

論文内容の要旨

博士論文題目 Studies on 3D domain swapping of azurin from *Alcaligenes xylosoxidans*

(アルカリジェネシスキシロソキシダンス由来アズリンの3D ドメインスワッピングに関する研究)

氏名 Cahyono Robby Noor

(論文内容の要旨)

3次元(3D)ドメインスワッピングは、同一タンパク質が分子間で同一構造領域を交換することにより、2量体以上の多量体を形成する機構である。電子伝達タンパク質であるc型シトクロムを含む様々なタンパク質はドメインスワッピングすることが知られているが、電子伝達タンパク質グループであるブルー銅タンパク質のドメインスワッピングに関する報告はない。そこで、本論文では、ブルー銅タンパク質であるアズリンがドメインスワッピングすることを示し、アズリン2量体の性質と立体構造を明らかにすることを目的としている。

第1章では、ドメインスワッピング、銅タンパク質、アズリンについて説明し、本研究の位置づけを示している。

第2章では、アズリンのCu(I)型は、pH 5.0で2,2,2-トリフルオロエタノール5% (v/v)添加、凍結乾燥、pH 7.0で再溶解の操作により多量化し、精製したアズリン2量体が比較的安定であることを示した。アズリン2量体の可視領域での最大吸光波長は618 nmで、単量体の最大吸光波長(622 nm)から少しブルーシフトした。アズリン2量体のEPRスペクトルのA_{||}値(5.85 mT)は単量体の値(5.95 mT)より若干小さく、ロンビック型スペクトル性が若干増大した。さらに、アズリン2量体の酸化還元電位は342±5 mV (vs NHE)で、単量体よりも50 mV高かった。これらの結果より、アズリン2量体の銅活性部位構造がドメインスワッピングにより若干変化することが明らかとなった。

第3章では、X線結晶構造解析により、アズリン2量体では3つのβストランドを含むN末端領域がプロトマー間で交換することが明らかとなった。アズリン2量体の銅配位構造は単量体と同様、歪んだ四面体構造を形成していたが、Cu-O (Gly45)結合長は2量体の方が長かった(単量体: 2.46-2.59 Å、2量体: 2.98-3.25 Å)。単量体で形成されるAsn10-His46間の水素結合は2量体では形成されないためGly45の構造束縛が緩和され、Cu-O (Gly45)結合が伸長したと解釈した。

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、ドメインスワッピングしたアズリン2量体の性質と立体構造を明らかにし、銅タンパク質でドメインスワッピングが起こることを初めて示した。これらの結果は、タンパク質のドメインスワッピングに新しい知見を与えた。

(論文審査結果の要旨)

3次元(3D)ドメインスワッピングは、同一タンパク質が分子間で同一構造領域を交換することにより、2量体以上の多量体を形成する機構である。電子伝達タンパク質であるc型シトクロムを含む様々なタンパク質はドメインスワッピングすることが知られているが、電子伝達タンパク質グループであるブルー銅タンパク質のドメインスワッピングに関する報告はない。本論文では、ブルー銅タンパク質であるアズリンがドメインスワッピングすることを示し、アズリン2量体の性質と立体構造を単量体と比較した。本論文で得られた成果は以下の通りである。

1. アルカリジェネシスキシロソキシダンス由来アズリンのCu(I)型は、pH 5.0で2,2,2-トリフルオロエタノール5% (v/v)添加、凍結乾燥、pH 7.0で再溶解の操作に多量化したが、Cu(II)型に同様の操作を行っても、ほとんど多量多量化しなかった。精製したアズリン2量体は60°Cで60分間加熱しても単量体に解離せず、比較的安定であることが示された。アズリン2量体の可視領域での最大吸光波長は618 nmで、単量体の最大吸光波長(622 nm)から少しブルーシフトした。アズリン2量体のEPRスペクトルの A_{\parallel} 値(5.85 mT)は単量体の値(5.95 mT)より若干小さく、ロンビック型スペクトル性が若干増大した。さらに、アズリン2量体の酸化還元電位は 342 ± 5 mV (vs NHE)で、単量体よりも50 mV高かった。これらの結果より、アズリン2量体の銅活性部位構造がドメインスワッピングにより若干変化することが明らかとなった。

2. X線結晶構造解析により、アズリン2量体では3つの β ストランドを含むN末端領域がプロトマー間で交換することが明らかとなった。アズリン2量体の銅配位構造は単量体と同様、歪んだ四面体構造を形成していたが、Cu-O (Gly45)結合長は2量体の方が長かった(単量体:2.46-2.59 Å, 2量体:2.98-3.25 Å)。単量体で形成されるAsn10-His46間の水素結合は2量体では形成されず、His46はGly45の隣の残基であるため、His46が関与する水素結合の消失によりGly45の構造束縛が緩和され、Cu-O (Gly45)結合が伸長したと解釈した。

以上のように、本論文では、ドメインスワッピングしたアズリン2量体の性質と立体構造を明らかにし、銅タンパク質で3Dドメインスワッピングが起こることを初めて示した。これらの結果は、タンパク質の3Dドメインスワッピング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。