

論文内容の要旨

博士論文題目 **Photoactive Yellow Protein** における異常な
プロトン化状態を示すアルギニンに関する研究

氏 名 米澤 健人

(論文内容の要旨)

蛋白質の機能発現過程では、ほぼ例外なくプロトン移動反応が利用されている。プロトン移動反応はドナー・アクセプター基のプロトンの解離・結合反応によって構成されていることから、蛋白質による各反応基の pK_a 制御機構を理解することは、蛋白質の機能発現機構解明において本質的である。蛋白質内部の疎水環境に埋もれた解離性アミノ酸残基は電気的中性を保つように pK_a が保たれている。一方、溶媒と接している解離性アミノ酸残基のプロトン化状態は溶液の pH のみに依存するため、プロトン移動反応を能動的に制御する因子にはなり得ないと考えられてきた。しかしながら、所属研究室では光センサー蛋白質 **Photoactive Yellow Protein (PYP)** のアルギニン(Arg52)が水分子と接する環境下に存在しながらも電気的中性となっていることを明らかにしてきた。先行する理論研究から、近傍に存在する発色団(pCA)と Glu46 間の水素結合と Arg52 のプロトン化状態と何らかの関係にあることが示唆されてきている。本論文では、異常なプロトン化状態をとる Arg とその環境に着目し、Arg の pK_a の蛋白質による制御・調節機構を明らかにすることを目的とした。得られた成果は以下の通りである。

- 1) E46Q 変異体の X 線・中性子結晶構造解析から、Glu46 を Gln に置換することで、野生型で観測された低障壁水素結合(LBHB)は通常の水素結合へと変化することを明らかにした。
- 2) この水素結合の変化に伴い、Arg52 においてカチオン型が占める割合が 24% (野生型) から 67% (変異体) まで増加することがわかった。以上の結果から、Glu46-pCA 間の水素結合が Arg52 の pK_a 調節に関与していることを明らかにした。
- 3) Arg52 が存在する蛋白質表面クレフト内が解離性アミノ酸残基に与える影響を調査するために、R52 をアスパラギン酸に置換し、その pK_a を同定した。アスパラギン酸の側鎖の pK_a は水溶液中での 3.8 であるのに対し、クレフト内では 7.5 まで上昇していたことを明らかにし、クレフト内が疎水的な環境であることを示した。
- 4) 光反応過程における Arg52 のプロトン化状態の変化を調べるため、赤外吸収分光測定と密度汎関数理論(DFT)計算を行った。本解析によって PYP_L 中間体形成過程で Arg52 はカチオン体に変化することが明らかになった。2) の結果を踏まえ、光反応で生じる pCA の異性化により Glu46-pCA 間の LBHB が通常の水素結合に変化したことで、Arg52 の pK_a が増加することが直接の原因であると考察した。

以上の結果、光センサー蛋白質 (PYP) では、暗状態で電気的中性に保たれた Arg52 が、pCA の異性化反応に伴う水素結合の変化を介して、その pK_a が能動的に制御・調節されプロトン化状態を変化させることが明らかとなった。更に、Arg52 が PYP_L でカチオン体になることによって、活性中間体における Arg52 の側鎖構造変化を誘起していることを示した。この一連の表面電荷の変化によって、蛋白質間相互作用が制御されているとのモデルを提唱し、PYP の作動原理の一端を示すに至った。

(論文審査結果の要旨)

蛋白質の機能発現過程では、ほぼ例外なくプロトン移動反応が利用されている。プロトン移動反応はドナー・アクセプター基のプロトンの解離・結合反応によって構成されていることから、蛋白質による各反応基の pK_a 制御機構を理解することは、蛋白質の機能発現機構解明において本質的である。本研究では、光センサー蛋白質(PYP)で発見された異常なプロトン化状態をとるアルギニン(Arg52)とその環境に着目し、その pK_a の制御・調節機構を明らかにすることを目的としている。得られた成果は以下の通りである。

- 1) E46Q 変異体の X 線・中性子結晶構造解析から、Glu46 を Gln に置換することで、Arg52 の近傍に存在する低障壁水素結合(LBHB)が通常の水素結合へと変化することを明らかにした。
- 2) この水素結合の変化に伴い、Arg52 においてカチオン体が占める割合が 24% (野生型) から 67% (変異体) まで増加することがわかった。以上の結果から、Glu46-pCA 間の水素結合が Arg52 の pK_a 調節に関与していることを明らかにした。
- 3) Arg52 が存在する蛋白質表面クレフト内が解離性アミノ酸残基に与える影響を調査するために、R52 を形と電荷が異なるアスパラギン酸に置換し、その pK_a を同定した。アスパラギン酸の側鎖の pK_a は水溶液中での 3.8 であるのに対し、クレフト内では 7.5 まで上昇していたことが明らかとなり、この結果を踏まえ、クレフト内の環境が疎水的であることを示した。
- 4) 光反応過程における Arg52 のプロトン化状態の変化を調べるため、赤外吸収分光測定と密度汎関数理論(DFT)計算を行った。本解析によって PYP_L 中間体形成過程で Arg52 は中性体からカチオン体に変化することが明らかになった。2) の結果を踏まえ、光反応で生じる pCA の異性化により、Glu46-pCA 間の LBHB が通常の水素結合に変化したことで、Arg52 の pK_a が増加することが直接の原因であると考察した。

以上の結果、光センサー蛋白質 (PYP) では、暗状態で電気的中性に保たれた Arg52 が、pCA の異性化反応に伴う水素結合の変化を介して、その pK_a が能動的に制御・調節されプロトン化状態を変化させることが明らかとなった。更に、Arg52 が PYP_L 中間体でカチオン体になることによって、活性中間体における Arg52 の側鎖構造変化を誘起しているとのモデルを提案した。この一連の表面電荷の変化によって、蛋白質間相互作用が制御されていると推測され、PYP の作動原理の一端を示すに至った。

本論文は、蛋白質科学的に重要であり学術的価値が高い。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のあるものと認めた。