

|         |                                                                                   |
|---------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| 氏 名     | みずののぶひろ<br>水 野 伸 宏                                                                |
| 学位の種類   | 博 士 (理 学)                                                                         |
| 学位記番号   | 理 博 第 2785 号                                                                      |
| 学位授与の日付 | 平 成 16 年 3 月 23 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 化 学 専 攻                                                                 |
| 学位論文題目  | Structure-based functional analysis of DsrD protein<br>(立体構造に基づく DsrD タンパク質の機能解析) |

論文調査委員 (主 査) 教 授 三 木 邦 夫 教 授 伊 藤 維 昭 教 授 藤 井 紀 子

### 論 文 内 容 の 要 旨

硫酸還元細菌 *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough 由来の DsrD (dissimilatory sulfite reductase D) タンパク質は, *dsr* オペロン上で異化的亜硫酸還元酵素 DsrAB の直後に配置されている。このタンパク質にはリジン残基が多く存在し, 種間で保存されていることから, 陰イオン, 特に亜硫酸イオンを結合し運搬するタンパク質ではないかと予測されていた。しかし, DsrD が亜硫酸イオンと強く結合することは生化学的な実験からは証明されておらず, このタンパク質の本当の機能は明らかとなっていない。一方, *Bilophila wadsworthia* 由来の DsrD は亜硫酸還元酵素のサブユニット DsrB と融合していることから, 亜硫酸還元の酵素触媒反応に, 重要な役割を持つことも考えられている。本研究ではその機能を立体構造に基づいて考察するため, X線結晶構造解析を行った。

DsrD タンパク質は, 硫酸アンモニウムを沈殿剤として, 蒸気拡散法で結晶化した。結晶の空間群は  $P2_12_12_1$  であり, 格子定数は  $a=60.03\text{ \AA}$ ,  $b=64.56\text{ \AA}$ ,  $c=45.22\text{ \AA}$  であった。X線回折実験は温度 100 K において放射光 X 線を用いて行い, 分解能  $1.2\text{ \AA}$  に達する高分解能データを収集した。立体構造は Au 誘導体による単一同形置換法に異常分散を考慮して決定した。初期電子密度は, 溶媒密度平衡化・非結晶学的対称分子の電子密度平均化などによって, 主鎖・側鎖を十分同定できるまで改善し, それを元に初期モデルを構築した。構造の精密化には SHELX プログラムを用い, 分解能  $1.2\text{ \AA}$  での  $R$  値は 13.9% であった。

結晶構造解析の結果, DsrD は結晶の非対称単位中に 2 分子存在し, その分子表面上に 5 つの硫酸イオンが結合していることがわかった。また, 分子全体が DNA 結合タンパク質に特有な winged-helix モチーフを持つことを明らかにした。しかしながら, 当初予測していた亜硫酸を結合する機能を確認することはできなかった。立体構造から機能を明らかにすることを目的として, DsrD と類似構造を持つタンパク質を検索したところ, 予想通り DNA 結合タンパク質と高い構造の類似性を示した。最も類似性の高いタンパク質は, Z 型 DNA 結合タンパク質である二重鎖 RNA アデノシンデアミナーゼの  $Z\alpha$  ドメインであった。またこれらの分子の中心構造は, DNA 結合タンパク質の間でよく保存されている疎水性残基による分子内相互作用によって構築されていることを見出した。DsrD も同様の保存された疎水性残基を持つことから, DsrD を含むこれらのタンパク質は立体構造的に同じスーパーファミリーに属していると考察し, DsrD は核酸結合タンパク質の可能性が高いと結論した。結晶中に見出された DsrD の二量体構造では, その認識ヘリックス間の距離・角度から B-DNA への結合は困難であると推測される。実際にマスペクトルを用いた分子量測定結果では溶液中において二量体を形成している可能性は低いと考えられた。これらの結果より, DsrD は単量体で DNA や RNA に結合する可能性が高く, 亜硫酸還元酵素 (DsrAB) の酵素触媒反応に関わるタンパク質の転写, 翻訳に関与しているのではないかと推論した。

### 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

本論文は, 亜硫酸還元酵素の遺伝子オペロン内に見出された DsrD タンパク質の機能をその立体構造から解明し, 生体内

での役割を理解することを目指した研究に関するものである。

本研究ではまず、大腸菌に構築した大量発現系から目的とするDsrDを抽出した後、このタンパク質を精製している。その後、X線回折実験に適した単結晶、および重原子（Au）誘導体結晶の調製に成功し、これらの結晶について放射線X線を利用して回折データを収集し、結晶の空間群・格子定数など結晶学的データを決定している。また、Au誘導体結晶においてはAu原子が有効な誘導体であることを示し、結晶格子内での位置などを決定している。

結晶学的データを決定した後、さらに結晶化条件を最適化し、大型放射光施設・SPring-8でのX線回折実験に必要な低温回折実験（100 K）に適した条件を見出している。これによりネイティブ結晶については高分解能の回折データの収集に、またAu誘導体については高精度の異常分散効果の観測に成功している。これらの回折データを用いて結晶構造解析を進め、Au誘導体の異常分散を考慮した単一同形置換法によって初期位相を得て、分子の境界領域を決定することに成功している。電子密度平均化法などで位相を改善して構築したDsrDの立体構造を精密化した結果、分解能1.2 ÅでR値13.9%という最終構造を得ている。

これまでDsrDとアミノ酸配列が類似したタンパク質の構造解析例はなかったが、本構造解析の結果、DsrDがDNA結合タンパク質に特徴的なWinged-helixモチーフを持つことがわかり、このモチーフを形成するためには疎水性アミノ酸残基の配列が重要な意味を持つことを見出している。また本構造は、Z-DNAに結合することが確認された二重鎖RNAアデノシンデアミナーゼのZ $\alpha$ ドメインと類似していることがわかった。当初、DsrDは亜硫酸イオントランスポーターとしての役割が予想されており、結晶構造中にも硫酸イオンが見出されたが、トランスポーターとしての機能を証明するには及ばなかった。しかしDNAと結合したモデル構造を構築して、DNAとの相互作用を検討した結果、(1) 結晶構造内の5個の硫酸イオンはDNAのリン酸イオンと接触するアミノ酸に結合していること、(2) DsrDのDNAと接触する部位の電荷分布が他のDNA結合タンパク質と類似することを見出し、「DsrDはDNA/RNA結合タンパク質の可能性が高い」ことを示唆するに至っている。また、その機能については、亜硫酸還元触媒機能への関与に加えて、その酵素の転写・翻訳に関与するDNAとの相互作用の可能性についても示唆している。本研究は、アミノ酸配列だけでは予想できなかったタンパク質の機能を、その立体構造から考察することに成功した例であると評価することができる。

以上のようにこれらの研究成果は、当該分野の進展に確かな寄与があるものであり、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られる。論文内容とそれに関連する分野について試問した結果、合格と認めた。