

## 論文内容の要旨

博士論文題目

Simplification of the Amino-Acid Sequence of Photoactive Yellow Protein with a Set of Simple Rules

(イエロープロテインのアミノ酸配列単純化に関する研究)

氏名 白井 久美子

(論文内容の要旨)

タンパク質の固有の立体構造や特異的機能は、アミノ酸配列に記述されている。アミノ酸配列に記述された情報を解読することは、第2の遺伝暗号解読問題と呼ばれ、ポストゲノム時代のタンパク質科学の最重要課題の一つである。しかし、アミノ酸配列には構造や機能に寄与しない余分な情報が含まれるため、我々は未だその解を得るに至っていない。本研究は、簡単な規則に従ってアミノ酸配列を単純化し、配列に記述された情報を解読することを目的に、Photoactive yellow protein (PYP)を対象として行われた。

設定した単純化の規則は、親水性残基 S, T, N, Q, H は S に、疎水性残基 A, V, L, I, M は V に、酸性残基 D, E は D に、塩基性残基 K, R は K に、芳香族残基 F, Y, W は F に変換し、G, P, C および N 末端 M は残すというものである。これにより9種類の残基で構成された単純化タンパク質を作製した (sPYP0)。更に PYP の相同タンパク質間で保存されている残基を回復させた sPYPI、sPYPII に親水性残基、疎水性残基をそれぞれ回復させた単純化 PYP を sPYPIII の3種類も作製した。4種類の単純化 PYP は、野生型と同程度に発現したものの発色団再構成能を損失していた。sPYPIII 以外は野生型と異なった二次構造を獲得していた。つまり、50%以上の配列一致度を有しながら別の構造へと折り畳まれるタンパク質の創製に成功したといえる。これらの結果は、タンパク質構造に対する二つの対立する一般的描像 (ジグソーパズル描像と油滴描像) は、ともに不十分であることを示すものである。また、トリフルオロエタノール中で、sPYPIII は、野生型様の  $\alpha$ ヘリックス構造を形成するのに対し、他の三者は  $\beta$ 構造を形成した。

次いで野生型と単純化 PYP とのキメラによる部分的単純化を検討した。まず sPYPIII を用いた部分的単純化を行い、PYP が単純化を許容することが示唆された。そこで、最大限単純化した配列を得るため、sPYP0 を用いた部分的単純化を行った。その結果、PYP の構造形成に関して、定性的に同じアミノ酸であれば単純化を許容する部位 (1-57 残基、及び T70, E74, Y76, E81, E93, Y118)、定性的に同じアミノ酸であっても単純化を許容しない部位 (E93 と Y118 を除く 87-125 残基、及び I58, N61, A67, A84) を見出すことができた。また、構造形成に重要な情報は  $\beta$ -scaffold 領域 ( $\beta 4\sim\beta 6$ ) に集中しており、特に  $\alpha 5$  と  $\beta 4$ 、 $\beta 4$  と  $\beta 5$  を繋ぐループにある7つの親水性残基 (N87, N89, T90, T95, Q99, T101, T103) が構造保持に重要であることが示唆された。機能に関しては、1-27 残基と 42-86 残基に重要な情報が含まれることを明らかにした。以上の結果は、構造に重要な領域と機能に重要な領域が基本的に分離して存在していることを示している。

以上のように、簡単な規則を用いて PYP の部分的単純化に成功した。これまでの単純化は表現型による選択が採用されており、失敗例を含めて単純化タンパク質の構造物性や機能を詳細に議論された例は本研究が初めてである。

(論文審査結果の要旨)

タンパク質の固有の立体構造や特異的機能は、アミノ酸配列に記述されている。アミノ酸配列に記述された情報を解読することは、第2の遺伝暗号解読問題と呼ばれ、ポストゲノム時代のタンパク質科学の最重要課題の一つである。本論文では、この問題にアミノ酸配列の単純化という方法を用いて取り組んでいる。これまでの単純化の試みは、表現型による選択で行われており、単純化の規則性を理解するには至っていない。また、単純化タンパク質を精製してその構造物性研究に至った例はほとんどない。このような背景の中で、申請者は、簡単な規則に基づき単純化を図るおよび単純化配列と野生型配列のキメラを用いて単純化を進めるという独自の二つの戦略のもとに、イエロープロテインを用いて研究を展開した。得られた成果は以下のとおりである。

1. 簡単な規則での全長にわたる単純化は不可能であるが、この規則により作製された単純化タンパク質は、固有の二次構造を取る。また、保存されている残基だけでは立体構造を形成するための情報が不十分であることを示した。さらに、親水性残基を回復すると野生型とは異なる構造を取り、疎水性残基を回復した単純化タンパク質は水溶液中では二次構造を取らないが、TFE 中では、野生型と同様の $\alpha$ ヘリックス構造を取ることも明らかにした。これらの結果は、タンパク質構造に対する二つの対立する一般的描像（ジグソーパズル描像と油滴描像）は、ともに不十分であることを示すものである。

2. 部分的単純化により、イエロープロテインのC末の $\beta$ ストランドに構造形成、機能発現に重要な情報が記述されていることを明らかにし、親水性残基の重要性を指摘した。また、今回規定した規則により単純化できる領域を明確に示した。

以上のように、本論文では単純化の手法がアミノ酸配列情報の解読に有用であることを示すばかりでなく、機能分化や新規タンパク質の設計の研究にも応用できる可能性を示しており、タンパク質科学的、タンパク質工学的に重要であり、学術的価値が高い。よって、審査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。