

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 長谷川 淳

蛋白質の構造安定性に関する研究は、蛋白質の構造構築原理を解明する上で非常に多くの知見を与えてくれる。好熱性水素細菌由来のチトクローム α -552 (HT α -552) と緑膿菌由来のチトクローム α -551 (PA α -551) は一次構造上高い相同性を有するにも関わらず、安定性においては大きな差異があるので、安定性に関する研究を行う題材として非常に適している。PA α -551 は既に X 線結晶構造解析によって高分解能の立体構造が得られているので、HT α -552 の立体構造を決定することが出来れば、立体構造の詳細な比較から安定性に関する新たな知見が得られるものと期待される。本論文は、HT α -552 の立体構造を決定して PA α -551 の構造と比較し、得られた結果を基に PA α -551/HT α -552 における構造安定性相関を詳細に解析したものである。

第 1 章では、HT α -552 の溶液構造が NMR と分子動力学計算を用いて決定され、PA α -551 の構造と詳細に比較されている。主鎖のフォールディングがほとんど同じであるのに対して、側鎖の構造には空間的に離れた三箇所の領域において、安定性の差に関与すると思われる差異が存在することを明らかにした。PA α -551 の Phe-7 と Val-13 は HT α -552 ではそれぞれ Ala と Met になっており、Phe のベンゼン環が消失したことにより生じた空間を埋めるように、周辺の側鎖が微妙に構造を変えていることが分かった。また、PA α -551 の Phe-34、Gln-37 および Glu-43 は HT α -552 ではそれぞれ Tyr, Arg および Tyr となっており、Tyr-34 と Tyr-43 のアミノ酸置換により HT α -552 では PA α -551 には存在しない新たな疎水性相互作用が形成されているとともに、Arg-37 のグアニジル基は Tyr-34 および Tyr-43 の側鎖と aromatic-amino 相互作用していることが分かった。更に PA α -551 の Val-78 は HT α -552 では Ile となっており、一つ増えたメチル基により分子内部に存在する空間を充填していることが分かった。

第 2 章では、PA α -551 の変異蛋白質を効率的に得るために、大腸菌を用いた PA α -551 大量発現系が構築されている。組換え体 PA α -551 は、N 末側にシグナル配列を付与することによりペリプラズム空間に分泌するように設計されており、精製された組換え体は UV、CD および NMR による分析により、緑膿菌から分取・精製された PA α -551 と同じ性質を示すことが明らかになった。

第 3 章では、第 1 章で安定性に関与すると推測されたアミノ酸残基に関して変異を導入して安定性が解析されている。作製した全ての変異体において 1.5M のグアニジン塩酸塩存在下での熱安定性と、グアニジン塩酸塩に対する安定性が上昇していることが明らかになった。また、それぞれの領域において F7A/V13M および F34Y/E43Y の 2 残基変異体が最も高い安定性を示すことが明らかになった。

第 4 章では、第 3 章において確認された安定性を上昇させる変異の組み合わせの効果が解析されている。複数の領域において変異を導入した蛋白質は、いずれも単一の領域につ

いてのみ変異を導入した蛋白質より、熱安定性およびグアニジン塩酸塩に対する安定性ともに上昇することが分かった。特に三箇所領域全てに変異を導入した5残基変異体 F7A/V13M/F34Y/E43Y/V78I は、熱安定性の実験において 33.4°C の上昇を示すとともに、グアニジン塩酸塩に対しては HT α -552 と全く同程度の安定性を示した。これらの結果から、わずか 5 残基のアミノ酸置換で常温菌由来の蛋白質に好熱菌由来の蛋白質と同レベルの安定性を獲得させることが可能であることが明らかとなった。

第 5 章では、HT α -552 に近い安定性を有する 5 残基変異体の立体構造を NMR により決定することが出来た。得られた構造を PA α -551 および HT α -552 と比較したところ、5 残基変異体は主鎖構造においては両者とほとんど変わらないが、側鎖構造に関しては HT α -552 のものと極めて近いことが明らかとなった。

以上本論文は、NMR により決定された好熱菌由来のチトクロム c 、HT α -552 の立体構造を詳細に解析し、大腸菌を用いた発現系で中温菌由来のチトクロム c 、PA α -551 変異体を作成しその安定性を評価することにより、これまで不明であった HT α -552 が高い安定性を有する要因を明らかにしたものであり、学術上、応用上貢献するところが少なくない。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のあるものと認めた。