

論文内容の要旨

博士論文題目 シトクロム c_{555} の円順列変異とヘリックスリンカー挿入による人工タンパク質の創成とその超分子化に関する研究

氏名 小田 祥也

(論文内容の要旨)

タンパク質構造体はバイオマテリアルへの応用が期待され、その人工構築に関する研究が盛んに行われている。超好熱菌 *Aquifex aeolicus* 由来シトクロム (cyt) c_{555} は Val53-Lys57 をヒンジループとして C 末端領域を交換するドメインスワッピングにより多量化する。本論文では、円順列変異と α ヘリックスリンカー挿入によりタンパク質を設計し、その超分子化を目的としている。

第 1 章では、これまでに報告されているタンパク質ナノ構造体の構築法を紹介し、本研究の位置づけを示している。

第 2 章では、cyt c_{555} をドメインスワッピングの始点である Val53 から C 末端の Lys87 を N 末端側に配置し (円順列変異)、円順列変異の結合部に 9 残基のアミノ酸からなる α ヘリックスリンカーを挿入したタンパク質 **BBP- ℓ 9** を設計した。**BBP- ℓ 9** の単量体溶液を乾燥後、残渣を超純水に再溶解することにより、3 量体を主成分とする多量体を得られた。**BBP- ℓ 9** 3 量体は、**BBP- ℓ 9** 分子の N 末端領域が別の **BBP- ℓ 9** 分子の C 末端領域と相互作用し、挿入した α ヘリックスリンカーが折れ曲がることにより 3 角形構造を形成することを X 線結晶構造解析により明らかにした。

第 3 章では、**BBP- ℓ 9** 3 量体の活性部位と球状ユニットの構造が cyt c_{555} の構造と類似していることを吸収および CD スペクトルにより示した。**BBP- ℓ 9** 単量体では挿入したリンカーの一部がループ構造となっているが、3 量体の形成によりリンカー全長が α ヘリックスに変化することが示唆された。さらに、**BBP- ℓ 9** 3 量体は結晶中で 3 量体間に水素結合を形成することによって 4 つ集まり、4 面構造体を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、円順列変異と結合部への α ヘリックス挿入により、3 角形構造を有する **BBP- ℓ 9** 3 量体を作製した。さらに、**BBP- ℓ 9** 3 量体は結晶中で 3 量体間に水素結合を形成することによって 4 つ集まり、4 面構造体を形成することが明らかとなった。円順列変異と結合部への α ヘリックス挿入を組み合わせる本手法は新しいナノ構造体の構築に有用であることが示された。

氏名	小田 祥也
----	-------

(論文審査結果の要旨)

タンパク質構造体はバイオマテリアルへの応用が期待され、その人工構築に関する研究が盛んに行われている。これまでに、超好熱菌 *Aquifex aeolicus* 由来シトクロム (cyt) *c*₅₅₅ が Val53-Lys57 をヒンジループとして C 末端領域を交換するドメインスワッピングにより多量化することが報告されている。本論文では、円順列変異と α ヘリックスリンカー挿入によりタンパク質 **BBP- ℓ 9** を設計・作製し、タンパク質構造体を構築した。本論文で得られた成果は以下の通りである。

1. cyt *c*₅₅₅ の N 末端 α ヘリックスと C 末端 α ヘリックスが相互作用していることに着目し、cyt *c*₅₅₅ を Ile52 と Val53 の間で切断し、N 末端領域と C 末端領域を入れ替え (円順列変異)、円順列変異の結合部に 9 残基のアミノ酸からなる α ヘリックスリンカーを挿入したタンパク質 **BBP- ℓ 9** を設計した。**BBP- ℓ 9** の単量体溶液を乾燥後、残渣を超純水に再溶解することにより、3 量体を主成分とする多量体を得られた。**BBP- ℓ 9** 3 量体は、**BBP- ℓ 9** 分子の N 末端領域が別の **BBP- ℓ 9** 分子の C 末端領域と相互作用し、挿入した α ヘリックスリンカーが折れ曲がることにより 3 角形構造を形成することを X 線結晶構造解析により明らかにした。

2. **BBP- ℓ 9** 3 量体の活性部位と球状ユニットの構造が cyt *c*₅₅₅ の構造と類似していることを吸収および CD スペクトルにより示した。**BBP- ℓ 9** 単量体では挿入したリンカーの一部がループ構造となっているが、3 量体の形成によりリンカー全長が α ヘリックスに変化することが示唆された。さらに、**BBP- ℓ 9** 3 量体は結晶中で 3 量体間に水素結合を形成することによって 4 つ集まり、4 面構造体を形成することを明らかにした。

以上のように、本論文では、cyt *c*₅₅₅ のドメインスワップ 2 量体のヒンジループでの円順列変異と結合部の α ヘリックス伸長を施したタンパク質 **BBP- ℓ 9** を設計・作製した。さらに、**BBP- ℓ 9** は乾燥と再溶解により 3 量体を主成分とする多量体を形成し、**BBP- ℓ 9** 3 量体は結晶中で 4 つ集まって、比較的小さな 4 面構造体を形成した。これらの結果は、タンパク質ナノ構造体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タンパク質科学分野、生体分子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。