

## 論文の内容の要旨

応用生命化学専攻  
平成 15 年度博士課程 入学  
氏名 明 華  
指導教員名 田之倉 優

論文題目 X-ray crystallographic analysis of thioredoxin from the thermophilic archaeon *Sulfolobus tokodaii* strain7

(好熱古細菌 *Sulfolobus tokodaii* strain7 由来 thioredoxin の X 線結晶構造解析)

### 目的

Thioredoxin(TRX)はジスルフィド結合を含む酸化還元タンパク質としてほぼすべての生命体に存在し、細胞内の酸化還元プロセスを制御することで細胞を守る重要なタンパク質である。さらに、TRX は熱安定タンパク質としてタンパク質の安定性を理解するための重要なモデルタンパク質とも考えられている。これまでに様々な論文で *E. coli*、*A. acidocaldarius* といった生物由来の TRX の耐熱性に関する内容が発表されてきた。しかし、耐熱性研究に最も相応しいと思われる好熱古細菌由来の TRX に関する報告はなかった。そこで本研究は、生育限界温度が 87 °C である好熱古細菌 *Sulfolobus tokodaii* strain7 由来 TRX に着目し、X 線結晶構造解析法およびタンパク質工学を利用して、立体構造の耐熱化機構を調べることを目的とした。

### 結晶構造

Wizard I, II screening kit を用いて一次結晶化スクリーニングを行ったところ *st*TRX K53E 変異タンパク質に相応しい結晶条件が見出された。沈殿剤濃度と pH を変え二次スクリーニングをしたところ、分解能 1.49 Å の X 線回折斑点を示す結晶を得ることができた。ほうれん草由来 thioredoxin の構造を初期モデルとし、分子置換法で構造計算を行った。

決定された *sfTRX* K53E 構造は Cys64 と Cys67 という活性部位の cysteine 残基が酸化された酸化型の構造であり、典型的な thioredoxin フォールド( $\alpha/\beta$ 構造)を示した。5本のストランドからなる1枚のシートが四本の $\alpha$ -ヘリックスに囲まれた構造を示した(図1)。シートの裏表で疎水コアが2つあり、一方は芳香環が多いコアで短いヘリックスで囲まれ、もう一方は脂肪族アミノ酸残基が多く長いヘリックスで囲まれていた。周囲を囲むヘリックスと中央部に横たわるシートそしてループの間には水素結合(Trp63---Asp92、Tyr81---Glu131)は少なかった。一方、分子表面には異なる二次構造の間を結ぶ5つのイオンペアを持っていた(His39---Glu93、Lys53---Asp114(WT)、Glu75---Lys88、Asp80---Arg127 と Asp119---Arg133)(図1)。

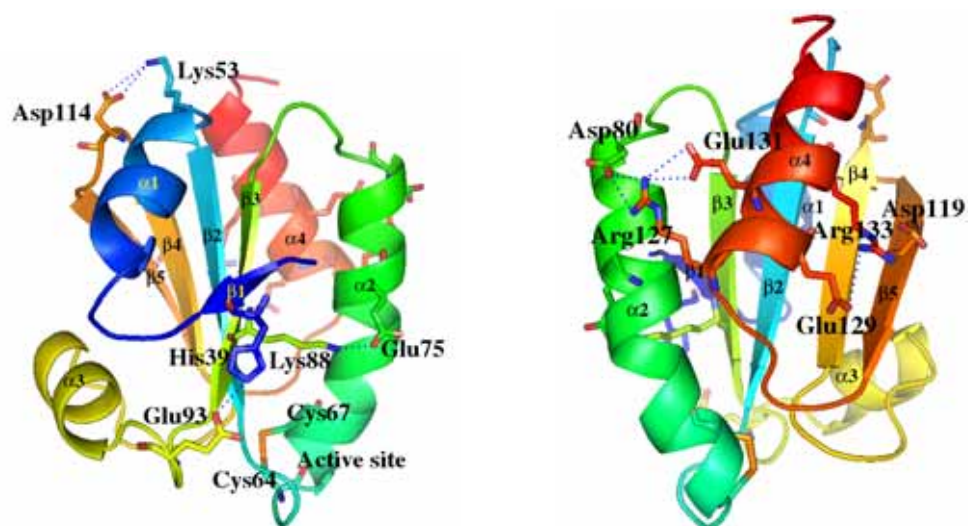


図1. *sfTRX* の全体構造と形成されるイオンペア

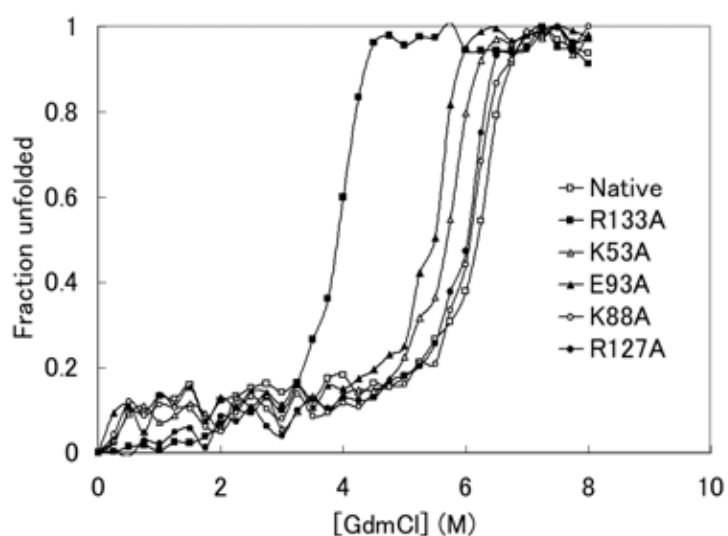


図2. 塩酸グアニジンによる変性実験

## 塩酸グアニジンによる変異体の変性実験

*sfTRX* のイオンペアの立体構造安定性への影響を調べるために変異体 5 種類を作製した。各イオンペアの片一方の残基を選択し、アラニンに置換した。0 M から 8 M までの塩酸グアニジンを添加し、 $\alpha$  - ヘリックスの変性の基準となる 222 nm で変異体と WT の比較を行った。図 2 は WT と各変異体の塩酸グアニジンによる変性グラフである。それぞれの変性中点は、R133A は 3.85 M, E93A は 5.46 M, K53A は 5.67 M, R127A は 5.96 M, K88A は 6.07 M, WT は 6.20 M 塩酸グアニジン濃度であった。K53A、E93A、K88A、R127A では WT と構造安定性に大きな差は見られなかった。しかし、R133A は WT に比べ変性中点の塩酸グアニジン濃度が顕著に低く、構造安定性に差が出たことがわかった。

## 活性測定

30°C と 50°C で DTT 依存的なインシュリンジスルフィド結合の還元活性の測定を行った。30°C では 60 min かけても不完全な還元を示したが、50°C では 20 分で 0.13 mM のインシュリンを完全に還元した。この結果は *sfTRX* が温度の上昇に伴って活性化することを示している。50°C で測定した結果、構造計算に用いられた K53E と WT は活性がほとんど変わらず、いずれも 0.13 mM のインシュリン溶液を完全に還元させた。

## 議論

好熱古細菌 *S. horikoshii* の *sfTRX* K53E 変異体の結晶化を行い構造を決めた。この構造は好熱菌由来の thioredoxin では初めての構造報告である。K53E は活性測定でも CD 測定でも WT と差がないことを確認した。この構造とほかの生物由来の TRX との RMSD の値は、それぞれ *E. coli* TRX(2TRX)と 1.26 Å、*A. acidocaldarius* TRX(1NW2)と 1.19 Å、Human TRX(1ERU)と 1.15 Å、Spinach TRX(1FB0)と 0.94 Å、*Anabaena* TRX(1THX)と 1.32 Å であって、全体構造にはほとんどかわりがない。

好熱古細菌由来タンパク質の構造安定の仕組みとして、異なる 2 次構造間のイオンペアが重要かも知れないと考え、変異体を作成し構造安定性を評価した。5 つあるイオンペアそれぞれに変異を加えたところ、R133A で安定性に大きな変化が見られた。R133( $\alpha$ 4)は D119( $\beta$ 5)とイオンペアを形成している。 $\beta$ 5 とほかの 2 次構造の間との相互作用は、Asp119---Arg133 間のイオンペア以外見られなかった (図 3)。このイオンペアがなくなると  $\alpha$ 4 と  $\beta$ 5 間の相互作用が全くなり、安定性が低下すると思われる。この結果から、C 末端ヘリックスは *sfTRX* 構造全体の構造安定性にきわめて重要で、C 末端ヘリックスが崩れると *sfTRX* 全体構造も崩れてしまうことがわかった。したがって高い安定性を獲得するためにはこのイオンペアが特に重要な働き

があると考えられる。R133-- D119 のイオンペア以外は単独では構造安定性への寄与はそれほど大きくはなかった。したがって、いくつかのイオンペアが共同的に構造安定性を増しているということが考えられる。

*sf*TRX の塩酸グアニジンによる変性中点濃度(6.20 M)は耐熱性が高いといわれてきた *A. acidocaldarius* 由来 TRX(2.9 M)よりずっと高い値だった。したがって *sf*TRX はこれまで構造安定性について報告された TRX の中で最も安定性が高いものである。また、ほかの生物種由来の TRX と比較したところ、*sf*TRX はこれまで立体構造解析された TRX の中で最も多くイオンペアを持っていた。したがって、*sf*TRX にイオンペアが多いという特徴は、高い耐熱性につながっていると結論される。

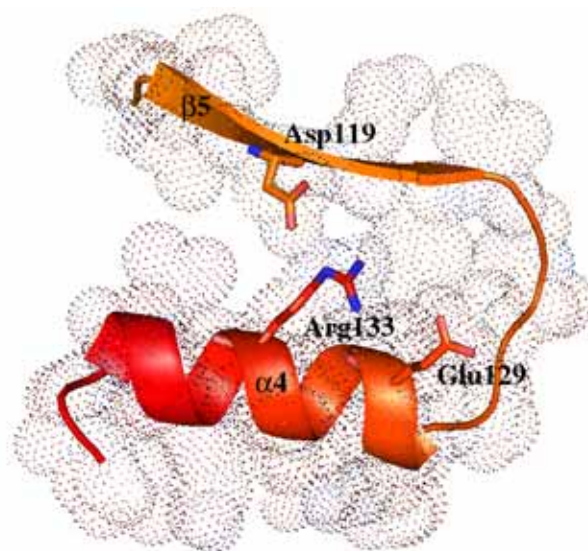


図 3.  $\alpha 4$  と  $\beta 5$  間の相互作用