

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 明 華

本論文では、*Sulfolobus tokodaii* strain7 由来のジスルフィド結合を含む酸化還元たんぱく質である thioredoxin の X 線結晶構造解析を行い、その構造に基づいた立体構造の耐熱化機構について述べている。

本論文は Chapter 1 から Chapter 3 で構成されている。

Preface では、始めに好熱菌由来タンパク質のメリットについて述べている。耐熱性たんぱく質の利用がますます増加している現状に伴って、耐熱性たんぱく質に関する安定性研究も盛んになっていると書いている。一方、ターゲットタンパク質である thioredoxin は *Escherichia coli* と *Alicyclobacillus acidocaldarius* で立体構造解析と安定性研究が既に行われているが、好熱古細菌では構造解析も安定性研究もまだ行われていないので、本研究はこの2点を明らかにすることを目的として行われた。

本論文の背景として、Chapter 1 の前に Background を設けている。Background では、thioredoxin の反応機構、様々な生物での thioredoxin の機能、X 線結晶構造解析が行われている thioredoxin、耐熱性に寄与する要素、耐熱性研究のモデルタンパク質である thioredoxin、*Sulfolobus tokodaii* strain7 などについて詳しく説明している。

Chapter 1 では、*Sulfolobus tokodaii* strain7 由来 thioredoxin のクローニング、発現、精製と結晶化について述べている。野生型の thioredoxin とクローニング段階で得られた K53E 変異体 thioredoxin 二種類のタンパク質の精製と結晶化を行った結果、前者では棒状の、後者では厚みのある板状の結晶が得られた。

Chapter 2 では、Chapter 1 で得られた結晶を利用した X 線結晶構造解析とその結晶構造について詳しく述べている。野生型の thioredoxin は N 末端側領域の揺らぎが予測され、最終的に R-factor と free-R は理想的なところまで下がらなかったが、K53E 変異体は 1.49 Å 分解能のデータが得られて最終的には R-factor 17.2% と free-R 19.2% という値が得られた。K53E 変異体の X 線結晶構造は典型的な thioredoxin fold a/b 構造を示していて、5 本のストランドからなる b-sheet が 4 本の a-helix に囲まれている酸化型の構造である。K53E 変異体は疎水性の残基がたくさん集まった二つの疎水性コア、CoreA と CoreB を持っている。疎水性コア以外にも側鎖の間に二つの水素結合がある。一つは b2 と a2 の間のループと b3 と a3 の間のループを結ぶ Trp63---Asp92、もう一つは a2 と a4 を結ぶ Tyr81---Glu131。水素結合以外に、分子表面には異なる二次構造の

間を結ぶ5つのイオンペアがある。b1とb3とa3の間のループを結ぶイオンペア、His39---Glu93；a1とb2の間のループとb4とb5の間のループを結ぶイオンペア、Lys53---Asp114（精密化が不完全なWild typeの電子密度から）；a2とb3を結ぶイオンペア、Glu75---Lys88；a2とa4を結ぶイオンペア、Asp80---Arg127---Glu131；b5とa4を結ぶイオンペア、Asp119---Arg133---Glu129。他のthioredoxinと比較したところ *Sulfolobus tokodaii* 由来thioredoxinは特徴的に多いイオンペアを持っていることも示している。

Chapter 3では、*Sulfolobus tokodaii* 由来thioredoxinが特徴的に多く有しているイオンペアに着目し、イオンペアの構造安定性への効果を調べるためにAlanineに置換した変異体5種類を作製し、各イオンペアの構造安定性への影響を調べている。0 Mから8 Mまでのグアニジン塩酸を添加し、CDで α -ヘリックスの変性の基準となる222 nmで変異体と野生型の比較を行った結果、R133A変異体が野生型に比べ、顕著に構造安定性に差が出たことを述べている。Arg133はAsp119とイオンペアを形成し、a4を安定化させるために重要であると思われる。a4は主にa2とb5と相互作用しているが、a2との相互作用にはAsp80---Arg127---Glu131間のイオンペア以外に、疎水性残基による結合とTyr81---Glu131間の水素結合がある。しかし、b5との相互作用にはAsp119---Arg133---Glu129間のイオンペア以外にほかの相互作用は見られなかった。したがって、このイオンペアがなくなるとa4とb5間の相互作用がなくなり、安定性が低下すると考えられ、さらにC末端ヘリックスは*Sulfolobus tokodaii* 由来thioredoxin構造全体の安定性にきわめて重要で、C末端ヘリックスが崩れると全体構造も崩れてしまい、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。また、既に解析されている*E. coli*と*A. acidocaldarius*のグアニジン塩酸による変性中点はそれぞれ2.5 Mと2.9 Mの値で、いずれもR133A変異体（変性中点6.2 M）より低い値になっていることから、いままで安定性研究に用いられていたほかのthioredoxinより高い安定性をもっていることが示唆されている。

以上のように、本研究で得られた知見は、学術上貢献するところが少ない。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あるものと認めた。