

学 位 審 査 報 告 書

(ふ り が な) 氏 名	きだ ひろし 木 田 宗 志
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 22 年 3 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	理学研究科化学専攻
(学位論文題目) Structural studies of prefoldin, a molecular chaperone (分子シャペロン, プレフォルディンの構造研究)	
論 文 調 査 委 員	(主査) 三 木 邦 夫 教授 藤 井 紀 子 教授 杉 山 弘 教授

理 学 研 究 科

京都大学	博 士 (理 学)	氏名	木 田 宗 志
論文題目	Structural studies of prefoldin, a molecular chaperone (分子シャペロン, プレフォルディンの構造研究)		
(論文内容の要旨)			
プレフォルディン (PFD) は分子量 90 kDa からなる分子シャペロンの一種で, 新規に合成されたタンパク質あるいは変性タンパク質に結合し, シャペロニンに受け渡すことでその折れたたみを助けるタンパク質である. 古細菌 PFD は α および β サブユニットによって形成されているのに対して, 真核生物 PFD はすべて異なるサブユニットから形成されている. この違いは両者の基質特異性の違いを反映していると考えられている. 古細菌 PFD は一種の結晶構造でくらげ様構造を形成していることが明らかになっていたが, 本論文では, PFD がどのように基質と相互作用するのかについて解明するため, 超好熱古細菌 <i>Pyrococcus horikoshii</i> OT3 由来 PFD (PhPFD) の結晶構造解析を行い, PhPFD と基質の相互作用状態について考察を行った. PhPFD の結晶は PEG 400 を沈殿剤として得られ, 3 Å 分解能で R 値 24.0% (R_{free} 値 27.7%) まで構造を精密化した. 全体構造は他種と同様のくらげ様構造であったが, 各サブユニットの構造比較から, β サブユニットのコイルドコイル末端が一部 disorder していることや, α サブユニットのコイルドコイルの折れ曲がっている位置が異なっていることが新たに明らかになった. 結晶内における分子間の相互作用から, PhPFD と基質との間には, α サブユニットでは親水性相互作用が β サブユニットでは疎水性相互作用が形成しうることを示した. この結果は, 変性インスリンを基質とした分子動力学計算からも支持された. また, 超好熱古細菌 <i>Thermococcus</i> strain KS-1 由来 PFD (TsPFD) の結晶化では, 予想していなかった TsPFD β サブユニットだけを含む結晶が得られた. この結晶は 1,2-ペンタジオールを主な沈殿剤として得られ, 1.9 Å 分解能で R 値 17.7% (R_{free} 値 19.4%) まで構造を精密化した. 全体構造は 4 本のコイルドコイルと 1 つの β バレルからなるくらげ様構造を形成していた. この β サブユニットだけからなる複合体は, インスリンなど比較的小さなタンパク質に対して分子シャペロン活性を持つことがわかった. 一方, 真核生物 PFD は細胞骨格を形成するアクチンやチューブリンの正しい折れたたみに関与しており, その機能は生物にとって重要であるにも関わらず, これまでの構造学的および生化学的研究は乏しい. その理由として, 真核生物 PFD はヘテロ 6 量体で組み換え体の作製が難しいことがあげられるが, 本論文では, これを克服して, ヒト PFD (HsPFD) の大腸菌での大量発現および高純度精製の新しい方法を確立し, その結晶化にも成功した. 結晶は 6.5 Å 分解能の回折を示し (空間群 $P2_1$), SEC-MALS による分子量測定, MALDI-TOF-MS によるサブユニットの分子量測定, CD スペクトルによる二次構造予測の結果, 正しいサブユニット比で六量体を形成しており, 古細菌と似たくらげ様の複合体構造をしていることが示唆された.			

(論文審査の結果の要旨)

PFD は分子シャペロンの一つであり，新規に合成されたポリペプチド鎖や，変性タンパク質に結合し，シャペロニンへの受け渡しによって，それらの正しい折れたたみを助けるタンパク質である．古細菌 PFD は α ， β サブユニットから構成され，ヒト PFD は 6 つの異なるサブユニットから構成されている．本論文では，二種類の古細菌由来 PFD の結晶構造を決定し，また，新しい方法でヒト由来 PFD の発現・精製を行い，PFD の分子的機能および諸性質についての考察を行っている．

超好熱古細菌 *Pyrococcus horikoshii* OT3 由来 PFD (PhPFD) の X 線結晶解析においては，得られた立体構造に基づいて PhPFD が基質を捕捉するときの分子機構を提唱している．結晶中における PhPFD の分子間の相互作用から， β サブユニットは基質との結合において疎水性相互作用を， α サブユニットは親水性相互作用を形成しうることが明らかになっている．さらに結晶構造から， β サブユニットのコイルドコイル末端の disorder はこの疎水性相互作用により引き起こされ，末端の構造変化が基質との結合に寄与している可能性を推定している．

超好熱古細菌 *Thermococcus* strain KS-1 由来 PFD (TsPFD) の X 線結晶解析においては，TsPFD の β サブユニットで構成される四量体構造を明らかにしている．全体構造は 4 本のコイルドコイルと 1 つの β バレルからなるくらげ様構造を形成しており，この β サブユニット四量体の活性測定の結果，比較的小さな分子に対して，変性タンパク質の凝集を押さえる分子シャペロン活性を有していることを明らかにしている．また TsPFD の結晶化において α サブユニットが解離した原因について，結晶化条件の pH が 4.2 と低い値であったことを推定し，これを検証している．

真核生物であるヒト由来 PFD (HsPFD) の新しい大量発現法およびリフォールディングを用いない精製法を確立し，その結晶化に成功している．精製試料にはすべての必要なサブユニットが含まれていることを確認し，PEG 3350 を沈殿剤として 6.5 Å 分解能の回折を与える結晶 (空間群 $P2_1$) を得ることに成功している．得られた HsPFD は，SEC-MALS による分子量の測定および CD スペクトルより導かれる二次構造の予測により，古細菌と似たくらげ様構造を形成していることを見いだしている．

以上のように，本研究は，重要な分子シャペロンの一つであるプレフォールディングの結晶学的研究を行い，その分子的機能および諸性質についての重要な知見を得たものと評価することができる．これらの研究結果は当該研究分野の発展に大きな寄与を果たすものであり，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られた．また，平成 22 年 1 月 20 日に論文内容とそれに関連する分野について口頭試問を行った結果，合格と認められた．