

# 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 鈴木 倫太郎

本研究では、好熱菌におけるペプチジルプロリル *cis-trans* イソメラーゼ (PPIase) の生理的役割を考える上で重要な、高温条件でのPPIase活性を明らかにするために、好熱古細菌掘 *Methanococcus thermolithotrophicus*由来FK506結合タンパク質 (MtFKBP17) のNMR法による活性測定を行った。さらにMtFKBP17の化学シフトを決定し、立体構造と機能の関係を考察した。本論文は4章からなる。

第1章では、まずタンパク質のフォールディングと、これを助ける因子であるシャペロンとフォールダーゼについての説明を行った。フォールダーゼにはプロテインジスルフィドイソメラーゼとPPIaseの2種類があり、さらにPPIaseにはサイクロフィリン、FK506結合タンパク質 (FKBP)、パプリンの3つのファミリーに分かれる。これらの因子の解説に加えて、PPIaseにはシャペロン活性を持つものが多いことなどから、PPIaseの活性の生理的な役割が疑問視される側面を説明した。さらにPPIaseの各ファミリーの違いと生物種における分布を概説して、好熱菌にはFKBPを唯一のPPIaseとして持つものが多いことを指摘し、好熱菌が生息する高温環境ではPPIaseが触媒するプロリン残基の異性化反応は酵素がなくても非常に速くなり、PPIaseが必要とされないという考え方を紹介した。また、プロリン残基の異性化反応の物理的な特徴とPPIaseの反応機構について現在の知見をまとめた。最後にFKBPファミリーのアミノ酸配列上の特徴と、FKBPの持つシャペロン活性について説明している。

第2章では、本研究のうち、NMRによるPPIase活性測定を記述した。まず、PPIase活性測定の方法としてキモトリプシン法とNMR法をあげて違いを説明し、NMR法の理論と解析について詳述した。

測定の結果、25℃と50℃でのMtFKBP17の活性は、2-3倍違っていた。また50℃で酵素のない条件での反応速度に対するPPIaseに触媒された反応速度の比は16-70倍であり、高温においてMtFKBP17が有意なPPIase活性を保っていることが明らかになった。キモトリプシン法でこの比を求めると、同法で測定できる限界の37℃でおおよそ1であり、さらに高温になるとより小さくなることが示唆された。活性の温度依存性から求められる活性化エンタルピーの値はNMR法とキモトリプシン法で一致し、両方法で同じ反応を観測していることが確かめられた。両方法の違いは、反応溶液の酵素濃度の違いによるものと考えられるが、細胞内でのMtFKBP17の濃度 (数 $\mu$ M以上) はNMR法の条件に近く、MtFKBP17はそのような高濃度で有意な活性を示す酵素であること、その活性は高温においても生理的な意味を持つことが示唆された。

第3章では、MtFKBP17のNMRの化学シフトの帰属の結果とそれにより示される立体構造情報を述べた。連鎖帰属により主鎖の $H^N$ 、 $N$ 、 $C^\alpha$ 、 $C^\beta$ 、 $C'$ 、 $H^\alpha$ の化学シフトを決定した。側鎖についてもほと

んどの原子について帰属を行った。決定した化学シフトの値を用いた二次構造の予測と、NOEパターンを解析して得られる二次構造のトポロジーから、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、ヒトのFKBPにはない2カ所の挿入配列の部分にも二次構造が存在することがわかった。特に44残基からなる長い挿入配列部分はMtFKBP17がPPIase活性とは別に持つシャペロン活性のために必要であることが知られているが、この部分には新たに $\beta$ シートと $\alpha$ ヘリックスが見いだされ、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。

MtFKBP17の $^{15}\text{N}$ -HSQCスペクトルには25℃と50℃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。一方、50℃に2週間おいた後のスペクトルは、ピークの重なりが激しくなり、また小さなピークが新たに多数観測された。このことからMtFKBP17の構造は長期間の高温によって変化し、一部がランダムコイルに近い状態になることが示唆された。

第4章では以上の結果をまとめ、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であり、MtFKBP17は細胞内で高い濃度で存在すると考えられることから、生体内でもそのPPIase活性は生理的機能を十分持ち得ると結論づけた。また、MtFKBP17のシャペロン活性は構造上ある程度独立したドメインが担っている可能性が示唆された。

本研究で得られた知見は、学術上貢献するところ大であると考えられる。よって、審査委員一同は、本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。