

学 位 論 文 題 名

Structural studies into the signal transducer proteins by X-ray crystallography

(X線結晶構造解析法による、情報伝達タンパク質の構造学的研究)

学位論文内容の要旨

バクテリアなどの単純な単細胞生物から、植物やほ乳類といった複雑な多細胞生物に至るまで、全ての生物種において幾種もの情報伝達システムが存在しており、それら生体内で生命維持に不可欠な役割を果たしている。単細胞生物においては、情報伝達システムは主に細胞内で完結しており、例えば外部環境変化を察知しそれに能動的に対応する為の情報伝達システムが知られている。細胞を様々に分化させ、それぞれ特化した機能を有する複数の器官が組み合わり一個体を形成している多細胞生物においては、個々の器官、ひいてはその器官を構成している一つ一つの細胞の活動が個体全体のレベルにて統合されている必要がある為、その情報伝達システムも細胞内部はもとより、近傍のみならず遠位にある細胞間にまでわたり、より複雑かつ厳密に制御される事で恒常性が維持されている。生体内において各種情報の伝達は、タンパク質のリン酸化リレーや、cAMP や金属イオンといったセカンドメッセンジャー分子などにより行われているが、この生体内情報伝達システムの全てのステップにおいてタンパク質は、レセプターやレギュレーター等などとして重要な役割を果たしており、生命維持に必須な役割を果たすそれら情報伝達システムの詳細な理解の為には、システムを構成しているこれらタンパク質の機能についての分子レベルでの解明が必要である。本研究では、X線結晶構造解析法により生体内情報伝達システムを構築しているタンパク質の立体構造解析を行い、構造学的見地よりこれらタンパク質の機能の詳細を明らかとし、それらタンパク質が含まれる情報伝達システム全体の分子レベルでの理解に貢献することを目的としている。

第一章：ヒト由来 MRP14 (S100A9)タンパク質のX線結晶構造解析

human MRP14 は分子量約 13 kDa のタンパク質であり、単量体当たり 2 つの EF-Hand を有し、S100 ファミリーに属する Ca^{2+} 結合タンパク質で、二量体にて機能する。MRP14 はそのホモログ・タンパク質である MRP8 と共に分化中の骨髄細胞にて時期特異的に発現が見られる他、リウマチなどの炎症疾患組織血清中でその濃度が増大することが知られている。これらタンパ

ク質は Ca^{2+} 濃度依存的にホモ及びヘテロ二量体を形成、好中球の血管内壁への接着促進に直接的に関与している事が明らかとなるなど、 Ca^{2+} 濃度依存的に炎症反応を促進する因子として注目を集めているが、その機能の詳細は未だ不明である。これら MRP が関与する炎症反応の調節機構の解明に向けホモ二量体 MRP14 の立体構造行い、電子密度が弱くモデルが構築できなかった C 末端側領域を除く部分で決定した (2.1 Å 分解能)。得られた構造は既に明らかとされている他の S100 ファミリータンパク質と同様 4 つの α ヘリックスから構成され、単量体間の疎水性相互作用にて二量体を形成していた。構造決定出来なかった C 末端領域は分子表面に位置しフレキシブルな構造をとっている事が予想された。この C 末端領域は Gly、His、Pro に富み NIF (neutrophil immobilizing factor) と相同なアミノ酸配列を持つなど MRP14 に特徴的な領域であり他分子との相互作用部位であるとされているが、本領域にアサインされている様々な機能を発揮する為に、この領域の自由度の高さは不可欠であると考えられた。2 つの EF-Hand motif を繋ぐ hinge 領域には CHAPS 分子が疎水性相互作用によって結合しており、複合体での構造解析が為されている他の S100 タンパク質との比較から、この領域が本タンパク質のリガンド結合領域である事が示された。さらに本タンパク質が協調的に作用を行う MRP8 の立体構造との比較より、これら分子表面にそれぞれ異なった電荷及び疎水性領域の偏りが存在することが明らかとなり、 Ca^{2+} 濃度依存的にホモ・ヘテロ二量体状態を変化させるこれら分子が有意に異なる他分子との相互作用部位を持つことが判明した事から、この二量体形成状態の変化が炎症反応の進行調整においてスイッチ的な役割を果たしている事が示唆された。

第二章：大腸菌由来シグナル伝達因子 OmpR ファミリータンパク質の構造学的考察

変化し続ける外部環境に直接さらされている原核生物は、生存の為にその環境変化に能動的に適応する必要がある。大腸菌由来 OmpR タンパク質は、バクテリアの中で最も良く知られた環境適応のための情報伝達システムを構成しているレギュレータータンパク質であり、OmpR に情報を伝達するセンサータンパク質 EnvZ と組みとなり二成分情報伝達系と呼ばれる最も基本的な情報伝達システムを形成している。大腸菌にはこの他にも OmpR と類似したアミノ酸配列を有する 15 種のレギュレーターが存在しており、OmpR ファミリーと呼ばれる一群を形成している。我々のグループにより既に解析が為されている OmpR-DNA 結合ドメインの立体構造を基に、近年構造解析例が増えつつあるこれらファミリータンパク質の立体構造を、一次構造と併せて比較検討する事により、類似した全体構造を保ちつつも、それぞれのタンパク質に特異的な機能を発揮している OmpR ファミリータンパク質について、その立体構造と機能との相関について構造学的側面より考察した。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 田 中 勲

副 査 教 授 新 田 勝 利

副 査 助教授 渡 邊 信 久

副 査 助教授 西 平 順 (北海道大学大学院医学研究科)

学 位 論 文 題 名

Structural studies into the signal transducer proteins by X-ray crystallography

(X線結晶構造解析法による、情報伝達タンパク質の構造学的研究)

バクテリアなどの単純な単細胞生物から、植物やほ乳類といった複雑な多細胞生物に至るまで、全ての生物種において幾種もの情報伝達システムが存在しており、生体内で生命維持に不可欠な役割を果たしている。単細胞生物においては、情報伝達システムは主に細胞内で完結しており、例えば外部環境変化を察知しそれに能動的に対応する為の情報伝達システムが知られている。細胞を様々に分化させ、それぞれ特化した機能を有する複数の器官が組み合わせり一個体を形成している多細胞生物においては、個々の器官、ひいてはその器官を構成している一つ一つの細胞の活動が個体全体のレベルにて統合されている必要がある為、その情報伝達システムも細胞内部はもとより、近傍のみならず遠位にある細胞間にまでわたり、より複雑かつ厳密に制御される事で恒常性が維持されている。生体内において各種情報の伝達は、タンパク質のリン酸化リレーや、cAMP や金属イオンといったセカンドメッセンジャー分子などにより行われているが、この生体内情報伝達システムの全てのステップにおいてタンパク質は、レセプターやレギュレーター等などとして重要な役割を果たしており、生命維持に必須な役割を果たすそれら情報伝達システムの詳細な理解の為には、システムを構成しているこれらタンパク質の機能についての分子レベルでの解明が必要である。本研究では、X線結晶構造解析法により生体内情報伝達システムを構築しているタンパク質の立体構造解析を行い、構造学的見地よりこれらタンパク質の機能の詳細を明らかとし、それらタンパク質が含まれる情報伝達システム全体の分子レベルでの理解に貢献することを目的としたものである。本研究では、まず炎症反応においてカルシウム濃度依存的に機能するヒト由来MRP14タンパク質の立体構造をX線結晶構造解析法を用いて解析し、構造

学的側面よりカルシウム依存的にスイッチング因子として機能する本タンパク質の機能を解明した。また，原核生物においては，2成分情報伝達系と呼ばれる最も基本的な情報伝達系を構築しているレギュレータータンパク質群OmpRファミリータンパク質について立体構造と機能について検討し，本タンパク質の構造機能相関について重要な知見を提示した。

以上，本論文は，情報伝達タンパク質の構造を決定することにより，その構造，機能相関を明らかにしたものであり，本研究が生物科学に及ぼす貢献には多大なものがあると考えられ，よって審査員一同は申請者が博士（理学）の学位を得る十分の資格があるものと認めた。