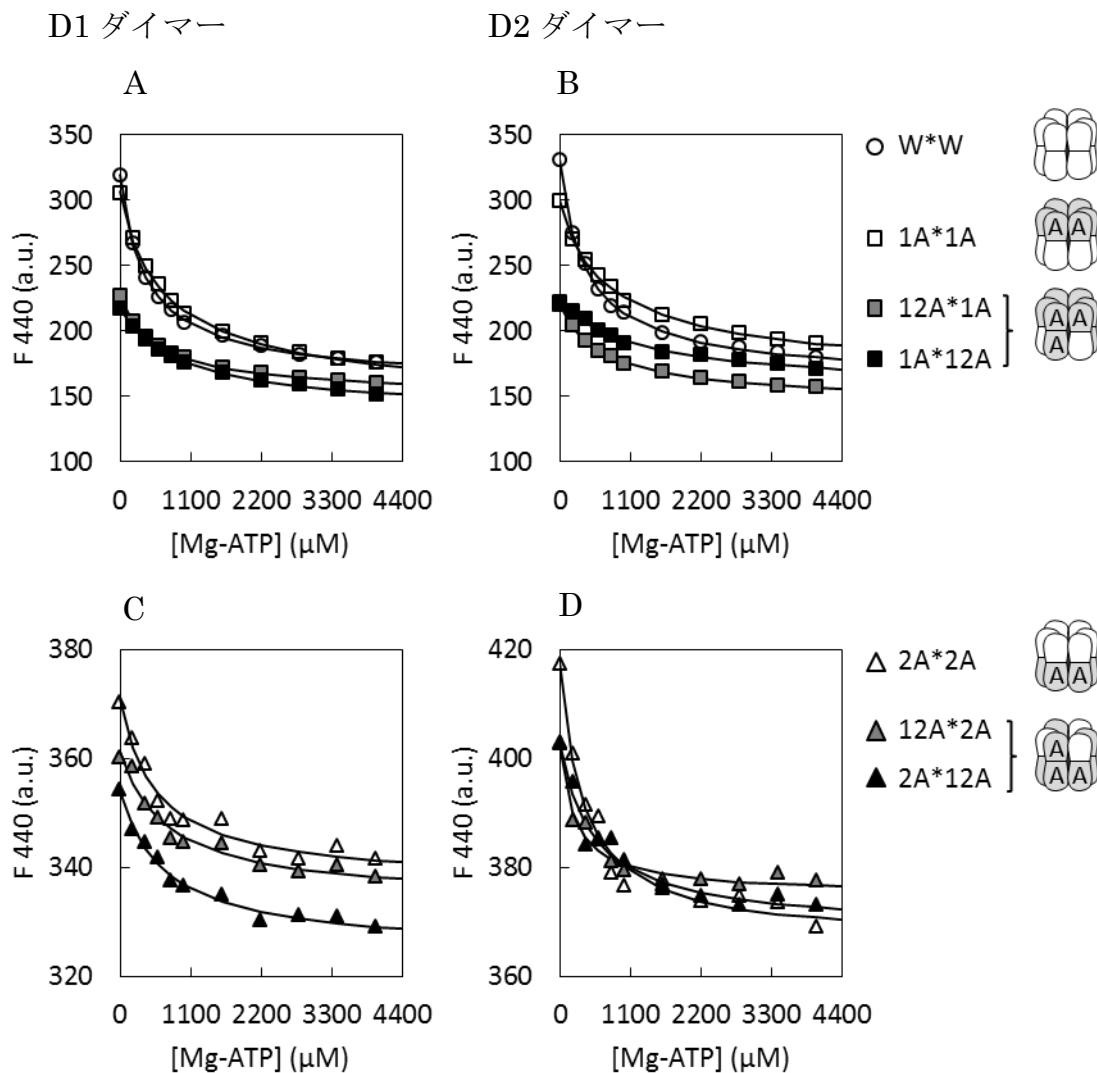


図 3-15. D1 ダイマー、D2 ダイマーの Mant-ADP に対する ATP の置換滴定

1 μM の D1 ダイマー (A,C)、または D2 ダイマー (B,D) と、12.5 μM (A,C)、または 35 μM (B,D) の Mant-ADP を含む溶液を 55°C でインキュベートし、様々な濃度になるように Mg-ATP を逐次添加した。その都度、励起波長 360 nm における 440 nm の蛍光強度を測定し、その蛍光強度を Mg-ATP の濃度に対してプロットし、式 (28)を用いてフィッティングした。

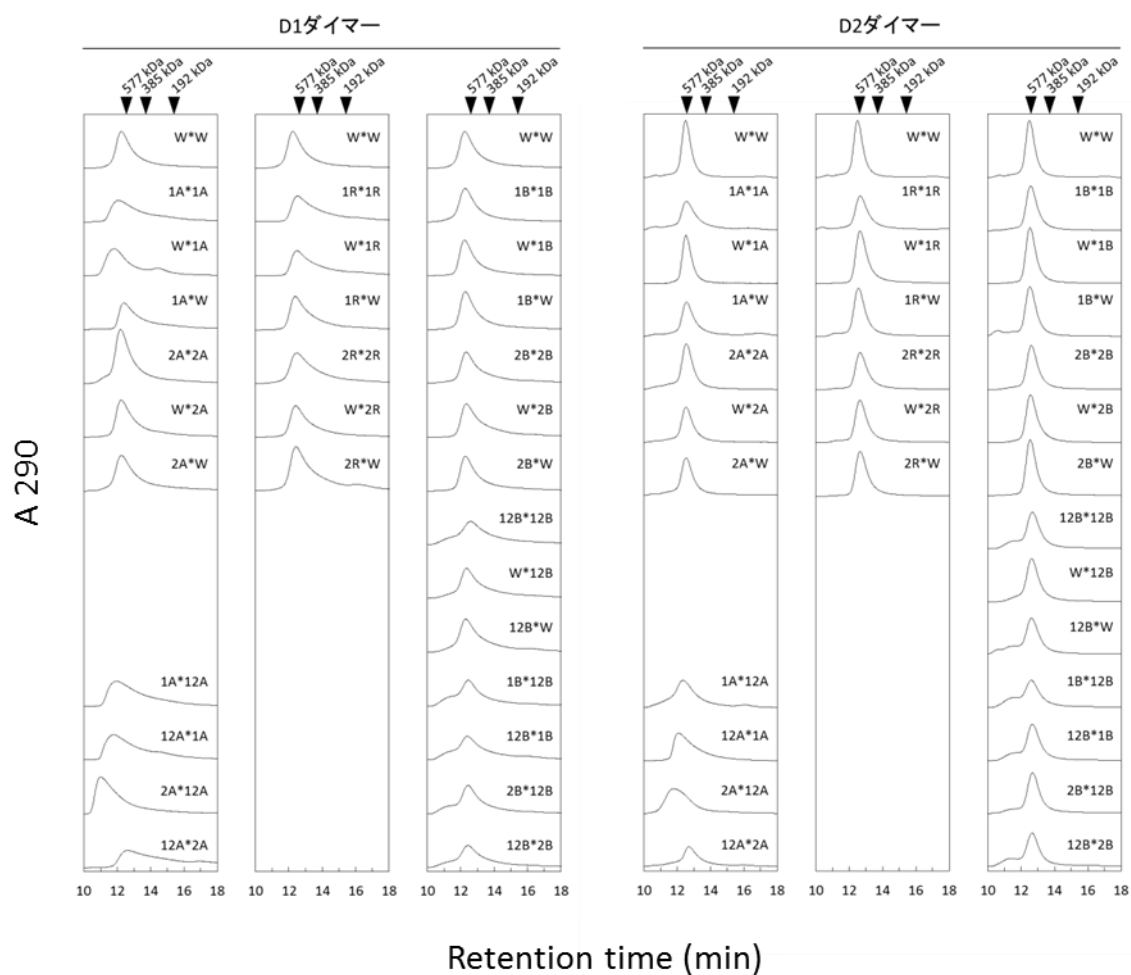


図 3-16. D1 ダイマー、D2 ダイマーのゲルろ過分析

50 mM MOPS-NaOH, pH 7.5、150 mM KCl、5 mM MgCl₂、2 mM ATP から成るランニングバッファーで平衡化したゲルろ過カラム TSK G3000SWXL に、1 mg・mL⁻¹ の *TCI*pB 100 μL をアプライし、55°C、0.5 mL・min⁻¹ で溶出させた。*TCI*pB の溶出は、290 nm の吸光度で検出した。分子量マーカーから計算した *TCI*pB 6 量体 (577 kDa)、4 量体 (385 kDa)、2 量体 (192 kDa) の溶出ピークの位置を矢尻で示した。

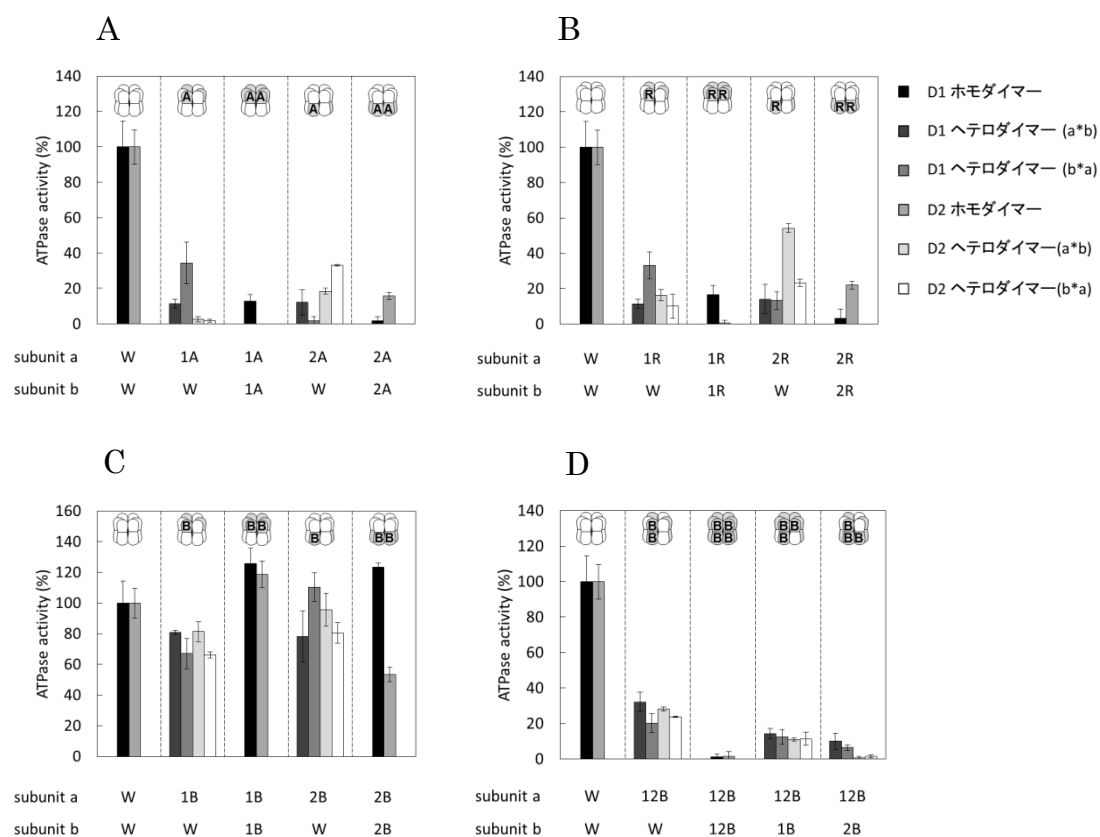


図 3-17. D1 ダイマー、D2 ダイマーの ATP 加水分解活性

55°C、3 mM ATP、0.05 μ M *TClpB* 条件下で、*TClpB* の ATP 加水分解活性を測定した。(A) は Walker A 変異、(B) は保存 Arg 残基変異、(C,D) は Walker B 変異を導入した D1 ダイマー、及び D2 ダイマーの ATP 加水分解活性を、それぞれ $W \cdot W_{D1}$ 、及び $W \cdot W_{D2}$ の活性を 100%とした相対値で示した。独立した測定を 3 回行い、標準偏差をエラーバーとして示した。

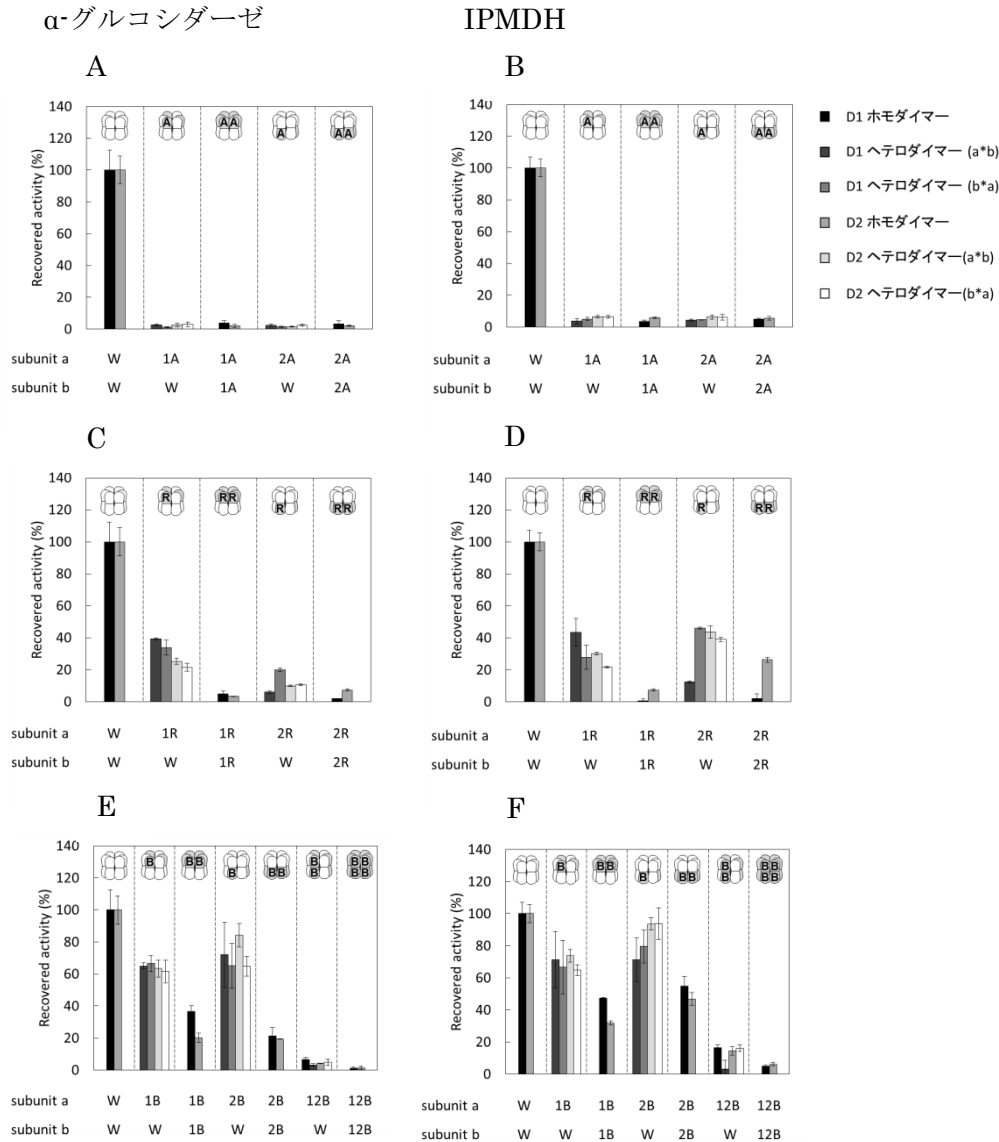


図 3-18. D1 ダイマー、D2 ダイマーの脱凝集活性

A,C,E) 0.2 μ M α -グルコシダーゼ、3 mM ATP を含む溶液を、73°C で 10 分間インキュベートし、7DnaK システム (0.6 μ M 7DnaK、0.2 μ M 7DnaJ、0.1 μ M 7GrpE) と 7ClpB 連結 2 量体 (0.05 μ M) を加えた。55°C で 90 分間インキュベートした後、反応溶液中の α -グルコシダーゼの酵素活性を測定した。B,D,F) 0.2 μ M IPMDH、3 mM ATP を含む溶液を、89°C で 30 分間インキュベートし、7DnaK システム (0.6 μ M 7DnaK、0.2 μ M 7DnaJ、0.1 μ M 7GrpE) と 7ClpB 連結 2 量体 (0.05 μ M) を加えた。55°C で 90 分間インキュベートした後、反応溶液中の IPMDH の酵素活性を測定した。(A,B) は Walker A 変異、(C,D) は保存 Arg 残基変異、(E,F) は Walker B 変異を導入した D1 ダイマー、及び D2 ダイマーの脱凝集活性を、それぞれ W*W_{D1}、及び W*W_{D2} の活性を 100%とした相対値で示した。独立した測定を 3 回行い、標準偏差をエラーバーとして示した。

4. 考察

ClpB が脱凝集するためには、ATP の結合とその加水分解によって生じる個々のサブユニットの構造変化が必要である。本研究では、こうした構造変化がサブユニット間で協同的に起こるのかどうかに着目した。そこで、隣接するサブユニットの ATP 結合部位に近接する保存 Arg 残基の解析と、異なる 2 種のサブユニットが交互に並んだヘテロ 6 量体の解析を行った。

4-1. 7ClpB の保存 Arg 残基の機能解析

保存 Arg 残基変異と Walker A 変異の組み合わせ変異体である 1R/A (P1)-2KT/AA、1R/A (P2)-2KT/AA、1KT/AA-2R/A の各ヌクレオチドの解離定数は、それぞれに対応する Walker A 変異体である 1KT/AA、2KT/AA とほぼ同等であった。また、保存 Arg 残基変異と Walker A 変異の組み合わせ変異体の ATP 加水分解活性は、ほとんど失われていた。これらの結果から、保存 Arg 残基はヌクレオチドの結合には関与しないが、各 AAA+モジュールにおける ATP の加水分解には必須であることが分かった。同様の結果が、FtsH や p97 などの他の AAA+タンパク質でも報告されている [30, 56-59]。保存 Arg 残基変異を持つ BAP 変異体は、BAP の 25~50%の速度で FITC- α -カゼインを糸通しした。一方、保存 Arg 残基変異体の脱凝集活性は、野生型に対して大きく低下した（野生型の 2~25%）。ClpB の変性タンパク質の糸通し活性と ATP 加水分解活性、及び糸通し活性と脱凝集活性との間には相関が無いことが知られており [32]、この結果は保存 Arg 残基が脱凝集過程のうちの糸通し以外の重要な過程に関わっていることを示唆する。保存 Arg 残基変異体をゲルろ過分析したところ、AAA-1 の 2 つの保存 Arg 残基が 7ClpB の 6 量体構造の安定化に重要であることが分かった。この結果は、大腸菌由来 ClpB を用いた過去の報告と一致している [17]。さらに、今回はポジション 1 よりポジション 2 の保存 Arg 残基の方が、6 量体の安定化に大きく寄与することが新たに分かった。7ClpB の結晶構造に見られるように、ポジション 2 の保存 Arg 残基の方が、隣接するサブユニットに結合したヌクレオチドに近い [24]、6 量体の安定化に、より大きく寄与するのかもしれない。AAA-1 に ATP が結合すると、ミドルドメインの Wing-1 が AAA-1 に接近した構造をとる。この状態では、6 量体構造が安定化することが知られている [27]。1R/A (P2) は 6 量体構造がより不安定になる 300 mM KCl 条件下でも、ATP 依存的なミドルドメインの構造変化が見られた。また、AAA-1 に ADP が結合すると、同様にミドルドメインの構造は変化するが、この場合は 6 量体構造が不安定になることが知られている [22, 27]。これらの結果は、ミドルドメインのヌクレオチド依存的な構造変化と AAA-1 の保存 Arg 残基が、それぞれ異なる作用によって、6

量体構造の安定化に関わることを示唆する。正電荷の保存 Arg 残基が、隣接するサブユニットの AAA-1 に結合した負電荷の ATP の γ -リン酸と相互作用することで、6 量体構造を安定化させると考えられる。

4-2. 7ClpB ヘテロ 2 量体の作製とその機能解析

ClpB 6 量体のサブユニット間の協同性を調べるためには、6 量体中に変異サブユニットを組み込んだヘテロ 6 量体の性質を解析することが有効である。これまでも、ClpB の野生型と変異体を混合し、両者が混在するヘテロ 6 量体を作製し、その活性を測定することで、サブユニット間の協同性が議論されてきた [34-38]。しかし、そうして作られたヘテロ 6 量体は、6 量体中の 2 種のサブユニットの比率、及び配置が多様であり、さらに野生型のみから成る 6 量体も形成されるため、結果の解釈が困難になってしまう。そこで、隣接するサブユニット間をジスルフィド結合で特異的に連結した連結 2 量体の作製を試みた。連結 2 量体は異なる 2 種の連結変異体から成るため、6 量体を形成した際には、2 種の連結変異サブユニットが交互に並ぶことになる。ここで、一方のサブユニットに別の変異をさらに導入すると、その変異が導入されたサブユニットが 1 つおきに並んだヘテロ 6 量体のみを作製することができる。さらに、両方のサブユニットに異なる変異を導入した場合は、2 種の変異サブユニットが交互に並んだヘテロ 6 量体も作製できる。この連結 2 量体のシステムを用いれば、変異サブユニットの数と並び方が一定なヘテロ 6 量体を作製できる。7ClpB のサブユニット界面を Cys 残基に置換した変異体を 13 種類作製し、サブユニット間でジスルフィド結合を形成する組み合わせを探索した。その結果、Q184C と A390C、及び R576C と A821C の組み合わせは、それぞれ隣接するサブユニット間の AAA-1、及び AAA-2 同士で、効率良くジスルフィド結合を形成することが分かった。この D1 ダイマー、D2 ダイマーは、いずれも安定な 6 量体を形成した。また、これらのダイマーの ATP 加水分解活性と脱凝集活性は、野生型よりも低かったが、依然として有意な活性は示した（それぞれ野生型の 59~78%、56~88%）。活性の低下は、サブユニット間をジスルフィド結合で連結することで、各サブユニットの構造変化の柔軟性が一部損なわれたからかもしれない。D2 ダイマーは非還元条件下で、野生型の 59%の ATP 加水分解活性を示した。しかし、還元剤で D2 ダイマーのジスルフィド結合を切断すると、その活性は野生型の 35%に低下した。この結果は、AAA-2 のサブユニット界面に Cys 残基を導入することで、その界面で立体障害が起こることを示唆する。しかし、ジスルフィド結合の形成によって、サブユニット界面の立体障害は部分的に解消されると考えられる。このような立体障害の解消は、AAA+タンパク質の ClpX でも報告されている [60]。以上のことから、隣接するサブユニットをジスルフィド結合で連結しても、7ClpB の本質的な機能が維持されたことか

ら、D1 ダイマー、及び D2 ダイマーは、ヘテロ 6 量体の性質を調べるツールとして利用できる。

4-3. *TCI*pB へのヌクレオチド結合におけるサブユニット間の協同性の解析

AAA-1 へのヌクレオチドの結合がサブユニット間で協同的であるのかを、2A*2A と 12A*2A、2A*12A の各ヌクレオチドの K_d を比較することで調べた。サブユニット間に協同性があれば、AAA-1 リング全てにヌクレオチドが結合できる 2A*2A の K_d は、そこにさらに AAA-1 リング内にヌクレオチドが結合できないドメインを 3 つ並びいれた 12A*2A、2A*12A の各ヌクレオチドの K_d と大きく異なると考えられる。しかし、これら 3 つの連結 2 量体に対する各ヌクレオチドの K_d は、ほぼ一定であった。同様に、AAA-2 へのヌクレオチド結合の協同性は、1A*1A と 12A*1A、1A*12A の各ヌクレオチドの K_d を比較することで調べた。その結果、いずれの連結 2 量体でも、各ヌクレオチドの K_d は同程度であった。以上の結果から、リング内にヌクレオチドを結合できないドメインがあっても、同じリング内の別のサブユニットに対するヌクレオチドの親和性は変化しない、すなわちヌクレオチドは各 AAA+モジュールに、ランダムに結合することが分かった。

4-4. *TCI*pB の ATP 加水分解におけるサブユニット間の協同性の解析

1A 変異サブユニット、または 2A 変異サブユニットのみから成る 6 量体 (1A*1A、2A*2A) は、ほとんど ATP を加水分解できなかった。1A のみから成る 6 量体は、AAA-2 リングに 6 個、2A のみから成る 6 量体は AAA-1 リングに 6 個の野生型ドメインがある。これらの 6 量体の野生型ドメインの数を足し合わせると、ちょうど野生型 6 量体の数と一致する。AAA-1 リング、AAA-2 リングにおける ATP の加水分解が、リングごとに独立して起こるのであれば、1A*1A と 2A*2A の ATP 加水分解活性を合わせると、野生型相当になると考えられる。しかし、ATP 加水分解活性を足し合わせても野生型相当にはならなかったことから、一方のリングへの ATP の結合が、他方のリングにおける ATP の加水分解を促進すると考えられる。また、野生型サブユニットと Walker A 変異サブユニットから成るヘテロ 6 量体 (1A*W、W*1A、2A*W、W*2A) の ATP 加水分解活性も、野生型 6 量体に対して非常に小さかった。この結果から、一方のリングへの ATP の結合が、他方の ATP 加水分解を促進する際、結合する ATP の数は 3 つでは足りないことが示唆される。このことは、野生型 6 量体に単一 Walker A 変異サブユニットを組み込むと、大きく ATP 加水分解活性が低下するという過去の報告とも一致

する [34]。保存 Arg 残基変異と Walker B 変異は、いずれも変異を導入した AAA+モジュールでの ATP の加水分解を阻害する。1R 変異サブユニット、または 2R 変異サブユニットのみから成る 6 量体 (1R*1R、2R*2R) の ATP 加水分解活性は、野生型のおよそ 20%以下であった。しかし、1B 変異サブユニット、または 2B 変異サブユニットのみから成る 6 量体 (1B*1B、2B*2B) の活性は、野生型の半分以上であった。1B 変異サブユニット、または 2B 変異サブユニットのみから成る 6 量体中の ATP を加水分解できるドメインの数は、野生型 6 量体の半分である。すなわち、ATP を加水分解できるドメインの数が半分になると、その ATP 加水分解活性も半分かそれ以上を示した。この Walker B 変異体の結果は、一方のリングでの ATP の加水分解を促進するためには、もう一方のリングでの ATP の加水分解は必要ないことを示している。一方、保存 Arg 残基は、隣接するサブユニットに結合した ATP の加水分解に必須であるだけでなく、隣のサブユニットに ATP が結合したことを感知し、自身のサブユニットの構造変化につなげる役割があるとも考えられている [28, 30]。1R、または 2R 変異サブユニットのみから成る 6 量体では、それぞれ AAA-2、または AAA-1 リングは全て野生型ドメインである。しかし、この 1R、または 2R 変異サブユニットのみから成る 6 量体は、ほとんど ATP を加水分解できなかった。この結果は、ATP が結合したリング内の保存 Arg 残基を介したサブユニット間相互作用が、他方のリングでの ATP 加水分解を促進するために必須であることを示唆している。また、野生型サブユニットと保存 Arg 残基変異サブユニットから成るヘテロ 6 量体 (1R*W、W*1R、2R*W、W*2R) の ATP 加水分解活性も、野生型 6 量体に対して大きく低下していた (野生型のおよそ 30%以下)。この結果から、一方のリングの保存 Arg 残基 3 つだけでは、他方のリングの ATP 加水分解を促進できないと考えられる。

野生型サブユニットと 12B 変異サブユニットが交互に並んだヘテロ 6 量体 (12B*W、W*12B) は、両リングに ATP を加水分解できないドメインを 3 つずつ含んでいる。ATP の加水分解がサブユニット間で協同的でないならば、ATP 加水分解活性は野生型ドメインの数に比例して変化すると考えられる。このヘテロ 6 量体の ATP 加水分解活性は、野生型のおよそ 30%以下で、著しく低かった。この結果は、TClpB 6 量体は一方、あるいは両方のリング内で ATP を協同的に加水分解することを示唆する。各リング内の協同性の有無を明確にするため、12B 変異サブユニットと 1B 変異サブユニット (12B*1B、1B*12B)、及び 12B 変異サブユニットと 2B 変異サブユニットから成るヘテロ 6 量体 (12B*2B、2B*12B) の ATP 加水分解活性を測定した。2B 変異サブユニットのみから成る 6 量体と、12B 変異サブユニットと 2B 変異サブユニットから成るヘテロ 6 量体は、いずれも AAA-1 リングのみでしか ATP を加水分解できない。AAA-1 リング内に協同性があるならば、2B*2B に、さらに AAA-1 リング内に ATP を加水分解できないドメインを 3 つ並びいれること (12B*2B、2B*12B) で、活性が大きく低下すると考えられる。解析の結果、2B*2B は野生型の 50%以上の ATP 加水分解活性を示したが、

12B*2B、及び 2B*12B の活性はほとんど失われていた。同様に、AAA-2 リング内での協同性は、1B*1B と 12B*1B、1B*12B の ATP 加水分解活性を比較することで調べた。その結果、1B*1B は野生型相当の ATP 加水分解活性を示したのに対し、12B*1B と 1B*12B は活性がほとんど失われていた。以上の結果から、7ClpB のそれぞれのリング内では、ATP を協同的に加水分解することが示唆される。

これまでの結果をまとめると、7ClpB 6 量体の ATP 加水分解サイクルは次のように進む。まず、(i) 12 個ある AAA+モジュールに、ランダムに ATP が結合する。(ii) 1 つのリングに 4 つかそれ以上の ATP が結合し、保存 Arg 残基を介したドメインの構造変化がリング内に及んだ後、他方のリングを ATP 加水分解活性の高い、活性化状態へと変化させる。(iii) 活性化状態のリング内では、協同的に ATP を加水分解する (図 4-1)。ATP の加水分解は、Walker B モチーフのグルタミン酸によってプロトンが引き抜かれた水分子が、ATP の γ -リン酸を求核攻撃することで起こると考えられている [61]。活性化状態の AAA+モジュールは、Walker B モチーフ、水分子、ATP の γ -リン酸の位置関係が、通常よりも接近した状態になることで、加水分解反応が起こりやすくなっているのかもしれない。最近、熱量計を用いた滴定実験によって、大腸菌由来 ClpB の 6 量体では、それぞれのリングには同時に 4 つしか ADP が結合しないことが示されている [62]。この結果を合わせて考えると、一方のリングに 4 つの ATP が結合することで、もう一方のリングが活性化される可能性が高い。7ClpB とは対称的に、大腸菌 ClpB、出芽酵母 Hsp104 では、Walker B 二重変異サブユニットを、野生型 6 量体中に組み込むと、ATP 加水分解活性が増加する [35-38]。これらのタンパク質には、ATP 加水分解サイクルモデルのステップ (iii) は当てはまらないことになる。一方で Walter らのグループは、単一、及び二重 Walker B 変異サブユニットを様々な比率で混合し、その ATP 加水分解活性を測定することで、出芽酵母由来の Hsp104 の AAA-1 リング内では、ATP の加水分解が協同的に起こることを明らかにした [37]。大腸菌 ClpB や出芽酵母 Hsp104 でも、本研究と同様に連結 2 量体を用いて、ヘテロ 6 量体を均一にし、それを解析することで、生物種による違いが明らかになるかもしれない。

ヘテロ 6 量体の中には、組み合わせる変異サブユニットの種類は同じでも、ジスルフィド結合を形成させる位置やサブユニットの配置が異なると、ATP 加水分解活性が変化するものがあつた。例えば、W*1A_{D1} の ATP 加水分解活性は、1A と野生型から成る他のヘテロ 6 量体よりも高かつた。同様に、2R*W_{D2} の ATP 加水分解活性も、2R と野生型から成る他のヘテロ 6 量体よりも高かつた。これらの連結 2 量体では、ジスルフィド結合がヌクレオチド結合ポケットの近傍に形成されるため、導入した変異の影響の一部が、ジスルフィド結合によって軽減されているのかもしれない。しかし、いずれの場合も、6 量体中のサブユニットの配置が同じになる別のダイマー (例えば W*1A_{D1} は 1A*W_{D1}、W*1A_{D2}、1A*W_{D2} とサブユニットの配置が同じ) のデータによって、考察の正確性は十分保障されると考えられる。また、2B*2B_{D1} の ATP 加水分解活性は、2B*2B_{D2}

の約 2 倍高かった。ジスルフィド結合で連結していない 2B 変異体は 14 min^{-1} の速さで ATP を加水分解し、その活性は $2B*2B_{D2}$ と同等であった。 $2B*2B_{D1}$ と $2B*2B_{D2}$ の ATP 加水分解活性が異なる理由は分からないが、いずれも ATP 加水分解活性が有意にあり、解釈にはほとんど影響しないと考えられる。

4-5. 7ClpB の協同的な ATP の加水分解と脱凝集活性との関係

Walker A 変異サブユニット、保存 Arg 残基変異サブユニット、及び Walker B 二重変異サブユニットのみから成る 6 量体 ($1A*1A$ 、 $2A*2A$ 、 $1R*1R$ 、 $2R*2R$ 、 $12B*12B$)、Walker A 変異サブユニット、または Walker B 二重変異サブユニットと野生型サブユニットから成るヘテロ 6 量体 ($1A*W$ 、 $W*1A$ 、 $2A*W$ 、 $W*2A$ 、 $12B*W$ 、 $W*12B$) は、いずれも凝集体をほとんど再生できなかった。これらの 6 量体には、協同的に ATP を加水分解できるリングが 1 つもない。一方、単一の Walker B 変異サブユニットと野生型サブユニットから成るヘテロ 6 量体は、凝集体を有意に回復させることができた (野生型の 60%以上)。このヘテロ 6 量体では、変異を持たないリング内では協同的に ATP を加水分解できる。これらの結果は、凝集体を効率良く脱凝集するためには、少なくとも 1 つのリング内では ATP を協同的に加水分解する必要があることを示唆する。この例外として、保存 Arg 残基変異サブユニットと野生型サブユニットから成るヘテロ 6 量体の中に、凝集体を有意に再生できるものがあつた。これは、保存 Arg 残基が担うサブユニット間相互作用の役割を、別のアミノ酸がある程度補うことで、協同的な ATP の加水分解が一部維持されたからかもしれない。 $1B*1B$ の ATP 加水分解活性は、野生型よりも少し高いにも関わらず、野生型の 20~40%しか脱凝集できなかった。この結果は、ATP 加水分解活性と脱凝集活性との間には相関が無いことを示唆する。脱凝集活性は、単一の Walker B 変異サブユニットのみの 6 量体、単一の Walker B 変異サブユニットと野生型サブユニットから成るヘテロ 6 量体、野生型サブユニットのみの 6 量体の順に高くなった。さらに、このヘテロ 6 量体は野生型サブユニットのみの 6 量体と、単一 Walker B 変異サブユニットのみの 6 量体の、ちょうど中間の値であつた。このことから、協同的に ATP を加水分解できるリングが 1 つ以上ある場合、7ClpB の脱凝集活性は、ATP を加水分解できる AAA+モジュールの数と相関するのかもしれない。

4-6. D1 ダイマー、D2 ダイマーのゲルろ過分析

本論文で使用した全ての連結 2 量体が、6 量体を形成することを確認するため、ゲルろ過分析を行った。その結果、 $W*1A_{D1}$ 、 $1A*12A_{D1}$ 、 $12A*1A_{D1}$ 、 $2A*12A_{D1}$ 、 $2A*12A_{D2}$

は、7ClpB 6 量体よりも分子量の大きな位置に溶出のピークが見られた。これらの 6 量体は、球状では無い、あるいは 6 量体以上のオリゴマーを形成していると考えられる。そのため、これらの連結 2 量体から得られたデータの信頼性は乏しい。しかし、6 量体中のサブユニットの配置が、これら 5 種類のダイマーと同じになるダイマーが少なくとも 2 つ以上あり、それらは安定な 6 量体を形成するため、本論文の結論には影響しない。

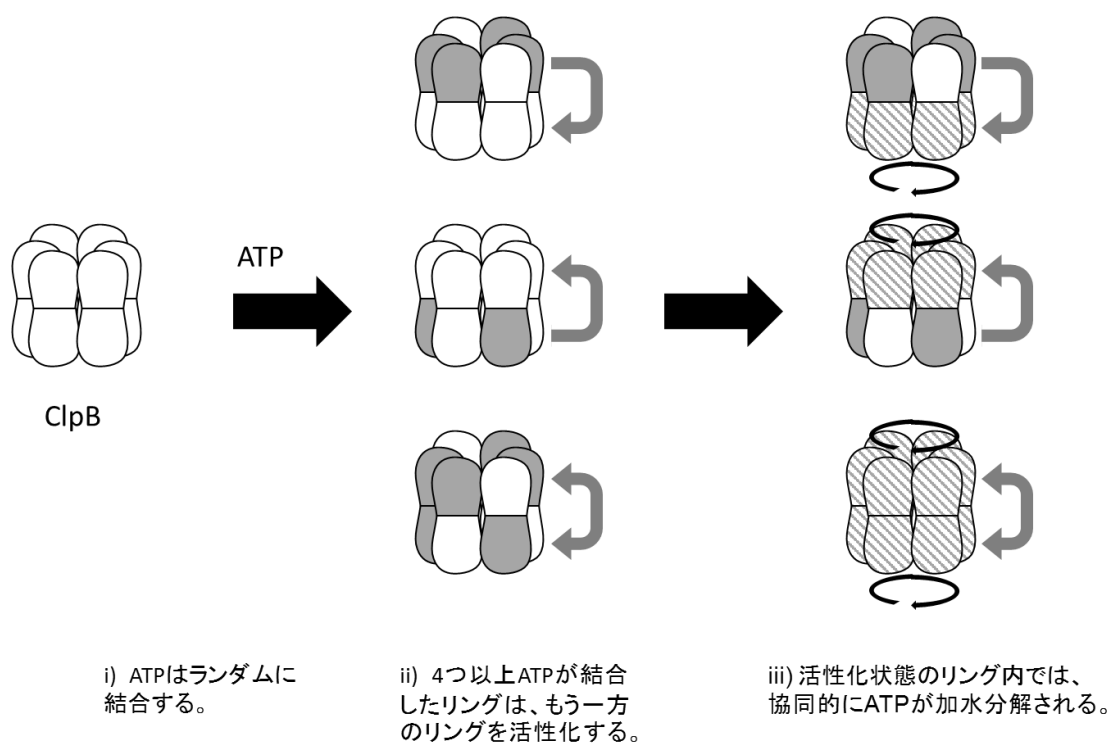


図 4-1. *TClpB* 6 量体の ATP 加水分解サイクルモデル

ATP が結合した AAA+モジュールをグレー、協同的に ATP の加水分解が進んでいる AAA+リングを斜線で示した。

5. 結語

ClpB は複雑にからまった凝集体から、ポリペプチド鎖を引き抜くことで脱凝集すると考えられている。その際、サブユニット当たり 2 つ、合計 12 個の ATP 加水分解ドメインで、ATP を結合・加水分解し、個々のサブユニットの構造を変化させることで、ポリペプチド鎖を引き抜くという機械的な力を生じさせている。このような複雑な機能を発揮するために、ClpB の 6 つのサブユニットは一斉、あるいは連続的に構造を変化させると考えられているが、その詳細は分かっていない。本研究では、ClpB のサブユニット間にはどのような協同性があり、脱凝集反応にどう関わるのかを明らかにする。

まず、AAA+タンパク質ファミリーに高度に保存されている Arg 残基の役割を調べた。この保存 Arg 残基は、隣接するサブユニットの ATP 結合部位に近接しており、相互作用することで、隣のサブユニットでの反応や構造変化に関与すると考えられる。保存 Arg 残基を Ala 残基に置換し、様々な活性の解析を行った結果、保存 Arg 残基は ATP の結合に関与しないが、その加水分解には必須であることが分かった。また、AAA-1 の保存 Arg 残基は、ミドルドメインの構造変化とは別の経路で、7ClpB 6 量体の安定化に寄与することが分かった。さらに、保存 Arg 残基変異体の糸通し活性、及び脱凝集活性は、野生型に対して大きく低下していた。このことから、保存 Arg 残基は隣接するサブユニットの ATP の加水分解に関わり、糸通しや脱凝集に必要な構造変化を引き起こすことが示唆された。一方で、連結 2 量体を用いたヘテロ 6 量体の解析により、ATP は ClpB の各サブユニットにランダムに結合することが分かった。また、1 つのリングに 4 つ以上の ATP が結合することで、他方のリングを ATP 加水分解活性の高い、活性化状態へと遷移させることも明らかになった。この活性化には、ATP の結合だけでなく、保存 Arg 残基も関与していた。さらに、活性化状態のリングでは、ATP が協同的に加水分解されることを見出した。また、脱凝集には協同的に ATP を加水分解するリングが少なくとも 1 つ必要であることが分かった。すなわち、ClpB 6 量体における、AAA+リング間の相互刺激と、それによって誘起される協同的な ATP の加水分解が、効率的に脱凝集反応を進めるための重要な過程であることが示された。しかし、こうしたリング間の相互刺激やサブユニット間の協同性を生み出す詳細な分子基盤は分かっていない。

サブユニット間の協同性は、ClpB 以外のオリゴマー構造を形成する AAA+タンパク質でも、独自の機能を発揮する上で必要な性質である可能性が高い。実際、いくつかの AAA+タンパク質では、サブユニット間に協同性があることを示唆する結果が報告されている [63-66]。サブユニット間に協同性があるのか、あるならばそれはどのような協同性なのか、その詳細をサブユニット間を連結するという新たな手法を用いて明らかにすることで、様々な AAA+タンパク質の詳細な分子メカニズムの解明が期待される。

6. 参考文献

- 1 Goodsell, D. S. (1991) Inside a living cell. *Trends in biochemical sciences*. **16**, 203-206
- 2 Saibil, H. (2013) Chaperone machines for protein folding, unfolding and disaggregation. *Nature reviews. Molecular cell biology*. **14**, 630-642
- 3 Feder, M. E. and Hofmann, G. E. (1999) Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annual review of physiology*. **61**, 243-282
- 4 Bukau, B. and Horwich, A. L. (1998) The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell*. **92**, 351-366
- 5 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
- 6 Glover, J. R. and Lindquist, S. (1998) Hsp104, Hsp70, and Hsp40: a novel chaperone system that rescues previously aggregated proteins. *Cell*. **94**, 73-82
- 7 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
- 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 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
- 10 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. *The EMBO journal*. **18**, 6934-6949
- 11 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 letters*. **489**, 92-96
- 12 Harrison, C. J., Hayer-Hartl, M., Di Liberto, M., Hartl, F. and Kuriyan, J. (1997) Crystal structure of the nucleotide exchange factor GrpE bound to the ATPase domain of the molecular chaperone DnaK. *Science*. **276**, 431-435
- 13 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

- 14 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
- 15 Neuwald, A. F., Aravind, L., Spouge, J. L. and Koonin, E. V. (1999) AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes. *Genome Res.* **9**, 27-43
- 16 Ogura, T. and Wilkinson, A. J. (2001) AAA+ superfamily ATPases: common structure--diverse function. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*. **6**, 575-597
- 17 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
- 18 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
- 19 Zolkiewski, M., Kessel, M., Ginsburg, A. and Maurizi, M. R. (1999) Nucleotide-dependent oligomerization of ClpB from *Escherichia coli*. *Protein Sci.* **8**, 1899-1903
- 20 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
- 21 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
- 22 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
- 23 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
- 24 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
- 25 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

- 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 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
- 28 Ogura, T., Whiteheart, S. W. and Wilkinson, A. J. (2004) Conserved arginine residues implicated in ATP hydrolysis, nucleotide-sensing, and inter-subunit interactions in AAA and AAA+ ATPases. *J Struct Biol.* **146**, 106-112
- 29 Snider, J. and Houry, W. A. (2008) AAA+ proteins: diversity in function, similarity in structure. *Biochem Soc Trans.* **36**, 72-77
- 30 Karata, K., Inagawa, T., Wilkinson, A. J., Tatsuta, T. and Ogura, T. (1999) Dissecting the role of a conserved motif (the second region of homology) in the AAA family of ATPases. Site-directed mutagenesis of the ATP-dependent protease FtsH. *J Biol Chem.* **274**, 26225-26232
- 31 Kim, Y. I., Levchenko, I., Fraczkowska, K., Woodruff, R. V., Sauer, R. T. and Baker, T. A. (2001) Molecular determinants of complex formation between Clp/Hsp100 ATPases and the ClpP peptidase. *Nature structural biology.* **8**, 230-233
- 32 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
- 33 Hodson, S., Marshall, J. J. and Burston, S. G. (2012) Mapping the road to recovery: the ClpB/Hsp104 molecular chaperone. *J Struct Biol.* **179**, 161-171
- 34 Werbeck, N. D., Schlee, S. and Reinstein, J. (2008) Coupling and dynamics of subunits in the hexameric AAA+ chaperone ClpB. *J Mol Biol.* **378**, 178-190
- 35 Hoskins, J. R., Doyle, S. M. and Wickner, S. (2009) Coupling ATP utilization to protein remodeling by ClpB, a hexameric AAA+ protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **106**, 22233-22238
- 36 del Castillo, U., Fernandez-Higuero, J. A., Perez-Acebron, S., Moro, F. and Muga, A. (2010) Nucleotide utilization requirements that render ClpB active as a chaperone. *FEBS letters.* **584**, 929-934
- 37 Franzmann, T. M., Czekalla, A. and Walter, S. G. (2011) Regulatory circuits of the AAA+ disaggregase Hsp104. *J Biol Chem.* **286**, 17992-18001
- 38 DeSantis, M. E., Leung, E. H., Sweeny, E. A., Jackrel, M. E., Cushman-Nick, M., Neuhaus-Follini, A., Vashist, S., Sochor, M. A., Knight, M. N. and Shorter, J. (2012) Operational plasticity enables hsp104 to disaggregate diverse amyloid and nonamyloid

clients. *Cell*. **151**, 778-793

39 Kityk, R., Kopp, J., Sinning, I. and Mayer, M. P. (2012) Structure and dynamics of the ATP-bound open conformation of Hsp70 chaperones. *Molecular cell*. **48**, 863-874

40 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

41 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. *Molecular cell*. **25**, 261-271

42 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

43 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

44 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

45 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 letters*. **412**, 633-636

46 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

47 中崎洋介. (2015) 分子シャペロン ClpB の基質糸通し活性の解析. 博士論文

48 Kirstein, J., Schlothauer, T., Dougan, D. A., Lilie, H., Tischendorf, G., Mogk, A., Bukau, B. and Turgay, K. (2006) Adaptor protein controlled oligomerization activates the AAA+ protein ClpC. *The EMBO journal*. **25**, 1481-1491

49 Schlothauer, T., Mogk, A., Dougan, D. A., Bukau, B. and Turgay, K. (2003) MecA, an adaptor protein necessary for ClpC chaperone activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **100**, 2306-2311

50 Schirmer, E. C., Glover, J. R., Singer, M. A. and Lindquist, S. (1996) HSP100/Clp proteins: a common mechanism explains diverse functions. *Trends in biochemical sciences*. **21**, 289-296

51 Sousa, M. C., Trame, C. B., Tsuruta, H., Wilbanks, S. M., Reddy, V. S. and McKay, D. B. (2000) Crystal and solution structures of an HslUV protease-chaperone complex. *Cell*. **103**,

633-643

- 52 Bochtler, M., Hartmann, C., Song, H. K., Bourenkov, G. P., Bartunik, H. D. and Huber, R. (2000) The structures of HslIU and the ATP-dependent protease HslIU-HslIV. *Nature*. **403**, 800-805
- 53 Maurizi, M. R. and Xia, D. (2004) Protein binding and disruption by Clp/Hsp100 chaperones. *Structure*. **12**, 175-183
- 54 中村俊樹. (2011) 分子シャペロン ClpB の 6 量体構造の安定性とシャペロン活性の関係. 修士論文
- 55 Wang, F., Mei, Z., Qi, Y., Yan, C., Hu, Q., Wang, J. and Shi, Y. (2011) Structure and mechanism of the hexameric MecA-ClpC molecular machine. *Nature*. **471**, 331-335
- 56 Rombel, I., Peters-Wendisch, P., Mesecar, A., Thorgeirsson, T., Shin, Y. K. and Kustu, S. (1999) MgATP binding and hydrolysis determinants of NtrC, a bacterial enhancer-binding protein. *J Bacteriol*. **181**, 4628-4638
- 57 Song, H. K., Hartmann, C., Ramachandran, R., Bochtler, M., Behrendt, R., Moroder, L. and Huber, R. (2000) Mutational studies on HslU and its docking mode with HslV. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **97**, 14103-14108
- 58 Johnson, A. and O'Donnell, M. (2003) Ordered ATP hydrolysis in the gamma complex clamp loader AAA+ machine. *J Biol Chem*. **278**, 14406-14413
- 59 Wang, Q., Song, C., Irizarry, L., Dai, R., Zhang, X. and Li, C. C. (2005) Multifunctional roles of the conserved Arg residues in the second region of homology of p97/valosin-containing protein. *J Biol Chem*. **280**, 40515-40523
- 60 Glynn, S. E., Nager, A. R., Baker, T. A. and Sauer, R. T. (2012) Dynamic and static components power unfolding in topologically closed rings of a AAA+ proteolytic machine. *Nature structural & molecular biology*. **19**, 616-622
- 61 Snider, J., Thibault, G. and Houry, W. A. (2008) The AAA+ superfamily of functionally diverse proteins. *Genome Biol*. **9**, 216
- 62 Carroni, M., Kummer, E., Oguchi, Y., Wendler, P., Clare, D. K., Sinning, I., Kopp, J., Mogk, A., Bukau, B. and Saibil, H. R. (2014) Head-to-tail interactions of the coiled-coil domains regulate ClpB activity and cooperation with Hsp70 in protein disaggregation. *eLife*. **3**, e02481
- 63 Hishida, T., Iwasaki, H., Han, Y. W., Ohnishi, T. and Shinagawa, H. (2003) Uncoupling of the ATPase activity from the branch migration activity of RuvAB protein complexes containing both wild-type and ATPase-defective RuvB proteins. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*. **8**, 721-730
- 64 Crampton, D. J., Mukherjee, S. and Richardson, C. C. (2006) DNA-induced switch from independent to sequential dTTP hydrolysis in the bacteriophage T7 DNA helicase.

Molecular cell. **21**, 165-174

65 Moreau, M. J., McGeoch, A. T., Lowe, A. R., Itzhaki, L. S. and Bell, S. D. (2007) ATPase site architecture and helicase mechanism of an archaeal MCM. *Molecular cell.* **28**, 304-314

66 Enemark, E. J. and Joshua-Tor, L. (2008) On helicases and other motor proteins. *Current opinion in structural biology.* **18**, 243-257

7. 公表論文

副論文

- 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
- II. Yamasaki, T., Oohata, Y., Nakamura, T., and Watanabe, Y. H. (2015) Analysis of the cooperative ATPase cycle of the AAA+ chaperone ClpB from *Thermus thermophilus* by using ordered heterohexamers with an alternating subunit arrangement. *J. Biol. Chem.* **290**, 9789-9800

参考論文

なし