

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻

平成9年度博士課程 進学

氏名 鈴木 倫太郎

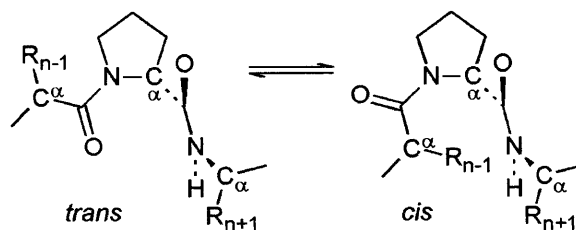
指導教官名 田之倉 優

論文題目

好熱古細菌 *Methanococcus thermolithotrophicus* 由来FK506結合タンパク質の
NMRによるPPIase活性測定および機能の研究

Anfinsenによるタンパク質の巻き戻し実験以降、タンパク質は自発的にフォールドすると考えられてきた。しかし、現在では多くのタンパク質がさまざまなタンパク質性の因子によって、フォールディングを助けられていることがわかっている。これらの因子は、フォールディング経路の律速段階を促進するフォールダーゼと、凝集や間違っただフォールディングからできたのポリペプチドを保護するシャペロンの二つのグループに分けられる。細胞内のタンパク質のフォールディングにおいて、シャペロンが重要な役割をはたしていることはすでによく知られている。また、タンパク質のフォールディングには二つの主な律速段階、ジスルフィド結合の形成およびプロリン残基とその前の残基の間のペプチド結合の異性化がある。二つのフォールダーゼ、プロテインジスルフィドイソメラーゼとペプチジルプロリル *cis-trans* イソメラーゼ (PPIase) は、これらの反応を促進することでタンパク質のフォールディングを促進すると考えられている。

一方20世紀の間にさまざまな極限環境で生育する微生物が次々と発見された。それらのうち幾つかはすでに全遺伝子が解読されているが、それぞれの生育環境における遺



Scheme 1.

伝子産物の挙動はほとんど明らかになっていない。好熱菌や超好熱菌のタンパク質の高温条件下でのフォールディングはその一つである。特にPPIaseの触媒するプロリンの異性化(Scheme 1)は酵素がなくても起こる単純な化学交換反応であり、高温では低温時よりもはるかに速い反応になる。また、最近フォールダーゼにはシャペロンの機能を持つものが多いことがわかり、一般的にもPPIase活性の生理的意味を疑問視する声が上がっている。しかし、調べられた限り好熱菌と超好熱菌を含むすべての生物でPPIaseが見つかったことは、何らかの生理的意義をPPIase活性が担うことを示唆している。本研究では好熱菌におけるPPIase活性の役割を明らかにするために、好熱古細菌 *Methanococcus thermolithotrophicus* が持つ PPIase である FK506 結合タンパク質 (MtFKBP17) を用いて、これまで行われていなかった NMR による高温での活性測定を行い、その機能を検討した。また MtFKBP17 の NMR の化学シフトを帰属し、その機能と構造の関係を考察した。

1. NMRによるMtFKBP17のPPIase活性測定

プロリンとその前の残基の間のペプチド結合の異性化の速度、およびPPIaseによるその促進は一般にキモトリプシン法によって測定されている。この方法ではまずtrans型ペプチドを過剰量のキモトリプシンですべて切断し、残ったcis型ペプチドからtrans型への異性化が系全体の律速となることを利用して、キモトリプシンによる切断を異性化反応のかわりに検出する。キモトリプシン以外のプロテアーゼを使用することで異なる配列の基質に対する活性を測定することも行われているが、それでもこの方法は基質の配列に制限が多く、また異性化が速くなると測定できなくなるため高温での測定ができないなどの欠点がある。

これに対し、NMRは基質の配列に制限がほとんどなく、また測定できる反応速度が比較的速い領域にあるので、90°C近くまで測定が可能である。他にも基質濃度はかなり濃くなければならないなど、キモトリプシン法とは違いが多い。NMRを用いて測定する方法にもいくつか知られているが、その中で特に基質ペプチドの配列に制限が少ない方法として2D EXSY NMR法による活性測定を行った。これは10-700 ms程度の反応時間の間に異性化によってcis型からtrans型へあるいはその逆へ変化した分子種の量を2次元NMRにおけるピーク強度から求める方法である。なお、EXSYスペクトルはNOESYスペクトルと同じパルスシーケンスを用いて測定されるが、化学交換の観測を目的とする場合はEXSYスペクトルと呼ばれることが多い。EXSYスペクトルによる測定では、通常の酵素の活性測定とは異なり平衡条件下での反応を観測するため見かけの反応速度は

0であるが、その際の正逆両反応をそれぞれ1次反応として速度定数を求めることができる。

EXSY NMR測定にはJEOL Lambda400を用いた。測定溶媒は20 mM リン酸緩衝液pH 8、100% D₂O、温度は10-50°Cの範囲で変化させ、ペプチド基質は1-8 mM、MtFKBP17は2-10 μMの範囲で測定を行った。一つの条件につき反応時間を変化させて5枚のスペクトルをとり、経時変化から速度定数を求めた。一枚のスペクトルの測定には約6時間30分を要した。また、他にペプチド基質の帰属のためにDQF-COSY、ROESYスペクトルを測定した。MtFKBP17は大腸菌で大量発現させたものを精製して用いた。

測定した基質は Succinyl-L-alanyl-L-leucyl-L-prolyl-L-phenylalanine *p*-nitroanilide (Suc-ALPF-pNa)とRibonuclease T1の39番目のプロリン残基周辺の15残基からなる部分配列 (RtP39)である。前者はキモトリプシン法に用いる蛍光標識された基質であり、後者はPPIase活性の基質としてよく用いられるタンパク質の中の異性化を促進される部位である。25°Cと50°CでのMtFKBP17の活性は、Suc-ALPF-pNaで3倍、RtP39で2倍違っていた。また50°Cで酵素のない条件での反応速度に対する酵素に触媒された反応速度の比は、Suc-ALPF-pNaで16倍、RtP39で70倍であり、高温においてもMtFKBP17が有意なPPIase活性を有していることが明らかになった。また、さらに温度を変えてEyring Plotにより反応の活性化エンタルピーを求めたところ、キモトリプシン法による値と一致し、測定条件が大きく異なるNMR法とキモトリプシン法で同じ反応を観測していることが確認された。キモトリプシン法の結果を高温側に外挿すると50°CではMtFKBP17の活性は酵素のない条件での反応速度にくらべてはるかに小さくなるが、これは酵素濃度が薄いことによるもので、細胞内でのMtFKBP17の濃度(数10 μM)はむしろNMR法の条件に近い。したがってMtFKBP17はそのような高濃度で有意な活性を有する酵素であると言える。このことから本酵素のPPIase活性は高温においても生理的な意味を持ちうると思われる。

2. MtFKBP17のNMR化学シフトの帰属[1]

MtFKBP17の立体構造情報を得るために、¹⁵Nラベル体および¹³C, ¹⁵Nラベル体は大腸菌で発現、精製して化学シフトの帰属を行った。測定にはVarian Unity INOVA500を用いた。¹⁵N-HSQCスペクトルには25°Cと50°Cで大きな違いが見られず、温度による構造の変化は小さいことが示唆された。しかし、50°Cに2週間おいた後のMtFKBP17の¹⁵N-HSQCスペクトルでは、ピークの重なりが激しくなり、また新たに現れた小さなピークが多数観測されるという変化が見られた。これはMtFKBP17の構造が変化し、一部がランダムコイルに近い状態になったことを示唆している。化学

シフトの帰属に用いるスペクトルには3-4週間の測定時間を要するため、以後の帰属は25°Cで行った。主鎖の帰属のために、¹⁵N-TOCSY-HSQC、¹⁵N-NOESY-HSQC、HNCA、CBCA(CO)NH、HNCACB、(HCA)CO(CA)NH、HNCOスペクトルを測定し、C^α、C^β、CO、H^αの化学シフトをこれらのスペクトルを用いて連鎖帰属により決定した。ついで側鎖の帰属を、HC(CO)NH、C(CO)NH、HCCH-TOCSYスペクトルを用いて行った。帰属のためのプログラムとしてはP-ROIシステムおよびSparky 3を用いた。決定した化学シフトの値を用いてプログラムChemical-Shift Index、およびTALOSにより二次構造を予測し、またNOEパターンにより二次構造のトポロジーを解析した。これらの結果からMtFKBP17は構造既知のヒトのFKBPとほぼ同じフォールドを持つことが明らかになった。一方、MtFKBP17にはヒトのFKBPにはない2カ所の挿入配列があるが、これらの部分にも二次構造が存在することがわかった。MtFKBP17はPPIase活性とは別にシャペロン活性を持っており、この活性には2ヶ所の挿入配列のうち、44残基からなる長い挿入配列の寄与が重要であることがわかっていて、この部分には新たにβシートとαヘリックスが見つかり、これらの構造がシャペロン活性に重要な役割を果たしていることが示唆された。原子間ベクトルの運動性を反映するアミドプロトンとアミド窒素間のNOEを測定したところ、この長い挿入配列部分は比較的運動性が高く、ヒトのFKBPとの相同部分とはある程度独立した運動をしていることが示唆された。またもう一つの13残基の挿入配列にはαヘリックスが見つかった。

3. まとめ

一般に酵素活性は極めて薄い酵素濃度下で測定されるが、生体内での機能を明らかにするためには生体内での酵素濃度に準じた濃度領域での検討が必要であろう。本研究ではNMRによる高温でのPPIase活性測定法を確立し、MtFKBP17が高温で有意な活性を示すためにはその濃度が重要な要素となることを明らかにした。また、MtFKBP17の化学シフトの帰属を行い、二次構造を予測、解析した結果、PPIase活性をになうFKBP部分とシャペロン活性を担うと思われる挿入配列部分が構造上独立していることが示唆された。

[1] Suzuki, R., Nagata, K., Kawakami, M., Nemoto, N., Furutani, M., Adachi, K., Maruyama, T., Tanokura, M. (2000) Assignment of ¹H, ¹³C and ¹⁵N signals of FKBP from *Methanococcus thermolithotrophicus*. Journal of Biomolecular NMR 17, 183-184.