

| | |
|---------|--|
| 氏名・本籍 | 山崎 孝史 (兵庫県) |
| 学位の種類 | 博士 (理学) |
| 報告番号 | 甲第 95 号 |
| 学位授与の日付 | 平成 28 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 のサブユニット間の協同性の解析 |
| 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、他の分子シャペロン DnaK とその補助因子と協力して、一度変性・凝集したタンパク質をときほぐし、再生することができる。このうち、凝集体をときほぐす過程を脱凝集と呼ぶ。ClpB は、リング状のホモ 6 量体を形成して働くが、このリング構造の中央には、ポリペプチド鎖 1 本分の大きさの孔があり、凝集したタンパク質は、この孔に引き込まれることによって脱凝集されると考えられている。ClpB のサブユニット 1 つは、AAA+モジュールと呼ばれる ATP 加水分解ドメインを 2 つ (AAA-1 および AAA-2) 持つ。6 量体中では、AAA-1, AAA-2 それぞれがリングを形成し、それらが重なっている。ClpB は、6 量体に含まれる合計 12 個の AAA+モジュールで、ATP の結合・加水分解を繰り返し、それによって生じる構造変化で凝集タンパク質の引き込みを行うと考えられる。その際、統合された機能的な構造変化を生み出すために、各 AAA+モジュールは相互に連携すると考えられるが、その詳細は明らかでない。本研究は、ClpB のサブユニット間の連携に注目し、その仕組みを明らかにすることで、脱凝集のメカニズムに迫ることを目的としている。

AAA+モジュールを持つタンパク質は他にも多数あり、AAA+タンパク質ファミリーを構成している。またそのメンバーの機能は、分子シャペロンだけでなく、タンパク質分解、DNA の複製、膜融合など多岐にわたる。AAA+タンパク質の多くは、ClpB と同様にリング状の多量体を形成するが、そのサブユニット界面には、1 つあるいは 2 つのアルギニン残基が高度に保存されている。これらのアルギニン残基は、立体構造上、隣接するサブユニットの ATP 結合ポケットの近くに位置している。他の AAA+タンパク質を用いた先行研究では、これらの残基が、隣のサブユニットでの ATP 加水分解に関与することが示されている。申請者はまず、ClpB が持つこれらのアルギニン残基をアラニンに置換した変異体を作成し、その役割を検証した。その結果、他の AAA+タンパク質同様、これらの残基は、それぞれの AAA+モジュールへの ATP の結合には関与しないが、その加水分解には必須であることが示された。また、これらの残基が脱凝集に重要な役割を果たすことも明らかとなった。

次に申請者は、サブユニット間の協同性を調べるため、ClpB のサブユニット界面にシステイン残基を導入し、ジスルフィド結合によって、隣接するサブユニットを連結させた。連結した 2 つのサブユニットの左右の位置関係は、導入するシステイ

ン残基の位置によって決まる。そのため、この連結 2 量体が集まって生じる 6 量体では、2 種類のシステイン変異サブユニットが交互に並ぶことになる。ここにさらに、一方のサブユニットにのみ任意の変異を導入すると、その変異を持つサブユニットが 1 つおきに並んだ、規則的なヘテロ 6 量体が形成される。ある過程がサブユニット間で協同的に進行するかは、その過程を阻害した変異サブユニットを野生型 6 量体に組み込み、6 量体全体への影響を見ることで評価することができる。協同性の高い過程ほど、変異サブユニットを組み込んだ際に、6 量体全体での阻害の程度が大きくなる。AAA-1, AAA-2 それぞれの、ATP 結合を阻害する変異、加水分解を阻害する変異、さらに保存アルギニン残基をアラニンに置換した変異を、様々に組み合わせたヘテロ 6 量体を作製し、それらの ATP 結合能、ATP 加水分解活性、および脱凝集活性を測定した。その結果、ATP の結合はランダムに起こるが、その加水分解は、AAA-1, AAA-2 各リング内で協同的に進行することが分かった。また、これら 2 つのリングは、相互に活性を調節しており、一方のリングに 4 つ以上の ATP が結合することで、もう一方のリングでの協同的な ATP 加水分解が可能になることが示された。その際、ATP 結合の情報は、サブユニット界面の保存アルギニン残基によって検知・伝達される可能性が示された。さらに、少なくとも一方の AAA+リングで協同的な ATP 加水分解が行われることが、効率的な脱凝集に必須であることも示された。

審査結果の要旨

分子シャペロン ClpB は、リング状の 6 量体を形成し、合計 12 個の AAA+モジュールが ATP を結合・加水分解することで、脱凝集という非常に複雑な機能を発揮する。そのため、各サブユニットは高度に連携すると予想されていた。これまでに、ATP 加水分解活性の ATP 濃度依存性の詳細な解析や、野生型サブユニットと変異サブユニットを様々な比で混合したヘテロ 6 量体の解析により、サブユニット間の連携の様子は少しずつ分かり始めていた。しかしその一方で、手法的な限界のため、得られる情報は限定的であった。

ClpB のサブユニット間の連携の詳細を明らかにするため、申請者はまず、AAA+タンパク質が共通して持つ、サブユニット界面の保存アルギニン残基に注目し、変異体解析を行った。その結果、ClpB の保存アルギニン残基が、他の AAA+タンパク質の場合と同様に、ATP の加水分解に関わることを示した。次に、ジスルフィド結合により隣接するサブユニットを連結し、任意の変異サブユニットを 6 量体中に 1 つおきに組み込む方法を開発した。この方法を用いた解析により、ClpB のサブユニット間の協同性の様子を、これまでになく詳細に、具体的に記述することに成功した。これらの成果は、ClpB の分子メカニズムの理解を大きく進展させたと同時に、他の多くの AAA+タンパク質のメカニズムを考察する上での重要な知見となる。さらに、ホモ多量体タンパク質の協同性に関する、新たな解析手法を提示したという点でも意義深い。

本研究の成果は、「第 86 回日本生化学会大会 (2013 年, 横浜)」, 「第 14 回日本蛋白質科学会年会 (2014 年, 横浜)」などで発表されている。また、成果の一部は、権威ある、査読付の国際学術誌 (副論文 2 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。

2016 年 1 月 29 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 (山崎孝史) 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と認めらる。