

## 論文内容の要旨

博士論文題目      Construction of protein nanostructures with thermostable  $c$ -type cytochrome mutants  
(熱安定  $c$  型シトクロムの変異体を用いたタンパク質ナノ構造体の構築)

氏 名              Ren, Chunguang

(論文内容の要旨)

タンパク質ナノ構造体は、金属配位、化学修飾、ホスト-ゲスト相互作用、疎水性相互作用、静電的相互作用などによる構築が報告されているが、新規タンパク質構造体の創製を目指し、新しい手法の開発研究が行われている。ドメインスワッピングは、タンパク質分子がその構造要素または構造領域を別分子の対応する要素または領域と交換する現象である。本論文では、ドメインスワップ構造をもとに熱安定なタンパク質構造体を構築することを目的としている。

第 1 章では、タンパク質構造体、ドメインスワッピング、シトクロム  $c$  を説明し、本研究の位置づけを示している。

野生型好熱性水素細菌 (HT) 由来シトクロム  $c_{552}$  は高次多量体の形成量が少ない。第 2 章では、その原因はヒンジループが短く、プロトマー間で立体障害が生じるためと考え、ヒンジループ中の Ala18 と Lys19 の間にグリシン残基 3 つを挿入した変異体を作製し (insG3 変異体)、ヒンジループを伸長するとエタノール処理により得られる高次多量体量が増大することを明らかにした。insG3 変異体の 2 量体には 2 種類が存在し、主成分の 2 量体では N 末端領域、副成分の 2 量体では C 末端領域がそれぞれプロトマー間で交換することを明らかにした。表面の疎水性を減らした insG3/W57K 変異体を用いて多量体を作製し、この多量体を透過型電子顕微鏡で観測すると、直径 7-10 nm の環状構造の像が得られた。環が 2 つ繋がった像も観測され、2 種類のドメインスワッピングが存在するため環が繋がったと推測した。

第 3 章では、超好熱性真正細菌 (AA) 由来シトクロム  $c_{555}$  のヒンジループ前後で N 末端領域 (Ala1-Ile52) と C 末端領域 (Val53-Lys87) を入れ替えた変異体を 80 °C で 1 時間静置すると、3 量体及び高次多量体が形成することを明らかにした。

第 4 章では、本論文の総括が示されている。

以上のように、本論文では、HT シトクロム  $c_{552}$  のヒンジループにグリシン残基 3 つを挿入した変異体が高次多量体を形成すること、この insG3 変異体の 2 量体に N 末端領域を交換した構造と C 末端領域を交換した構造の 2 種類が存在すること、insG3/W57K 変異体から作製した多量体には環状構造が含まれることを明らかにした。ヒンジループ前後で構造領域を入れ替えた AA シトクロム  $c_{555}$  変異体も多量体を形成することも明らかにした。

氏 名	Ren, Chunguang
-----	----------------

(論文審査結果の要旨)

タンパク質ナノ構造体は、金属配位、化学修飾、ホスト-ゲスト相互作用、疎水性相互作用、静電的相互作用などによる構築が報告されているが、新規タンパク質構造体の創製を目指し、新しい手法の開発研究が行われている。ドメインスワッピングは、タンパク質分子がその構造要素または構造領域を別分子の対応する要素または領域と交換する現象である。本論文では、ドメインスワップ構造をもとに、熱安定なタンパク質構造体を構築することを目的としている。好熱性水素細菌 (HT) 由来シトクロム *c*<sub>552</sub> と超好熱性真正細菌 (AA) 由来シトクロム *c*<sub>555</sub> は高い熱安定性を有し、ドメインスワッピングにより多量体を形成する。これらのタンパク質を用いて、ヒンジループの伸長、N 末端領域と C 末端領域の入れ替えにより多量体を構築した。本論文で得られた成果は以下の通りである。

1. 野生型 HT シトクロム *c*<sub>552</sub> は高次多量体の形成量が少ない。その原因はヒンジループが短く、プロトマー間で立体障害が生じるためと考え、ヒンジループ中の Ala18 と Lys19 の間にグリシン残基 3 つを挿入した変異体を作製し (insG3 変異体)、ヒンジループを伸長するとエタノール処理により得られる高次多量体量が増大することを明らかにした。insG3 変異体の 2 量体には 2 種類が存在し、主成分の 2 量体では N 末端領域、副成分の 2 量体では C 末端領域がそれぞれプロトマー間で交換することを明らかにした。表面の疎水性を減らした insG3/W57K 変異体を用いて多量体を作製し、この多量体を透過型電子顕微鏡で観測すると、直径 7-10 nm の環状構造の像が得られた。環が 2 つ繋がった像も観測され、2 種類のドメインスワッピングが存在するためと推測した。

2. AA シトクロム *c*<sub>555</sub> のヒンジループ前後で N 末端領域 (Ala1-Ile52) と C 末端領域 (Val53-Lys87) を入れ替えた変異体を 80 °C で 1 時間静置すると、3 量体及び高次多量体が形成することを明らかにした。

以上のように、本論文では、HT シトクロム *c*<sub>552</sub> のヒンジループにグリシン残基 3 つを挿入した変異体が高次多量体を形成すること、この insG3 変異体の 2 量体に N 末端領域を交換した構造と C 末端領域を交換した構造の 2 種類が存在すること、insG3/W57K 変異体から作製した多量体には環状構造が含まれることを明らかにした。ヒンジループ前後で構造領域を入れ替えた AA シトクロム *c*<sub>555</sub> 変異体も多量体を形成することを明らかにした。これらの結果は、タンパク質ナノ構造の構築に新しい知見を与えるものであり、本論文で得られた結果は生体分子科学分野、タンパク質科学分野の研究として高く評価でき、学術的に大きな意義がある。よって、審査委員一同は本論文が博士 (理学) の学位論文として価値あるものと認めた。