



Title	超好熱菌由来タンパク質の遅い変性反応の解析
Author(s)	岡田, 淳
Citation	大阪大学, 2013, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/27550
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏 名	岡 田 淳
博士の専攻分野の名称	博 士（工学）
学 位 記 番 号	第 2 6 1 4 9 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 25 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 工学研究科生命先端工学専攻
学 位 論 文 名	超好熱菌由来タンパク質の遅い変性反応の解析 Studies on the slow unfolding pathway of proteins from hyperthermophile
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 金谷 茂則 (副査) 教 授 福住 俊一 教 授 宮田 幹二 教 授 菊地 和也 教 授 高井 義造 教 授 伊東 一良 教 授 渡部 平司 教 授 伊東 忍 教 授 兼松 泰男 京都府立大学大学院生命環境科学研究科応用生命科学専攻教授 高野 和文

論文内容の要旨

本研究では、超好熱菌由来の非常に安定なタンパク質の物性を熱力学や速度論から解析し、さらに、そのタンパク質の進化的背景を踏まえて考察することで、超好熱菌由来のタンパク質の物性に関する基本的な理解を得た。第一章では、好熱性RNase Hの平衡論的安定性と速度論的安定性をタンパク質の進化的背景の観点から比較した。好熱性RNase Hは高い平衡論的安定性を示したが、変性反応速度は宿主の進化的背景に強く依存していた。これは超好熱古細菌と超好熱細菌由来タンパク質が異なった耐熱化の戦略によって高温環境に適応していることと関連する。第二章では、 α ヘリクッスN末端領域のプロリン残基が、超好熱古細菌由来タンパク質 (Tk-RNase H2) の熱安定性や変性、復元機構にどのような影響をおよぼすかを調べた。その結果、 α ヘリクッスN末端領域のプロリン残基は、非常に高い安定性を有するTk-RNase H2においても中温生物由来タンパク質における場合と同様に加算的な安定性への寄与を示した。しかし、Tk-RNase H2の遅い変性反応には疎水性相互作用のような大きな影響を与えなかった。これは、プロリン残基による安定化は主に変性状態のタンパク質に寄与する影響であって、天然構造にあまり影響しないためと考えられる。第三章では、遅い変性反応を示すタンパク質である超好熱古細菌由来Tk-RNase H2と超好熱細菌由来Tm-RNase H2の変性過程を、超安定なプロテアーゼである超好熱菌由来Tk-subtilisinを用いたpulse proteolysis法により追跡するという新しい手法で解析した。その結果、Tk-RNase H2の変性過程は、多数の中間状態を介した多状態反応であることが確認できた。そして、Tk-RNase H2の遅い変性反応にはN末側領域が重要な役割を担い、C末端領域は復元反応と構造安定性に寄与していることが示唆された。一方、超好熱細菌由来Tm-RNase H2の変性過程は中間体を介さない二状態反応を示した。このことは、古細菌由来Tk-RNase H2と細菌由来Tm-RNase H2は、その宿主の進化的背景に依存した異なる変性機構を有していることを示唆している。さらに、本実験手法がタンパク質の変性過程を解析する手段として有効であることを示した。

以上のように本論文は今まで議論されることの少なかった、宿主の進化的背景とタンパク質の安定性、変性機構に関連性があることをはじめて実験的に示した。さらに、タンパク質の変性過程について既存の方法では観測できない詳細な情報を得ることが可能な解析方法を提案した。

本研究では、超好熱菌由来の非常に安定なタンパク質の物性を熱力学や速度論に基づき解析し、さらに、そのタンパク質の進化的背景を踏まえて考察することで、超好熱菌由来タンパク質の物性に関する基本的な理解を得ることができた点で意義深い。第一章では、好熱性 RNase H の平衡論的安定性と速度論的安定性をタンパク質の進化的背景の観点から比較した。好熱性 RNase H は高い平衡論的安定性を示したが、変性反応速度は宿主の進化的背景に強く依存していた。これは超好熱古細菌と超好熱細菌由来タンパク質が異なった耐熱化の戦略によって高温環境に適応していることと関連する。第二章では、 α ヘリクッス N 末端領域のプロリン残基が、超好熱古細菌由来タンパク質 (Tk-RNase H2) の熱安定性や変性、復元機構にどのような影響をおよぼすかを調べた。その結果、 α ヘリクッス N 末端領域のプロリン残基は、非常に高い安定性を有する Tk-RNase H2 においても中温生物由来タンパク質における場合と同様に加算的な安定性への寄与を示した。しかし、Tk-RNase H2 の遅い変性反応には疎水性相互作用のような大きな影響を与えなかった。これは、プロリン残基による安定化は主に変性状態のタンパク質に寄与する影響であって、天然構造にあまり影響しないためと考えられる。第三章では、遅い変性反応を示す超好熱古細菌由来 Tk-RNase H2 と遅い変性反応を示さない超好熱細菌由来 Tm-RNase H2 の変性過程を、超安定なプロテアーゼである超好熱菌由来 Tk-subtilisin を用いた pulse proteolysis 法により追跡するという新しい手法で解析した。その結果、Tk-RNase H2 の変性過程は、多数の中間状態を介した多状態反応であることが確認できた。そして、Tk-RNase H2 の遅い変性反応には N 末側領域が重要な役割を担い、C 末端領域は復元反応と構造安定性に寄与していることが示唆された。一方、超好熱細菌由来 Tm-RNase H2 の変性過程は中間体を介さない二状態反応を示した。このことは、古細菌由来 Tk-RNase H2 と細菌由来 Tm-RNase H2 は、その宿主の進化的背景に依存した異なる変性機構を有していることを示唆している。さらに、本実験手法がタンパク質の変性過程を解析する手段として有効であることを示した。

以上のように本論文は今まで議論されることの少なかった、宿主の進化的背景とタンパク質の安定性、変性機構に関連性があることをはじめて実験的に示した点で意義深い。さらに、タンパク質の変性過程について既存の方法では観測できない詳細な情報を得ることが可能な解析方法を提案した点で有益である。

よって本論文は博士論文として価値のあるものと認める。