

学位審査報告書

(ふりがな) 氏名	いしかわ よしひろ 石川 善弘
学位(専攻分野)	博士(理学)
学位記番号	理博第 号
学位授与の日付	平成 年 月 日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	理学研究科 生物科学専攻
(学位論文題目) A molecular chaperone complex as a protein folding machine involved in collagen biosynthesis (コラーゲン生合成における、タンパク製造機としての分子シャペロン複合体)	
論文調査委員	(主査) 永田 和宏 教授 大野 睦人 教授 森 和俊 教授

理学研究科

(続紙 1)

京都大学	博士 (理 学)	氏名	石川 善弘
論文題目	A molecular chaperone complex as a protein folding machine involved in collagen biosynthesis (コラーゲン生合成における、タンパク製造機としての分子シャペロン複合体)		
(論文内容の要旨)			
<p>コラーゲンは生体内に最も豊富に存在する細胞外マトリックスタンパク質である。その合成には多くの分子シャペロンやフォールディング酵素が関与し、コラーゲンはたくさんの翻訳修飾を受けることが知られている。Hsp47、Protein disulfide Isomerase (PDI)や collagen prolyl 4-hydroxylase (cP4H)などはその代表であるが、生化学的な機能が同定されていない分子が多数存在する。近年これらのコラーゲン関連タンパク質の遺伝的疾患が骨形成不全症(osteogenesis imperfecta)を引き起こすことが報告されている。本研究では機能未同定のコラーゲン関連タンパク質の解析を行った。</p> <p>小胞体に局在するタンパク質 FK506-binding protein 65kDa (FKBP65)は出生前のニワトリの小胞体よりゼラチンカラムを使って精製できる。ゼラチンへの結合はコラーゲンの生合成への関与が示唆される。過去にこのタンパク質はプロリンの異性化活性を持っているにも関わらず、コラーゲンの三本鎖形成にほとんど影響がないことが当研究室から報告されていた。このタンパク質は4つのFKBPドメインにより構成されている。近年このFKBPドメインがタンパク質の凝集を阻害するシャペロン活性を有している報告がなされていることから、FKBP65に関してシャペロン活性の有無を検証した。2つのモデル基質に対して有意な活性を確認できたため、目的の基質であるコラーゲン対しての活性を測定した。その結果コラーゲンに対して変性温度の上昇と繊維化を阻害する活性が認められた。よってFKBP65はコラーゲンに相互作用する分子シャペロンである可能性が示唆された。</p> <p>次にFKBP65同様に機能が分かっていないP3H1/CRTAP/CypB複合体についても機能の同定を行った。P3H1のN末端ドメインおよびCRTAPはその構造的特徴がPDIに似ていることがアミノ酸配列より推測された。そこでPDIの持つ活性に注目して実験を行った。その結果、非常に有意なシャペロン活性を持っていることがモデル基質に対して確認された。また複合体を構成するタンパク質CypBの本来持っている活性(プロリンの異性化活性)が、複合体状態でも機能するかを検証した。モデル基質であるプロリンを含むペプチドに対して、有意な活性を測定できた。次に、これらの活性が目的の基質であるコラーゲンに対し作用するかの実験を行った。FKBP65の時と同様、それらの活性はコラーゲンへの影響が認められた。またコラーゲンへの結合様式を検討すべく、表面プラズモン共鳴(BIACore)を用いて詳細を解析した。その結果コラーゲン3本鎖へ結合後、3本鎖から複合体が非常に速い速度で乖離することが予想された。以上これらの実験結果より、この複合体は多機能タンパク質としてコラーゲンの生合成に関与し1本鎖から3本鎖への状態の移行時に重要な役割を果たしている可能性を見出した。</p> <p>以上の結果、FKBP65およびP3H1/CRTAP/CypB複合体はコラーゲンと相互作用する新規の分子シャペロンであると考えられる。そして、それらの活性は生合成の過程で重要な機能を担っていると推測される。またこれらタンパク質の機能同定は複雑なコラーゲン生合成のメカニズムの解明、分子シャペロン関与形の骨形成不全症の発症メカニズムの解明につながる研究結果であると思われる。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

本研究はコラーゲン生合成に関与するタンパク質の機能同定に関する研究であり、前半部・後半部の二部構成である。前半部では FKBP65、後半部では P3H1/CRTAP/CypB 複合体の機能同定に関する発表である。

FKBP65 は小胞体内でコラーゲンと結合するタンパク質として同定されていたが、コラーゲン生合成に関するその役割は未だよく判っていなかった。FKBP65 の持つ FKBP ドメインに有意なシャペロン活性が見られ、コラーゲンの変性温度への寄与と繊維化を阻害することを確認した。コラーゲンは体温付近で不安定であることが示唆されているため、安定化させる分子の存在が提唱されてきた。Hsp47 はコラーゲンに特異的に結合する分子として同定されていたが、細長いコラーゲン分子を Hsp47 だけで安定化することが出来るのか大きな疑問であった。FKBP65 の変性温度への影響はこの問題を考える上で非常に示唆に富む結果であった。また ER 内で起こる、コラーゲン分子間の相互作用(繊維化)は凝集蓄積を引き起こすことが知られている。しかしコラーゲンは分子間の相互作用を起こしやすい特性を持っていることから、それらを ER 内で阻害する分子が必要であった。変性温度同様、Hsp47 がその役割を果たす分子として唯一報告されていたが、今回の結果より、FKBP65 もその役割を担っている可能性が予想された。

次に P3H1/CRTAP/CypB 複合体は、その構成分子の機能欠陥が骨形成不全症を引き起こすと言う報告が多数されていたが、その機能は未だ同定されていなかった。この複合体の機能解析は病気発症のメカニズムを解明する上で重要であると予想された。この複合体はコラーゲンの生合成時に、多機能複合体として機能している可能性が示唆された。コラーゲンはプロリン残基を多く含む分子で、その異性化は 3 本鎖形成時の律速になることが知られている。今回同定した 2 つの機能(シャペロン活性および、プロリン異性化活性)はこの律速段階をスムーズに移行させる役割を担っていると考えることができた。プロリンの異性化が起こった箇所は当初不安定であろうと予想される。その部分を一時的に安定化させるために、複合体のシャペロン活性は機能していると思われる。また 3 本鎖からの速い乖離は、生合成をスムーズに行うために合理的な結合様式であると推測できる。

以上の結果はコラーゲンの複雑な生合成のメカニズムを解明する上で重要な知見となった。さらに、分子シャペロンの機能欠陥による骨形成不全症の発症メカニズムの解明につながると期待できる。よって本論文は博士(理学)の学位論文として価値あるものと認める。また、平成 22 年 1 月 20 日論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。