

氏 名	きた の けん 北 野 健
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	理 博 第 2316 号
学位授与の日付	平 成 13 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	Crystallographic studies of decameric protein complexes with pentagonal symmetry (5 回対称10量体構造をもつタンパク質複合体の結晶学的研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 三 木 邦 夫 教 授 伊 藤 維 昭 教 授 丸 岡 啓 二

論 文 内 容 の 要 旨

以下の3種類のタンパク質を対象として、X線結晶解析による立体構造決定を目指した研究を行った。

1) 始原菌由来 Rubisco: リブロースビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ (Rubisco) は、光合成の炭酸還元回路のカルボキシル化過程に作用し、リブロース1,5-二リン酸に二酸化炭素を付加して2分子の3-ホスホグリセリン酸を生成する。無機炭素を有機炭素に変換するこの炭酸固定反応は、光合成による生命エネルギー獲得の原点であるが、大気中にごく微量にしか存在しない二酸化炭素を Rubisco が選択的に獲得するメカニズムには、未だ不明な点が多い。これまでに、植物および光合成細菌由来の Rubisco の結晶構造が明らかにされ、立体構造上の違いからタイプ I、タイプ II と分類されている。一方、非常に高い至適生育温度 (95°C) をもつ超好熱始原菌 *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 由来の Rubisco (*Tk*-Rubisco) は、相互のアミノ酸配列に極めて高い相同性がある植物や細菌由来の Rubisco と比べて低い相同性しか示さず、系統発生論的に異なったタイプ (タイプ III) に分類されるべきものと考えられる。本研究では、始原菌由来の Rubisco の立体構造についての知見を得るために、*Tk*-Rubisco の結晶構造解析を行った。*Tk*-Rubisco は、硫酸アンモニウムを用いて結晶化し、Photon Factory の放射光を用いた X 線回折実験を行い、分解能 2.8 Å の反射データを得た。構造解析は異常分散効果を考慮した単波長での重原子同形置換法で行い、2.8 Å 分解能での精密化構造を得た。最終構造の結晶学的 *R* 値は 22.4% (*R*free は 25.4%) と妥当なものであった。結晶構造解析の結果、*Tk*-Rubisco は、Large subunit の 2 量体が 5 つ、5 回対称軸に沿ってリング上に並んで 10 量体を形成していることが明らかになった。

2) AhpC タンパク質: 過酸化物は酸素存在下で種々の要因により容易に生成され、細胞のがん化、糖尿病、老化をはじめ、種々の疾病の要因になり、過酸化物の分解は、好氣的代謝を営む生物にとって不可欠の反応である。中でも、酸素から容易に生じる過酸化水素の分解は重要な反応であるが、これまでは、この反応を担う酵素としては、カタラーゼとペルオキシダーゼが知られていたが、近年、AhpC とよばれる新規の過酸化物分解酵素が、微生物のみならず植物、動物さらにヒトでも発見された。細菌 *Amphibacillus xylanus* は、カタラーゼとペルオキシダーゼを欠如するが好氣的に生育する菌株として単離され、この細菌由来の AhpC タンパク質は、分子量 20kDa の過酸化物分解酵素で、NADH oxidase とともに、細胞にとって有害な過酸化物を、既知の過酸化物分解反応にない高い基質親和力と高速反応性で強力に分解する。本研究では AhpC の立体構造の知見を得るために X 線結晶構造解析を行った。AhpC はポリエチレングリコール 6000 と酢酸アンモニウムを沈殿剤として結晶化した。Photon Factory の放射光を用いて X 線回折実験を行い、分解能 2.8 Å の反射データを得た。結晶の自己回転関数から分子の会合状態を検討し、動的光散乱法および活性測定の実験から、イオン強度と活性および会合状態の関係を議論した。

3) GrpE タンパク質: 多くのタンパク質は、細胞内で合成された際、それ自身では正しい立体構造をとれない。シャペロンは合成されたタンパク質分子の、正しい折れたたみを補助するタンパク質である。GrpE タンパク質は、シャペロンとして知られる熱ショックタンパク質 70 ファミリーの DnaK タンパク質の、ヌクレオチド交換因子である。本研究では、高度

好熱菌 *Thermus thermophilus* 由来の GrpE タンパク質を対象として、その遺伝子を組み込んだ大腸菌で目的タンパク質を大量発現させ、DEAE-陰イオンクロマトグラフィー、Butyl-疎水クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィーによって、結晶化に用いるタンパク質を精製した。精製した GrpE タンパク質サンプルを用いて結晶化実験を行い、その結晶化の過程を詳細に検討して、結晶化に及ぼす温度変化の影響を議論した。

論文審査の結果の要旨

本論文は、リブローズビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ (Rubisco), AhpC タンパク質, GrpE タンパク質という3種類のタンパク質を対象として、X線結晶解析による立体構造決定を目指した研究を行ったものである。

始原菌由来の Rubisco (*Tk*-Rubisco) については、その結晶化を行い、異常分散効果を考慮した単波長での重原子同置換法によって、2.8 Å 分解能での精密な結晶構造を得ることに成功している。これは始原菌由来の Rubisco としては初めて、その立体構造を決定したものである。立体構造は、Large subunit の2量体が5つ、5回対称軸に沿ってリング上に並んだ10量体構造を形成していた。これは、従来知られていたタイプ I, タイプ II の Rubisco とは全く異なる会合状態で、この超好熱性始原菌由来の Rubisco タンパク質が、まったく新しい超分子状態を形成をしていることを明らかにした。また、*Tk*-Rubisco の10量体会合面にはイオン性残基が密集しており、2量体どうしがイオン結合のネットワークによって強固に結びつけられていることも明らかになった。これは、本酵素が95°Cの高温でも安定であることに大きく寄与していると考えられる。以上の結果は、*Tk*-Rubisco が新しいタイプの Rubisco (タイプ III) に分類されるべきことを強く支持するものであり、タンパク質の超分子形成機構を考察する上での有益な研究結果であると同時に、始原菌の進化に関しても重要な知見を与えるものである。

細菌由来の AhpC タンパク質の研究では、その結晶化を行い、分解能 2.8 Å の X 線回折データから計算した自己回転関数から、結晶の非対称単位中に5分子が存在し、AhpC は5つの2量体がリング状に配列した10量体を形成していることを明らかにした。結晶に問題があり構造決定には至らなかったが、動的光散乱法の実験から、AhpC がこのような10量体を形成するためには、適当なイオン強度が必要であることを明らかにし、さらに活性測定の実験を行い、AhpC タンパク質がその機能を発現するためには、AhpC の10量体超分子形成が不可欠であることを解明した。

高度好熱菌由来の GrpE タンパク質の研究では、温度一定の蒸気拡散法では決して結晶化されず、40°C から 20°C に徐々に冷却することによって初めて結晶化できることを明らかにした。これは温度制御によってのみ、過飽和状態を作り出して結晶化を成功させた初めての例であり、このような熱誘導法を用いたタンパク質結晶化が、結晶化が困難なタンパク質に対する新たな結晶化のアプローチになりうることを示した。

以上に示した研究成果は、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)の学位論文として十分な価値があるものと認められた。また、本論文の研究内容とそれに関連した研究分野についての口頭試問を行った結果、合格と認めた。