

|              |   |
|--------------|---|
| Title        | 蛋白質の高温適応における表面荷電性アミノ酸とC端末tailの役割  |
| Author(s)    | 劉, 東周   |
| Citation     | 大阪大学, 2007, 博士論文  |
| Version Type |   |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/48620">https://hdl.handle.net/11094/48620</a>   |
| rights       |   |
| Note         | 著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。 |

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

|               |  |
|---------------|--|
| 氏 名           | 劉 東 周  |
| 博士の専攻分野の名称    | 博 士 (工 学)  |
| 学 位 記 番 号     | 第 2 1 6 2 1 号  |
| 学 位 授 与 年 月 日 | 平成 19 年 11 月 12 日  |
| 学 位 授 与 の 要 件 | 学位規則第 4 条第 1 項該当<br>工学研究科物質・生命工学専攻   |
| 学 位 論 文 名     | Role of surface charged residues and C-terminal tail on thermal stabilization of protein<br>(蛋白質の高温適応における表面荷電性アミノ酸と C 末端 tail の役割)       |
| 論 文 審 査 委 員   | (主査)<br>教 授 金 谷 茂 則<br><br>(副査)<br>教 授 福 住 俊 一    教 授 宮 田 幹 二    教 授 菊 池 和 也<br>教 授 高 井 義 造    教 授 伊 東 一 良    教 授 渡 部 平 司<br>教 授 兼 松 泰 男 |

### 論 文 内 容 の 要 旨

本研究では、モデル蛋白質として中温菌、高度好熱菌、超好熱菌由来の RNase HI を用い、その熱安定性の違いをもたらす立体構造の相異点を同定し、蛋白質の構造安定化への戦略に新たな知見を与えるために、次のような研究を行った。第 1 章では、大腸菌 RNase HI を用いて分子表面の荷電性アミノ酸の割合を増やすと蛋白質の安定性が向上するか解析した。その結果、全ての変異型 RNase HI の安定性が野生型 RNase HI より低下することがわかった。変異型 RNase HI と野生型 RNase HI の結晶構造及び安定性を比較することにより、蛋白質の不安定化は、近接する残基間の静電的反発に起因することを明らかにした。以上のことから、好熱蛋白質の分子表面に存在する荷電性アミノ酸は静電的反発を起こさないように最適な位置に配置されていることを提案した。第 2 章では、Sto-RNase HI の結晶化及び X 線結晶構造解析を行い、結晶構造を 1.6Å 分解能で決定した。その結果、Sto-RNase HI は他の Type 1 RNase H と全体構造や活性部位が類似していることを明らかにした。しかし、C 末端 tail がジスルフィド結合、水素結合、疎水性相互作用により分子本体に強く固定されている。この結果から、Sto-RNase HI の C 末端 tail は耐熱化に大きく寄与していることを提案した。さらに、大腸菌 RNase HI の His124、HIV-1 RNase H の His539、Bh-RNase H の Glu118 が存在する位置に Arg118 が存在することを明らかにした。このことにより Sto-RNase HI の Arg118 は触媒活性に重要な役割を果たしていると考えられる。第 3 章では、Sto-RNase HI の Arg118 と C 末端 tail の役割を理解するために、変異型蛋白質を構築し、触媒機構及び熱安定性を解析した。その結果、ジスルフィド結合を形成できない変異体と C 末端 tail を削除した変異体は野生型蛋白質と比べて安定性が大きく低下していた。このことから、C 末端 tail の固定化が Sto-RNase HI の高い熱安定性の主要因子であることを提案した。さらに、Arg118 の役割を調べる目的で Arg118 を Ala に置換した変異型蛋白質は、RNase H 活性と dsRNase H 活性、両方とも大きく減少することを明らかにした。しかし、基質結合能は触媒活性ほどには大きく変化しなかったため Arg118 は触媒活性に重要な役割を果たしていることを提案した。

本研究では、RNase HI をモデル蛋白質として立体構造と安定化機構を関連付けて解析することにより、蛋白質の構造や安定化機構についてより理解を深めることができた。

## 論文審査の結果の要旨

本研究では、モデル蛋白質として中温菌、高度好熱菌、超好熱菌由来の RNase HI を用い、その熱安定性の違いをもたらす立体構造の相異点を同定し、蛋白質の構造安定化への戦略に新たな知見を与えるために、次のような研究を行っている。第1章では、大腸菌 RNase HI を用いて分子表面の荷電性アミノ酸の割合を増やすと蛋白質の安定性が向上するか解析している。その結果、全ての変異型 RNase HI の安定性が野生型 RNase HI より低下することを明らかにしている。変異型 RNase HI と野生型 RNase HI の結晶構造及び安定性を比較することにより、蛋白質の不安定化は、近接する残基間の静電的反発に起因することを明らかにしている。以上のことから、好熱蛋白質の分子表面に存在する荷電性アミノ酸は静電的反発を起こさないように最適な位置に配置されていることを提案している。第2章では、Sto-RNase HI の結晶化及び X 線結晶構造解析を行い、結晶構造を 1.6Å 分解能で決定している。その結果、Sto-RNase HI は他の Type 1 RNase H と全体構造や活性部位が類似していることを明らかにしている。しかし、C 末端 tail がジスルフィド結合、水素結合、疎水性相互作用により分子本体に強く固定されている。この結果から、Sto-RNase HI の C 末端 tail は耐熱化に大きく寄与していることを提案している。さらに、大腸菌 RNase HI の His124、HIV-1 RNase H の His539、Bh-RNase H の Glu118 が存在する位置に Arg118 が存在することを明らかにしている。このことにより Sto-RNase HI の Arg118 は触媒活性に重要な役割を果たしていると考えられる。第3章では、Sto-RNase HI の Arg118 と C 末端 tail の役割を理解するために、変異型蛋白質を構築し、触媒機構及び熱安定性を解析している。その結果、ジスルフィド結合を形成できない変異体と C 末端 tail を削除した変異体は野生型蛋白質と比べて安定性が大きく低下することを明らかにしている。このことから、C 末端 tail の固定化が Sto-RNase HI の高い熱安定性の主要因子であることを提案している。さらに、Arg118 の役割を調べる目的で Arg118 を Ala に置換した変異型蛋白質は、RNase H 活性と dsRNase H 活性、両方とも大きく減少することを明らかにしている。しかし、基質結合能は触媒活性ほどには大きく変化しなかったため Arg118 は触媒活性に重要な役割を果たしていることを提案している。

以上のように、RNase HI をモデル蛋白質として立体構造と安定化機構を関連付けて解析することにより、本研究では蛋白質の構造や安定化機構についての理解がより深められている。

よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。