

## 論文内容の要旨

博士論文題目     **Structural Analysis of Photoactive Yellow Protein by Neutron Crystallography**  
(Photoactive Yellow Protein の中性子結晶構造解析)

氏 名            山口 繁生

(論文内容の要旨)

タンパク質の機能の多くは、水素結合を介したプロトン化/脱プロトン化反応が担っており、水素原子の位置決定による水素結合の実体の解明は、本質的な課題である。水溶性の光受容タンパク質である **Photoactive Yellow Protein** (以下 **PYP**) の光情報伝達機構においては、通常の水素結合に加えて、強い短距離水素結合や **CH/π**、**CH/O** の弱い水素結合が寄与していることが示されている。本研究では、これらの水素結合の実体を解明するために、**PYP** の高分解能中性子結晶構造解析を行ったものである。

第1章は、タンパク質における水素原子位置決定の重要性、低障壁水素結合、中性子構造解析の重要性等研究背景を述べ、研究目的を記載している。

第2章では中性子結晶構造解析に必要な巨大結晶作製法の開発について述べている。**NaCl** が結晶化領域を拡張する効果があることを発見した上、結晶化条件の最適化を行い、最終的に  $2.89 \times 0.85 \times 0.79 \text{mm}^3$  の巨大結晶の調整に成功している。この結晶は、室温で、 $1.5 \text{Å}$ 、 $1.25 \text{Å}$  まで中性子及びX線回折斑点を与える良質な単結晶であった。

第3章では水素を除く原子の精密化をX線回折データで行い、水素(重水素)原子のみ中性子回折データを用いるという中性子/X線回折併用法という高分解能中性子構造解析の新しい解析法を開発している。これにより、これまでの中性子構造解析の精密化法の弱点を克服し、水素構造の信頼度を上げることに成功している。

第4章では、得られた **PYP** の中性子構造について詳細な議論を行なっている。全 942 個の水素原子のうち 819 個の水素原子の位置を同定した。その結果、発色団と **E46** の間の短距離水素結合は低障壁水素結合であること、発色団と **Y42** の短距離水素結合は短距離イオン性水素結合であること、推定されていた **CH/O** 水素結合が実在していること、**R52** が脱プロトン化していることなど重要な発

見をしている。その他、低障壁水素結合がタンパク質内部の孤立した負電荷を安定化する機構を解明し、励起状態で速いプロトン移動と通常の水素結合への緩和が光反応のトリガーとなるという新しい機構を提唱している。また、低障壁水素結合の形成要因について明らかにしている。

以上をまとめて、タンパク質構造形成や機能発現における低障壁水素結合の重要性等を第5章で議論している。

以上のように、本論文は、PYP の高分解能中性子結晶構造解析により水素原子を含む構造を決定し、これまで議論できなかつた低障壁水素結合や解離性残基のプロトン化状態を明らかにした。特に、低障壁水素結合がタンパク質に存在していることを明らかにしたのは、世界で初めての成果である。また、中性子構造解析のための巨大結晶化法の開発、中性子構造解析の新しい解析法の実現を行っている。これらの方法は、今後タンパク質中性子構造解析の標準的手法となるであろう。本研究成果は、タンパク質科学、光生物学、量子化学、水素結合の物理化学など様々な分野への波及効果が期待されるものである。

## (論文審査結果の要旨)

蛋白質の機能のほとんどが、プロトン化/脱プロトン化という水素原子の脱吸着で進行する。このために水素結合が重要な役割を果たす。このメカニズムを理解するためには、水素原子の位置を含めて構造を明らかにしなければならない。

本研究では、光反応に通常の水素結合に加え、強い短距離水素結合や CH/ $\pi$ 、CH/O といった弱い水素結合が重要な役割をしていることが明らかになっているイエロープロテイン (PYP) について、高分解能中性子結晶構造解析を行い、水素原子を含めた構造を明らかにしたものである。本論文で得られた成果は、以下の通りである。

1. PYP の結晶化条件の詳細な検討に基づき、中性子結晶構造解析に必要な PYP の巨大結晶の作製に成功した。得られた結晶は、室温下で、中性子に対し 1.5 Å、X線に対し 1.25 Å 分解能の回折像を与える良質な単結晶であった。
2. 中性子構造解析において、X線結晶構造解析を併用する新しい解析法を考案し、構造の信頼性を上げることに成功した。この方法は、今後タンパク質高分解能中性子構造解析の標準的解析法となると期待される。
3. PYP に含まれる全 942 個の水素原子のうち、819 個の水素原子の位置を決定した。この結果、発色団と E46 の間の短距離水素結合は、低障壁水素結合であることを明らかにした。これは、タンパク質内で低障壁水素結合が存在することを示した世界最初の例である。また、発色団と Y42 の間の短距離水素結合では、水素原子は Y42 のフェノール酸素に共有結合しており、短距離イオン性水素結合であることを示した。さらに、これまでプロトン化していると信じられていた R52 がプロトン化していないこと、G29 と E46、V122 と E46 の間に CH/O 水素結合が形成されていることを明らかにした。
4. 低障壁水素結合によりタンパク質内部の疎水的環境で孤立した負電荷が安定化されることを示し、光吸収により励起状態で低障壁水素結合から通常の水素結合への緩和が起き、これが光反応のトリガーとなるという新しい機構を提唱した。これらは、これまで信じられていた機構を否定し、タンパク質の光反応機構の解明に新しい道を開くものである。

以上のように、本論文では PYP の良質な巨大単結晶の作製に成功し、高分解能中性子構造解析の全く新しい精密化法を考案し、これらを応用して PYP の高分解能中性子構造を明らかにし、重要な水素原子の位置決定に成功した。これにより、タンパク質内で低障壁水素結合が形成されうることを世界で初めて実証した。また、タンパク質における低障壁水素結合の新しい役割を提唱している。本論文で得られた成果は、PYP の光反応や構造形成機構の理解に大きく寄与するばかりでなく、タンパク質構造生物学、光生物学、水素結合の物理化学等広汎な科学分野に貢献する質の高い先駆的な研究と高く評価でき、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。