

学位論文の要約

題目 Structural studies on the mechanism of protein folding

氏名 花園祐矢

序論

タンパク質はリボソームで mRNA からタンパク質に翻訳され、合成された新生タンパク質は中間体を経て熱力学的に安定な構造に折りたたまれる。しかし、フォールディング中間体の一部は、自由エネルギーの極小値に捕捉されてしまい、正しい構造へと折りたたまれないものもある。部分的に折りたたまれたタンパク質や誤って折りたたまれたタンパク質は、本来タンパク質の内側にある疎水性領域がタンパク質表面に露出するため、凝集が起りやすくなる。さらに、細胞中でタンパク質が正しく機能するためには、正しく折りたたまれた後も構造を維持する必要がある。細胞中では、分子シャペロンと呼ばれるタンパク質がタンパク質の折りたたみの手助けや凝集を防ぐ働きを持つことが知られている。本学位論文では、新生タンパク質のフォールディングおよび、小型熱ショックタンパク質(sHsp)に関して X 線結晶構造解析や円二色性スペクトル法を中心として研究を行った。

第 1 章 新生タンパク質のフォールディング機構解明

全長のタンパク質は非常に速い速度で折りたたまれる。それに対し、新生タンパク質の折りたたみはリボソームでの翻訳速度に依存する。さらに、全長のタンパク質ではすべての残基が一度に折りたたまれるのに対し、新生タンパク質では N 末から順次折りたたむことが出来る。そのため、新生タンパク質は翻訳に共役して折りたたまれる(co-translational folding)。しかしながら、新生タンパク質の形成する一時的な構造やその折りたたみ機構に関しては分かっていないことが多い。そこで α ヘリックスで構成された λ リプレッサーの N 末ドメイン、 β シートで構成された hPin1 (human peptidyl-prolyl cis/trans isomerase 1) の WW ドメインの二つのタンパク質を用いて X 線結晶構造解析、円二色性スペクトル法を用いて研究を行った。

まず、半分の長さの λ リプレッサーの N 末ドメインの結晶構造を 2.0 Å で決定した。N 末ドメインの C 末端はリボソームの構造を真似てマルトース結合タンパク質(MBP)を融合させた状態で構造解析を行った。半分の構造でも全長構造と同じようにヘリックスで構成された構造を形成しており、ヘリックスをとっている領域もほぼ同じだった。しかしながら、ヘリックス間の相互作用は全長構造とは異なるものであった。Co-translational folding では、始めにヘリックス 1

とヘリックス 2 が一時的な相互作用を形成する。リボソームでのタンパク質の伸長に伴い、一時的な相互作用を経ながら天然構造へと折りたたみが進んでいくと考えられる。

次に、N 末から一連の長さの WW ドメインについて C 末に MBP を融合させた状態で構造解析を行った。WW ドメインは天然構造ではヘリックス領域を含まないにも関わらず、途中の長さの構造では、ヘリックス構造を形成していた。一方、全長構造ではネイティブ構造と同様にシート構造を形成していた。さらに、途中の長さの構造では全長構造においてループ構造を形成している領域でも異なる構造を形成していた。新生タンパク質は最終的に β シートになる構造であってもヘリックスを取りやすい配列であればヘリックス構造を形成する。新生タンパク質のフォールディングでは、最も安定な構造をとりながら折りたたまれる。

第 2 章 小型熱ショックタンパク質の構造解析

分子シャペロン的一种である小型熱ショックタンパク質(sHsp)は、熱ストレスによって変性しかけたタンパク質(基質)と相互作用し、凝集を防ぐ働きを持つ。sHsp は非ストレス下では、種によって異なる 12-40 のサブユニットで構成された単分散なオリゴマーを形成している。熱ストレス下において四次構造を変化させることで、変性タンパク質との相互作用をコントロールしている。しかしながら、sHsp がどのようにオリゴマー状態を制御し、タンパク質の凝集を防いでいるのか明らかになっていない。そこで sHsp の活性化機構を明らかにするために好熱好酸性 *Sulfolobus tokodaii* 由来 StHsp14.0 および分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* 由来 SpHsp16.0 について結晶構造解析および生化学的実験を行った。

四次構造変化の詳細を明らかにするため、24 量体である野生型 StHsp14.0、多量体形成に重要な IXI/V モチーフを含む C 末領域 8 残基を削除した二量体である C 末欠損体、および C 末欠損体と C 末領域ペプチド(VIKIE)の複合体構造を明らかにした。StHsp14.0 野生型の構造は、432 対称を持つ正八面体構造を形成していることが明らかになった。また、C 末欠損体の構造から、二量体状態でも 24 量体中の構造とほとんど変わらないことが明らかになった。唯一異なる点は、StHsp14.0 C 末ドメインとの相互作用がないため、多量体形成部位に構造変化が見られた。二量体間の相互作用は比較的弱いことがゲルろ過クロマトグラフィーから示された。多くの弱い相互作用によって引き起こされる小さな構造変化が StHsp14.0 の活性化を引き起こすと考えられる。

また、SpHsp16.0 は、X 線結晶構造解析によって、2.4 Å 分解能での野生型構造を決定した。結晶構造から、SpHsp16.0 は 422 対称を持つ長楕円体状の 16 量体構造を形成していた。基本単位である二量体構造において、4 回軸の周りがある極側のモノマーと 2 回軸の周りがある赤道面側のモノマーとでは隣接分子との相互作用において相違が見られ、N 末領域と C 末領域の構造もそれぞれで大きく異なっていた。sHsp の非対称性を制御することがシャペロン機能の活性化の制御に大きな役割を果たすと考えられる。