

## 論文内容の要旨

博士論文題目 化学修飾タンパク質の構造変化による合成分子間相互作用の制御とタンパク質化学修飾に対する局所構造効果に関する研究

氏名 三宅 輝幸

(論文内容の要旨)

人工タンパク質の創成研究において、遺伝子工学的な方法と並んで、合成分子とタンパク質からなる「ハイブリッドタンパク質」を構築する方法があり、従来、タンパク質の事前組織化された高次構造に基づく分子設計が行われてきた。しかし、生体高分子であるタンパク質は事前組織化された構造的特徴とともに、構造柔軟性を併せもっている。このような動的構造効果の利用は、新たな人工タンパク質の設計戦略になると考えられる。そこで、本論文では、アデニル酸キナーゼ A55C/C77S/V169C 変異体(Adk<sub>tm</sub>)を用いて「タンパク質構造変化による同種金属錯体/異種合成分子の相互作用制御」の検討を行うとともに、異種合成分子を位置選択的に導入する方法を確立するために、タンパク質化学修飾の標的部位の反応性を決定する要因の同定およびその利用例を述べている。

第1章では、最近の非天然タンパク質の創成研究と、異種合成分子の相互作用制御による機能創発の研究例を述べ、本研究の位置づけを示している。

第2章では、ヨードアセトアミド部位を有する Co(II)サレン錯体の合成、Adk<sub>tm</sub> 表面にある Cys55 および Cys169 の Co(II)サレン錯体による修飾を述べている。更に、このサレン錯体修飾タンパク質の構造が変化した場合に、サレン錯体同士が接近し、2つのサレン錯体の協同効果によって、エポキシドの開環反応が促進されることを述べている。

第3章では、Adk<sub>tm</sub> 表面にある Cys55 および Cys169 残基の反応性について、タンパク質表面であっても、隣接する酸性アミノ酸残基の存在、化学修飾箇所近傍の局所的構造柔軟性が、これらの残基の反応性すなわち化学修飾効率に大きな影響を及ぼすことを示している。

第4章では、第3章の知見を利用して、Adk<sub>tm</sub> にピレンとフェナントロリンを逐次的に位置選択的修飾を施し、小分子の結合に伴うタンパク質構造変化をトリガーとして、これらの修飾分子のタンパク質表面におけるスタッキングをピレンの蛍光消光によって観測した。また、分子動力学計算により、スタッキング構造と蛍光消光の効率の相関関係、スタッキング構造を効率化するアミノ酸残基の役割を指摘している。

第5章では、本論文の総括と展望が示されている。

以上のように、本論文では、タンパク質の動的構造効果を利用した同種金属錯体/異種合成分子の相互作用制御を達成するとともに、タンパク質表面での位置選択的修飾において局所構造効果に着目することの重要性を実証した。

(論文審査結果の要旨)

タンパク質工学研究における人工タンパク質の構築には、遺伝子工学的方法と並んで、合成分子とタンパク質からなる「ハイブリッドタンパク質」を構築する方法があり、従来、タンパク質の事前組織化された構造に基づく分子設計が行われてきた。しかし、タンパク質は構造柔軟性を併せもっており、このような動的構造効果の利用は、新たなタンパク質工学の研究戦略になると考えられる。そこで、本論文では、アデニル酸キナーゼ A55C/C77S/V169C 変異体 (Adk<sub>tm</sub>)を用いて「タンパク質構造変化による同種金属錯体/異種合成分子の相互作用制御」の検討、異種合成分子を位置選択的に導入する方法の確立において必要となるタンパク質化学修飾箇所の反応性の決定要因の同定を行った。

1. タンパク質構造変化に基づく Co(II)サレン錯体同士の協同効果の発現、およびそれに起因する金属触媒反応の制御が可能であることを示すために、ヨードアセトアミド部位を有する Co(II)サレン錯体を合成し、Adk<sub>tm</sub> 表面にある Cys55、Cys169 に導入した。この化学修飾タンパク質において、小分子結合に伴ってタンパク質の全体構造が変化し、Co(II)サレン錯体同士が接近することで、エポキシドの開環反応活性が促進する現象を見出した。

2. タンパク質表面での位置選択的的化学修飾は一般に困難であるとされている。このことを詳細に検証するために、Adk<sub>tm</sub> 表面の Cys55 および Cys169 残基の反応性を支配する要因をピレン分子の修飾効率をもとに評価した。その結果、タンパク質表面であるにも関わらず、Cys55 の化学修飾過剰率は 38%と、高い反応性が示された。その理由を明らかにするために、K50A/A55C/C77S/V169C 四変異体を新たに構築し、化学修飾効率を検証したところ、Cys55 の化学修飾過剰率は 74%まで上昇した。分子動力学計算による構造シミュレーションの結果から、Cys55 周辺の構造柔軟性と Cys169 に隣接する酸性アミノ酸残基の存在が反応性の差を生み出す原因であることを見出し、これらの要因を加味すれば、タンパク質表面であっても位置選択的的化学修飾が可能であることを提唱した。さらに、この知見を応用して、ピレンとフェナントロリンを位置選択的に導入し、これらの分子のスタッキングによる蛍光消光効率、分子動力学シミュレーションによって、スタッキング構造を決定する近傍アミノ酸残基を同定した。

以上のように、本論文では、タンパク質の動的構造効果による機能制御という新たな人工タンパク質の創成戦略を提案するとともに、タンパク質表面における位置選択的的化学修飾に必要な知見を明らかにした。本論文で得られた結果はタンパク質工学、機能分子化学、生物物理化学の融合研究として評価でき、学術的に意義がある。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。