

Title	Structures of a protein and a virus like particle exhibiting hyperthermo-stability
Author(s)	Tanaka, Hideaki
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/1401">https://hdl.handle.net/11094/1401</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	田中秀明
博士の専攻分野の名称	博士(理学)
学位記番号	第16526号
学位授与年月日	平成13年9月26日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 理学研究科高分子科学専攻
学位論文名	Structures of a protein and a virus like particle exhibiting hyperthermo-stability (超耐熱性タンパク質と超好熱菌由来のウィルス様粒子の構造)
論文審査委員	(主査) 教授 月原 富武  (副査) 教授 上山 憲一 助教授 油谷 克英 助教授 中川 敦史

### 論文内容の要旨

超好熱菌由来のタンパク質は通常変性温度が100°C以上で、高い熱安定性を示す。これまで熱安定化機構については、様々な安定化の因子があげられているが、何れも定性的な提案である。本研究では、超好熱菌、*Pyrococcus furiosus* 由来の Pyrroridone Carboxyl Peptidase (*PfPCP*) のX線結晶構造解析を行い、その構造をもとに熱安定化機構を定量的に明らかにすることを目的とした。*PfPCP* のX線結晶構造解析は野生型及び Cys 残基を Ser に置換した変異型、Cys142/188Ser (*PfPCP*-0SH) について行った。それぞれの解析の分解能は2.2Åと2.7Åで、いずれもホモテトラマー構造をとっていた。

*PfPCP* の構造から熱安定化のメカニズムを定量的に明らかにするために、1) ヒトリゾチームの系統的な変異型の「安定性/構造」データベースから得た個々の安定化因子のパラメータと、2) 構造予測法における3次構造と1次構造の適合性の評価関数を発展させた太田らのSPMP (Stability profiles of mutant proteins) 法を用いた。この方法で解析することによって *PfPCP* の高い熱安定性の原因として疎水性相互作用、水素結合、サブユニット間のイオン対の増加とより理想的な conformation への変換があげられ、超好熱菌蛋白質の熱安定化の起源に特別な安定化因子があるのではなく、安定化の正負のファクターの組み合わせが好熱菌蛋白質の方が少し常温菌蛋白質のそれに勝っているために高い熱安定性を示しているにすぎないと結論できた。本研究は、これまでは、超好熱菌由来蛋白質の熱安定性のメカニズムをX線結晶構造から定性的にしか議論できなかったが、定量的に検討する方向を示したところに特徴がある。

超好熱菌由来ウィルスは *Pyrococcus furiosus* 70S リボソームの結晶構造解析を目指した実験の中で偶然に発見された。70S リボソームは、活性測定、二次元電気泳動、電子顕微鏡観察により、高活性で粒子の形状も非常に均一であることが確認された。この高純度のサンプルを用いて結晶化を行った結果、沈殿剤としてMPDを用いた実験で得られた結晶が3.5Å分解能という非常に高分解能の回折データを与えた。重原子同型置換法により構造解析を進めていったが、得られた電子密度が本来、リボソームにはないとされている球殻構造を持っていたため、重原子サイトの非結晶学的な対称 (NCS) を調べたところ、重原子サイトが icosahedral な対称を持っていることが明らかとなった。電子密度をさらに精密化したところ、この球状粒子は直径約30nmの大きさで  $T=3$  の対称を持つことが分かった。この解析結果は、結晶の成分のSDS-電気泳動、電子顕微鏡観察の結果とも一致しており、結晶はリボソームのものでなく、ウィルス状粒子のものである事が明らかになった。これまで超好熱菌由来のウィルスについてはその発見に

についての報告もなく、その構造が明らかになる事の意義は非常に大きい。また、この高温においても非常に安定な粒子は球状構造内部に RNA を持っており、代わりに様々な薬剤、遺伝子等を詰め込む事で Drug Delivery System (DDS) への応用も可能であろう。

今回の実験では、非常に高純度かつ高濃度のリボソーム溶液中に微量に存在するウィルスが結晶化し、3.5 Å 分解能という高分解能の回折データを与えた。通常、このような良質の結晶を得るためには目的とする試料の純度が重要であり、今回のような結晶化のケースは非常にめずらしい。その原因としては、親水性の高いリボソームが沈殿剤の役割を果たしたということが考えられる。

#### 論文審査の結果の要旨

田中秀明君の論文は超好熱菌の蛋白質とウィルスの構造に関するものである。100°C以上の温度で生育する超好熱菌の蛋白質の X 線結晶構造解析を行い、超好熱性蛋白質の熱安定性の要因を初めて定量的に明らかにした。

また、超好熱菌由来の球状ウィルスを精製、結晶化し、3.8 Å 分解能で結晶構造解析した。これは、分子量が700万をこえるウィルスの構造解析であるだけでなく、超好熱菌由来のウィルスとして初めての構造決定であり、その意義は大きい。

よって、この論文は博士（理学）の学位論文として十分価値のあるものと認める。