The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Studies on structure and molecular dynamics in proteins from hyperthermophilic archaeon
Author(s)	山本, 喬彦
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/46847
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【20】

氏　　名	山本喬彦（やまもと たかひこ）
博士の専攻分野の名称	博　士（工　学）
学位記番号	第　20283　号
学位授与年月日	平成18年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 工学研究科物質化学専攻
学位論文名	Studies on structure and molecular dynamics in proteins from hyperthermophilic archaeon **（超好熱古細菌に由来する蛋白質の構造及び分子ダイナミクスに関する研究）**
論文審査委員	（主査） 教授　甲斐　泰 （副査） 教授　林　高史　教授　宇山　浩　教授　小松　満男 教授　桑畑　進　教授　大島　巧　教授　今中　信人 教授　平尾　俊一　教授　町田　憲一　教授　田川　精一

論文内容の要旨

古細菌は、超好熱菌や好塩菌などを含む特異な原核生物の1グループであり、真正細菌や真核生物と並んで第3のグループを構成している生物種である。古細菌は、真正細菌と同じく細胞核を持たない原核生物に属するが、遺伝情報の伝達は真正細菌よりも真核生物に類似しており、真核生物の遺伝情報の伝達サイクルをより簡略化したものであることから、真核生物における遺伝情報伝達のサイクルを理解する上での原型となりうる。また、古細菌の中でも超好熱古細菌は、最適育成温度が95℃と超高温条件下に成育し、これらの生物に由来する蛋白質の多くは熱安定性を示すことから、超好熱古細菌に由来する蛋白質及び酵素の工業的応用が期待されている。本研究では、鹿児島県小宝島において発見された2種類の超好熱古細菌 *Thermococcus korakaraensis* KOD1株及び *Aeropyrum pernix* K1株に由来する蛋白質に焦点を当て、その構造機能相関について構造化学及び分子ダイナミクスの見地から検討した。

第1章では *Thermococcus korakaraensis* KOD1株由来のTBP-interacting protein（*Tk*-TIP26）について述べる。TBP-interactimg protein（TIP）は真核生物及び古細菌の転写反応には必須のTATA-binding protein（TBP）に特異的に結合する蛋白質の総称であり、古細菌から真核生物に至るまで広くその存在が確認されている。これまで数種のTIPが同定及び機能解析がされ、いずれのTIPも転写反応の制御に深く関わっていることが示唆されているが、これまでにTIPの3次元構造が解析された例はない。そこで、今回TIPによる転写反応制御の機構を解明することを目的として、*Tk*-TIP26の3次元構造をX線結晶構造解析により決定し、その機能を構造化学的見地から考察した。

第2章では *Aeropyrum pernix* K1株由来のペルオキシレドキシン（Prx）であるThioredoxin Peroxidase（ApTPx）について述べる。Prxは、チオール依存型のペルオキシダーゼであり、H_2O_2 やalkyl peroxideを H_2O やalcholに還元する反応を触媒する。Prxは、細菌から真核生物にいたるまで広くその存在が確認されており、これまでに様々な由来のPrxの三次元構造が決定されている。近年、超好熱古細菌 *Aeropyrum pernix* K1株においてもPrxの存在が確認され、このPrxがチオレドキシンシステム内で機能することから、Thioredoxin peroxidase（ApTPx）と呼ばれている。ApTPxは、1分子中に3つのシステイン残基（C50、C207、及びC213）を持ち、H_2O_2 を H_2O に還元

する反応を触媒する。これまでの研究から、ApTPx のアミノ酸配列は 1-Cys の Prx と相同性が高いのに対し、その反応機構は 2-Cys の Prx と同様に２つのシステイン残基（C50 及び C213）が反応に必須であることが報告されている。本章では、ApTPx による H_2O_2 の還元機構を解明することを目的として、変異体 C207S を用いて、３種類の過酸化水素濃度条件下においてＸ線結晶構造解析を行った。それぞれの状態での３次元構造について、構造化学的及び分子ダイナミクス的見地から考察を行ったところ、Prx の活性中心に存在する C50 が過酸化水素と反応することによって、Cysteine（Cys-SH）から、Cystein sulfenic acid（Cys-SOH）へと酸化される際の、詳細な反応メカニズムについて知見を得ることができた。

論文審査の結果の要旨

本論文は、超好熱古細菌に由来する蛋白質の構造機能相関について構造化学的及び分子ダイナミクスの見地から研究を行ったものである。

緒言では、古細菌の遺伝情報メカニズムが真核生物のものと類似し、かつ真核生物のものよりも簡略化されたものであることから、古細菌における遺伝情報メカニズムの解明をすることによって、真核生物のメカニズムを考える上での原型となりうる優位性を示している。また、超好熱古細菌の特性についても述べ、これらの工業的応用への期待について述べられている。

第１章では、超好熱古細菌 *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 株由来 TBP-interacting protein（*Tk*-TIP26）のＸ線結晶構造解析について述べ、TBP-interacting protein の中では初めてとなる *Tk*-TIP26 の３次元構造の決定に成功したことを述べている。また、生化学的実験により *Tk*-TIP26 と TBP 複合体中における量論比を決定している。また、この量論比から *Tk*-TIP26/TBP 複合体の予想モデルを構築し、*Tk*-TIP26 による TBP と TATA-DNA 間の結合阻害機構について述べている。

第２章では、好気性超好熱古細菌 *Aeropyrum pernix* K1 株由来 Thioredoxin peroxidase（ApTPx）の還元体、反応中間体、及び酸化体の３種類のＸ線結晶構造解析について述べている。まず、還元体の構造では、古細菌では初めてとなる Peroxiredoxin の３次元構造を決定したことについて述べており、その構造は擬似の２回軸で形成されるダイマーが５つ集まって、リング状の 10 量体を形成していることを明らかにしている。中間体では Arg126 が分子表面から遠ざかることにより、活性中心 Cys50 が分子表面へと露出され、活性部位が open になるように構造変化することについて述べている。酸化体の構造では、ApTPx の活性中心が cysteine から cysteine sulfenic acid へと酸化され、さらに Cys50 の S^{γ} 原子と His42 の $N^{\delta 1}$ 原子が共有結合を形成し、超原子価の S^{γ} 原子をもつ構造であったことを述べている。以上、３種類の構造を用いて、ApTPx による過酸化水素の還元反応機構について、そのメカニズムを述べている。

以上のように、本論文は２種の超好熱古細菌に由来する蛋白質に関して、構造化学的及び分子ダイナミクスの見地からその構造と機能の関連性について明らかにしている。第１章での研究で得られた知見から、古細菌及び真核生物における遺伝情報伝達の解明に役立つものとなる。また、第２章で得られた知見からは、Prx の過酸化物還元機構について詳細な反応機構について、初めて解明したものと言える。

よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。