

学 位 論 文 題 名

Analysis of Binding Interaction
between Chaperonin GroEL and Substrate Protein
Fluorescence Correlation Spectroscopy

(蛍光相関分光法によるシャペロニン GroEL

-基質蛋白質間相互作用の解析)

学位論文内容の要旨

蛍光相関分光法 (fluorescence correlation spectroscopy; FCS) はレーザ光源と共焦点光学系を組み合わせることにより微小領域 (femto liter; 10^{-15} L) の均一溶液中においてブラウン運動をする蛍光分子により生じる蛍光のゆらぎを蛍光相関関数を通じて解析し、その分子の数や拡散定数等を得る方法である。この蛍光のゆらぎ (もしくは分子の拡散運動) は結合等による分子形状の変化 (分子の大きさの変化) により変化する。すなわち、相関分光法を利用することで、分子間結合、解離、或いは凝集反応などの分子間相互作用を検出することが可能である。複数の蛍光性分子種を含む場合は、得られる蛍光相関関数を複数成分を含むモデルで解析することにより、それぞれの分子数の比や拡散定数等を定量的に求めることができる。これを生体分子の会合反応などに応用することにより、その反応の解離あるいは会合定数などを決定できる。

FCS の概念は既に 1970 代考案されていたが、近年になってから高感度の光検出器開発や共焦点光学系の技術的な進歩により生物物理、生化学、医学などの様々な研究分野で応用されつつある。しかしながら FCS は DNA 関連研究分野、蛋白質の凝集反応、リガンド-蛋白質間の結合反応、細胞内での分子検出など幅広い分野で応用されているが蛋白質-蛋白質間結合反応にはその応用例は極めて数少ない。その理由として蛋白質同士の場合結合による分子量 (拡散定数) の変化が小さいこと、ラベルにより蛋白質の性質が変わること、蛋白質の容器表面への吸着により分子の数が正しく評価できないこと等が挙げられる。しかし、こうした難点は研究目的となる反応系やラベル手法の選び方、適切な表面処理剤の使用によって改善できるため、FCS は蛋白質間結合反応の解析において有望な手法であると考えられる。

蛋白質の折れ畳みと会合に関与していることが明らかになった分子シャペロンというストレス蛋白質の分子機構は、まだ明らかではない。特に分子シャペロンの一種である分子シャペロニン GroEL は様々な基質が知られており、その活性が試験管内で割と簡単に見ることができるため、多くの研究者により盛んに研究されているが同じくその基質認識機構はまだ不明な部分が多い。特に GroEL は基質と疎水的な結合を形成すると知られているが、場合によっては静電的な相互作用もその結合反応に大きく影響を与えているとも言われている。さらにその静電相互作用に関しては測定手法や基質の種類によって意見の異なる報告がいくつか出されている。我々は構造の異なる様々な基質と結合する GroEL

の認識機構における疎水性相互作用と静電相互作用の重要性に注目し、FCSを用い、GroELと3種類の静電的な性質の異なる基質である還元型ラクトアルブミン (rLA、 $pI=4.7$)、変性ペプシン (denatured pepsin、 $pI<1$)、アポシトクロム c (apo-cyt c、 $pI=10.1$) とのそれぞれの相互作用を解析した。

まず GroEL、rLA、denatured pepsin、apo-cyt c をそれぞれローダミンでラベルし、FCS 測定から蛋白質それぞれの拡散定数及び分子量を評価した。蛋白質サンプルのガラス表面への吸着によって生じる FCS 測定結果のエラーを防ぐため表面処理剤 (protein blocker) で処理したカバーガラスを用いた。その結果、protein blocker で処理していない場合比に吸着の問題が大きく改善され、FCS 測定によって得られた蛋白質サンプルの濃度は吸収測定で得られた濃度とよく一致した。蛍光ラベルによる蛋白質の凝集反応は見られなかった。さらに FCS 測定によって求められた分子量は既に知られているそれぞれの蛋白質の分子量とよく一致した。

得られた各蛋白質の拡散定数をもとにし、GroEL 滴定実験より GroEL と rLA、denatured pepsin、apo-cyt c とのそれぞれの解離定数を 0.2 M KCl の存在下、並びに非存在下で比較した。得られた各蛋白質の解離定数の値は他の手法のカロリーメーター法や stopped-flow 法で求めた値とよく一致しているのが示されたが、rLA の場合、surface plasmon resonance 法で得られた値と大きく異なっていた。FCS を用いた測定では rLA の場合塩濃度の依存性はあまり現れず、他の基質である denatured pepsin の場合は塩濃度により大きく影響を受けることが示された。この結果は GroEL と denatured pepsin はそれぞれモノマーにつき -18、-38 の大きな負の電荷を持っていることに対し、rLA は denatured pepsin に比べ、比較的小さい -7 の電荷しか持っていないことがその原因であると考えられる。一方、正の電荷を持つ apo-cyt c (+9) は塩濃度の増加によって GroEL との結合が弱くなるのが示された。さらに apo-cyt c は塩がなくても denatured pepsin や rLA に比べ、GroEL と強く結合した。こうした結果は基質を持つ正の電荷が GroEL-基質間会合に影響を与えていることを示している。

GroEL の基質認識機構における塩イオンの効果を詳しく調べるため、4 種類の塩 (KCl, NaCl, $MgCl_2$, $CaCl_2$) を用いて各基質の解離定数の塩濃度依存性を測定した。Denatured pepsin や rLA は塩の濃度が増加する (0~0.4 M) ことによって GroEL との結合が強くなり、apo-cyt c-GroEL 間結合は塩濃度の増加によって弱くなった。特に apo-cyt c の場合、塩濃度による解離定数の増加は 0~0.1M 塩濃度では見られたが、0.1M 以上の濃度では塩濃度の依存性が見られなかった。さらに、各基質-GroEL 間結合における塩の効果は一価の塩 (KCl, NaCl) より二価の塩 ($MgCl_2$, $CaCl_2$) の方が大きいことが示された。

ゲル濾過を用いた rLA-GroEL 間結合の塩濃度依存性に関する実験結果では強い塩濃度依存性が報告されているがカロリーメーター法では塩濃度依存性の報告はない。原因は不明だがゲル濾過では free の基質と bound の基質を物理的に分けることにより塩濃度依存性が見かけ上大きく現れたと考えられる。カロリーメーター法では測定するサンプルの濃度が非常に高い (~100 μM) ため塩濃度依存性の効果が減少したと考えられる。最近のゲル濾過法を用いた報告では apo-cyt c の塩濃度依存性が 0.05~0.2 M KCl の範囲で見られなかったが FCS の測定結果はその理由をよく説明している。

本研究から FCS による GroEL-基質間相互作用の解析は今までの他の研究結果とよく一致し、さらに他の手法に比べ高感度であることが明らかになった。一方、GroEL-基質間結合には疎水性相互作用だけではなく水溶液中の塩イオンや基質の正の電荷を持つ残基に由来する静電相互作用も寄与していることが示された。GroEL は極めて広い範囲の基質と結合し、その作用機構や基質の認識機構が基質によって違うため、一貫した作用機序の説明が難しい。こういう観点から考えると FCS は高感

度で実験上簡便であるため今後 GroEL－基質間相互作用を調べるのに有望であるとともに将来細胞内の蛋白－蛋白間相互作用を観察する一つの手法として応用されと考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 田 村 守

副 査 教 授 谷 口 和 弥

副 査 教 授 矢 澤 道 生

学 位 論 文 題 名

Analysis of Binding Interaction between Chaperonin GroEL and Substrate Protein Fluorescence Correlation Spectroscopy

(蛍光相関分光法によるシャペロニン GroEL

-基質蛋白質間相互作用の解析)

本論文は、蛋白質の折れ畳みと会合に関与している分子シャペロンというストレス蛋白質の分子機構を、蛍光相関分光法 (FCS) で明らかにしたものである。特に分子シャペロンの一種であるシャペロニン GroEL は様々な基質が知られており、その活性が試験管内で簡単に見ることができるため、多くの研究者により調べられてきたが、その基質認識機構はまだ不明な部分が多い。GroEL は基質と疎水的な結合を形成するが、静電的な相互作用もその結合反応に大きく影響を与えているとも言われている。さらにその静電相互作用に関し、測定手法や基質の種類によって異なる報告がいくつか出されている。申請者は GroEL の認識機構における疎水性相互作用と静電相互作用の重要性に注目し、FCS を用い、3 種類の静電的な性質の異なる還元型ラクトアルブミン (rLA、 $pI=4.7$)、変性ペプシン (denatured pepsin、 $pI<1$)、アポシトクロム c (apo-cyt c、 $pI=10.1$) と GroEL との相互作用を解析した。

まず GroEL、rLA、denatured pepsin、apo-cyt c をそれぞれローダミンでラベルし、FCS 測定から蛋白質それぞれの拡散定数及び分子量を評価した。その結果、FCS 測定によって求められた分子量は既に知られているそれぞれの蛋白質の分子量とよく一致した。次に、得られた各蛋白質の拡散定数をもとにし、GroEL 滴定実験より GroEL と rLA、denatured pepsin、apo-cyt c とのそれぞれの解離定数を 0.2 M KCl の存在下、並びに非存在下で比較した。rLA の場合塩濃度の依存性はあまり現れず、他の基質である denatured pepsin は塩濃度により大きく影響を受けた。この結果は GroEL と denatured pepsin はそれぞれモノマーにつき -18 、 -38 の大きな負の電荷を持っていることに対し、rLA は denatured pepsin に比べ、比較的小さい -7 の電荷しか持っていないことがその原因であると考えられる。一方、正の電荷を持つ apo-cyt c ($+9$) は塩濃度の増加によって GroEL との結合が弱くなるのが示された。さらに apo-cyt c は塩がなくても denatured pepsin や rLA に比べ、GroEL と強く結合した。次に GroEL の基質認識機構における塩イオンの効果を詳しく調べるため、4 種類の塩 (KCl , NaCl , MgCl_2 , CaCl_2) を用いて各基質の解離定数の塩濃度依存性を測定した。その結果、各基質-GroEL 間結合における塩の効果は一価の塩 (KCl , NaCl) より二価の塩

(MgCl_2 , CaCl_2)の方が大きいことが示された。本研究から、FCSによるGroEL－基質間相互作用の解析結果は従来の報告とよく一致し、さらに他の手法に比べ高感度であることが明らかになった。更に、GroEL－基質間結合には疎水性相互作用だけではなく、静電相互作用も寄与していることが示された。

これらの内容は、FCSの有効性がシャペロニンの分子認識に新しい知見を与えたもので、筆者は北海道大学博士（理学）の学位を授与される資格があるものと認める。