

論文内容の要旨

博士論文題目 ドメインスワッピングによる好熱性水素細菌由来
シトクロム *cyt c₅₅₂* の多量体形成

氏 名 林 有吾

(論文内容の要旨)

タンパク質は、変性により多量体や凝集体、アミロイド線維などを形成する。電子伝達タンパク質であるウマシトクロム *c* (*cyt c*) は C 末端領域のドメインスワッピングにより多量体を形成すると報告されている。本論文では、熱安定性が高く、構造と熱安定性の関係がよく知られている好熱性水素細菌由来シトクロム *cyt c₅₅₂* (*cyt c₅₅₂*) を用いて、同じタンパク質ファミリーに属する異なるタンパク質のドメインスワッピングの相違や生体内でのドメインスワッピングについて知見を得ることを目的としている。

第 1 章では、タンパク質の変性、ドメインスワッピング、ウマ *cyt c* と好熱菌 *cyt c₅₅₂* の相違を説明し、本研究の位置づけを示している。

第 2 章では、好熱菌 *cyt c₅₅₂* の多量体形成について述べられている。好熱菌 *cyt c₅₅₂* の二量体はウマ *cyt c* と異なり、N 末端 α ヘリックスおよびヘムを含む領域のドメインスワッピングにより形成されることが X 線結晶構造解析より明らかとなった。好熱菌 *cyt c₅₅₂* 二量体では Met がヘム鉄に配位しており、この Met を含むループ領域が比較的強固な水素結合ネットワークを形成し、C 末端 α ヘリックスが残りのタンパク質部分から解離しなかったため、C 末端領域のドメインスワッピングが起こらなかったと推測した。好熱菌 *cyt c₅₅₂* 二量体の構造は単量体同様、密なアミノ酸側鎖のパッキングを有しており、高い熱安定性（解離温度：92°C）を示した。二量体が単量体へ解離する際、ウマ *cyt c* は負のエンタルピー変化を示すが、好熱菌 *cyt c₅₅₂* は正のエンタルピー変化を示した。以上の結果から、同じタンパク質ファミリーに属するタンパク質でも、異なる構造や性質を有するドメインスワップ多量体が形成されることが明らかとなった。

第 3 章では、大腸菌内での好熱菌 *cyt c₅₅₂* の大量体形成の結果が述べられている。好熱菌 *cyt c₅₅₂* は大腸菌内で非共有結合的に多量化することが明らかとなった。大腸菌より得られた二量体は、N 末端 α ヘリックスとヘムを含む領域をプロトマー間で交換していた。多量体形成量は、大腸菌内の好熱菌 *cyt c₅₅₂* 濃度が高いと増加し、タンパク質の安定性が下がると減少した。C 末端にヒスチジンタグを付加した好熱菌 *cyt c₅₅₂* を大腸菌内で発現させ、アフィニティーカラム後 MALDI-TOF 質量分析を行うと、多量体のフラクションにおいてホロ *cyt c₅₅₂* に加え、アポ *cyt c₅₅₂* が検出され、大腸菌内ではアポ *cyt c₅₅₂* を含む多量体が形成されることを提唱した。

第 4 章では、本論文が総括されている。

以上のように、本論文では、好熱菌 *cyt c₅₅₂* がエタノール処理と大腸菌発現系の両方において N 末端領域のドメインスワッピングにより多量体を形成すること、同じタンパク質ファミリーに属するタンパク質でもドメインスワップ多量体の構造や性質が異なること、大腸菌発現系での多量体形成量はタンパク質の濃度や安定性が高いほど増加することなどが明らかとなった。

(論文審査結果の要旨)

タンパク質の構造と機能は密接に関連している。電子伝達タンパク質であるウマシトクロム *c* (*cyt c*) は C 末端領域のドメインスワッピングにより多量化し、反応性が変化する。近年、ドメインスワッピングについて理解が深まったが、依然不明な点が多い。本論文では、熱安定性が高く、構造と熱安定性の関係が知られている好熱性水素細菌由来シトクロム *c*₅₅₂ (*cyt c*₅₅₂) のドメインスワッピングについて、エタノール処理と大腸菌発現系で調べた。本論文で得られた成果は以下の通りである。

1. 好熱菌 *cyt c*₅₅₂ にエタノールを添加し、得られた沈殿を凍結乾燥後、緩衝液に再溶解すると、単量体に加え、二～四量体を得られた。好熱菌 *cyt c*₅₅₂ の二量体はウマ *cyt c* と異なり、N 末端 α ヘリックスおよびヘムを含む領域のドメインスワッピングにより形成されることを X 線結晶構造解析より明らかにした。好熱菌 *cyt c*₅₅₂ 二量体では Met がヘム鉄に配位しており、この Met を含むループ領域が比較的強固な水素結合ネットワークを形成し、C 末端 α ヘリックスが残りのタンパク質部分から解離しなかったため、C 末端領域のドメインスワッピングが起こらなかったと解釈した。好熱菌 *cyt c*₅₅₂ 二量体の構造は単量体同様、密なアミノ酸側鎖のパッキングを有しており、高い熱安定性 (解離温度: 92°C) を示した。二量体が単量体へ解離する際、ウマ *cyt c* は負のエンタルピー変化を示すが、好熱菌 *cyt c*₅₅₂ は正のエンタルピー変化を示した。以上の結果から、同じタンパク質ファミリーに属するタンパク質でも、異なる構造や性質を有するドメインスワップ多量体が形成されることを明らかにした。

2. 大腸菌内では、好熱菌 *cyt c*₅₅₂ が非共有結合的に相互作用し、多量化することを明らかにした。大腸菌より得られた二量体では、N 末端 α ヘリックスとヘムを含む領域がドメインスワッピングしていた。好熱菌 *cyt c*₅₅₂ の多量体形成量は、大腸菌内の好熱菌 *cyt c*₅₅₂ 濃度が高くなると増加し、タンパク質の安定性が低くなると減少することを明らかにした。C 末端にヒスチジンタグを付加した好熱菌 *cyt c*₅₅₂ を大腸菌内で発現させ、アフィニティーカラムで精製して得た各フラクションの MALDI-TOF 質量分析を行うと、多量体の溶出位置のフラクションにおいてホロ *cyt c*₅₅₂ に加え、アポ *cyt c*₅₅₂ が検出された。この結果より、大腸菌内でアポ *cyt c*₅₅₂ を含む多量体の形成を提唱した。

以上のように、本論文では、好熱菌 *cyt c*₅₅₂ はエタノール処理と大腸菌発現系の両方において N 末端領域のドメインスワッピングにより多量体を形成すること、同じタンパク質ファミリーに属するタンパク質でも多量体の構造や性質が異なること、大腸菌発現系での多量体形成量はタンパク質の濃度や安定性が高いほど増加することなどを明らかにした。これらの結果はタンパク質のドメインスワップに新しい知見を与えるものであり、本論文で得られた結果は生体分子科学分野、タンパク質科学分野の研究として高く評価でき、学術的に大きな意義がある。よって、審査委員一同は本論文が博士 (理学) の学位論文として価値あるものと認めた。