

(続紙 1)

京都大学	博士 (理学)	氏名	花園 祐 矢
論文題目	Structural studies on the mechanism of protein folding (タンパク質のフォールディング機構に関する構造生物学的研究)		
(論文内容の要旨)			
<p>リボソームで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、正しい構造に折りたたまれない中間体では、本来分子の内側にある疎水性領域がタンパク質表面に露出して、凝集が起りやすくなる。さらに、細胞中で折りたたまれた構造を維持するために、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分子シャペロンと呼ばれるタンパク質が機能している。本論文では、新生タンパク質の折りたたみ機構、ならびに分子シャペロンの一つである小型熱ショックタンパク質、sHspの構造と機能を解明する目的で研究を行った。</p> <p>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まれる。すなわち、新生タンパク質はリボソームでの翻訳に共役した折りたたみが起こる (co-translational folding)。リボソーム上にある新生タンパク質の折りたたみ機構はよく分かっていない。本論文では、新生タンパク質の折りたたみ機構解明のため、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ヒト由来ペプチジルプロリル シス/トランス異性化酵素 1 (hPin1) のWWドメインという二つのタンパク質を対象に、X線結晶構造解析、円二色性スペクトル法などの手法を用いて研究を行った。</p> <p>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分解能で決定した。この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。半分の長さの構造でも、全長構造と同じようにヘリックスで構造を形成しており、ヘリックス領域もほぼ同じであるが、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。</p> <p>また、N末からの長さが異なるWWドメイン断片について、C末にMBPを融合させた状態での構造解析を行った。天然構造ではWWドメインはヘリックス領域がないにも関わらず、全長に満たない長さの断片ではヘリックス構造を形成していた。一方、MBPを融合させた状態での全長構造では、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、このような断片の構造では、全長構造でループ構造を形成している領域も異なる構造を形成していた。</p> <p>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はじめたタンパク質(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12~40のサブユニットからなる単分散のオリゴマー構造を形成しており、熱ストレス下においては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制御している。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<i>Sulfolobus tokodaii</i>由来StHsp14.0および分裂酵母<i>Schizosaccharomyces pombe</i>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。</p>			

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。その結果、StHsp14.0野生型は、432対称を持つ正八面体構造を形成していること、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。唯一異なるのは、StHsp14.0の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ことである。さらには、ゲルろ過クロマトグラフィーなどから、それぞれの相互作用の大きさの程度を検討した。

SpHsp16.0野生型の結晶構造を2.4 Å分解能で決定した。SpHsp16.0は422対称を持つ長楕円体状の16量体構造であることがわかり、基本単位である二量体構造において、異なる位置にある二種のモノマーで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ることを明らかにした。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

本論文では、タンパク質の折りたたみに関する分子機構を明らかにすることを目的として、リボソームで合成された新生タンパク質モデル分子、および分子シャペロンの一つである小型熱ショックタンパク質 (sHsp) を対象に、X線結晶構造解析を主たる手法に用いた研究を行っている。

リボソーム上にある新生タンパク質が形成する一時的な構造やその折りたたみ機構についての知見を得るため、二つのモデルタンパク質に対して、X線解析、円二色性スペクトル法などの手法を用いて研究を行った。一つは 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、もう一つは β シートで構成されたヒト由来ペプチジルプロリル シス/トランス異性化酵素 1 (hPin1) のWWドメインで、それぞれのモデルタンパク質のC末端にはマルトース結合タンパク質 (MBP) を融合させて、リボソーム上の構造に類似させた状態にしている。 λ リプレッサーのN末ドメインでは、本来の長さの半分のもの結晶構造を決定し、全長構造とほぼ同じように構成されているヘリックス間の相互作用が、全長構造のものとは異なることを見いだしている。その結果から、Co-translational foldingでははじめに二つのヘリックスが一時的な相互作用をし、リボソームでのタンパク質の伸長に伴って、天然構造へと折りたたみが進むと結論している。一方、WWドメインでは、N末からの長さが異なる断片の構造を決定し、天然構造ではヘリックスではない領域が、断片ではヘリックス構造を形成していること、全長構造でループ構造を形成している領域が異なる構造をしていること、MBPを融合させた全長構造は天然構造と同様のシート構造を形成していることなどを明らかにしている。新生タンパク質では、最終的には 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はヘリックス構造を形成でき、最も安定な構造をとりながら折りたたまれると結論している。

小型熱ショックタンパク質、sHspの構造研究では、その活性化機構を明らかにすることを目的として、二種のsHspの結晶構造解析および生化学的実験を行っている。野生型StHsp14.0、C末領域8残基欠損体、およびこのC末欠損体とC末領域ペプチドとの複合体の構造解析の結果から、StHsp14.0の二量体間相互作用を検討し、それぞれの相互作用は比較的弱い、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結論している。SpHsp16.0の野生型構造からは、基本単位である二量体構造では、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ることから、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ことを明らかにしている。

本論文でこれらの知見を得たことは、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26年1月14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。

要旨公表可能日： 年 月 日以降