

## 論文内容の要旨

博士論文題目 タンパク質の動的挙動に基づく修飾分子の機能スイッチング  
およびタンパク質表面における分子配向

氏 名 藤井 亮

(論文内容の要旨)

天然タンパク質中のアミノ酸側鎖官能基の位置・配向が事前組織化されていることを活用して、素材タンパク質に合成化学的手法、遺伝子工学的手法による修飾を施して、非天然タンパク質を創成する研究がさかんに行われている。一方、アデニル酸キナーゼ(Adk)のように、外部刺激に対して数十オングストローム単位の大きな構造変化を示すものがある。本論文では、Adkの構造変化(動的構造効果)に基づいた化学修飾分子の機能スイッチングシステムの構築と、タンパク質表面におけるピレンプローブの構造柔軟性、スタッキング挙動、分光学的性質の相関関係を明らかにすることを目的としている。

第1章では、従来の非天然タンパク質創成の研究例と構築方法を説明し、本研究の位置づけを示している。

第2章では、大腸菌由来AdkのA55C/C77S/V169Cトリプルミュータントのピレン修飾と、Adk触媒サイクルに呼応したピレンモノマー・エキシマー蛍光の発光特性双方向スイッチングシステムの構築について述べている。さらに、発光特性スイッチングが、Adk一分子の構造変化に基づくものであり、観測されるスペクトル挙動が、Adkの基質結合様式を忠実に反映していることを示している。

第3章では、上記のAdk変異体に対して、メチレンリンカー鎖の異なるピレンプローブを導入し、定常状態蛍光測定、時間分解蛍光測定の実験結果から、ピレンプローブの構造柔軟性、ピレン環のスタッキング挙動、分光学的特性の相関関係を議論している。また、Adkの補因子であるマグネシウムイオンの有無による微小な構造差異の検出およびリン酸基転移過程でのタンパク質構造変化の重要性について述べている。さらに、X線結晶構造解析によりタンパク質表面上におけるピレンスタッキング構造を明らかにした。

第4章では、本論文の総括と、素材タンパク質の動的構造効果に基づく非天然タンパク質創成の展望について述べている。

以上のように、本論文では、大きな構造変化を示すタンパク質を基盤とした機能スイッチングを示す非天然タンパク質の創成が可能であることを示すとともに、ピレンのタンパク質表面における分光学的挙動、プローブ構造の柔軟性、ピレン環のスタッキング挙動の相関関係を詳細に検討し、バイオプローブとしてピレンを用いる際の考慮すべき事項を提案した。

(論文審査結果の要旨)

タンパク質は、高次構造の組み合わせにより、機能発現に必要なアミノ酸側鎖官能基の位置・配向が最適化された高分子化合物である。この特徴に基づき、天然タンパク質構造を、合成化学的手法、遺伝子工学的的手法により修飾し、様々な機能を持った非天然タンパク質・酵素を創成する研究が盛んに行なわれている。これまでに報告された実施例の多くは、素材タンパク質の結晶構造を基に分子設計する「タンパク質の静的構造的特徴」に基づいている。藤井氏は、ATP/ADP/AMP 間のリン酸基転移反応を媒介するアデニル酸キナーゼ (Adk) が、機能発現時に数十オングストローム単位の大きな構造変化を示すことに着目し、Adk を素材として、タンパク質の「動的挙動効果」に立脚した機能スイッチングを示す非天然タンパク質の創成が可能であることを示した。また、ピレンプローブの構造、相互作用形式と、観測される分光学的特徴の相関関係を詳細に検討し、ピレンのエキシマー蛍光により生体分子の相互作用を評価する際の考慮すべき事項を提案した。本論文で得られた成果は以下の通りである。

1. 大腸菌由来 Adk の異なるドメインに属する2つのアミノ酸残基 (Ala55、Val169) をシステインに変異させ、さらに Cys77 をセリンに変異させた Adk トリプルミュータントに対して、システイン残基にピレンイルヨードアセトアミドを反応させ、化学修飾 Adk を調製した。藤井氏は、この化学修飾 Adk が、Adk 触媒サイクルに基づいたピレンモノマー・エキシマー蛍光の双方向スイッチング機能を発現することを示した。さらに、蛍光スペクトル変化が、Adk 一分子のモーションに起因するものであり、Adk 本来がもつ基質結合様式、固有の動的挙動を忠実に反映していることを実験的に証明した。

2. 有機合成によって得られたメチレンリンカー鎖長の異なる3種類のピレンプローブ分子を上記の Adk 変異体に導入し、定常状態および時間分解蛍光測定の結果を基に、蛍光特性とピレン環同士のスタッキング挙動を議論した。従来のピレンプローブを用いた生体分子の研究では、定常状態測定で観測されたエキシマー蛍光の強度を基に、生体分子同士あるいは一分子中のアミノ酸残基の近接状況が検討されてきた。しかし、藤井氏は、実験結果から、タンパク質表面上におけるピレン環の近接挙動はプローブ分子の柔軟性に強く依存するため、ピレン近傍の位置配向を評価するには、定常状態および時間分解測定両方の実験データを合わせて議論を行う必要があり、タンパク質の柔軟な位置にピレンプローブを導入した際には、これらの観測手法の組み合わせが厳密に考慮されるべき事項であると指摘した。また、Adk の補因子であるマグネシウムイオンの有無により、基質結合状態においても微小な構造差異があることを分光学的に検出し、リン酸基転移過程におけるタンパク質構造変化が存在することを提唱した。さらに、X線結晶構造解析によって、タンパク質表面上でのピレ

ン環のスタッキング構造を初めて明らかにした。

以上のように、本論文は、素材タンパク質の構造動的挙動に立脚した非天然タンパク質の設計というタンパク質工学分野における新しいトレンドを提案する研究として高く評価できる。また、酵素反応の遷移状態における微小な構造変化の重要性、バイオプローブとして使われるピレンの分光学的性質と生体分子における相互作用を検証する際の考慮すべき事項を指摘しており、本論文の内容は、生体分子科学の基礎研究の内容としても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（工学）の学位論文として価値あるものと認めた。