

## 論文内容の要旨

博士論文題目

イェロープロテインの疎水性コアを形成する芳香族アミノ酸残基の役割

氏名 森下 友和

(論文内容の要旨)

蛋白質を構成するアミノ酸の中で、芳香族アミノ酸は蛋白質内部で疎水性コアを形成し、構造形成および機能発現において非常に重要な役割を担っている。近年、芳香族アミノ酸側鎖の $\pi$ 電子とCH基間で生じるCH/ $\pi$ 相互作用が、生体高分子の構造形成に関与していることが提唱されるようになった。しかし、一般に、芳香族アミノ酸側鎖は、疎水凝集に関与している上、CH/ $\pi$ 相互作用は、非常に弱い相互作用であることから、それらの役割が区別され報告された例はない。

本研究では、光センサー蛋白質 Photoactive Yellow Protein (PYP) をモデル蛋白質として、PYP の発色団を中心に形成されている疎水性コアを形成する芳香族アミノ酸が構造安定性や光反応に果たす役割を明らかにすることを目的としている。

第1章では、研究の背景として、PYP の発色団近傍に存在する疎水性コアについて説明し、研究目的が述べられている。

第2章では、材料調整法、PYP の酸や熱に対する安定性や光反応速度の評価法について説明し、第3章以下の研究で用いられた、相関解析、偏相関解析法についての解説が述べられている。

第3章では、疎水性コアを形成している芳香族アミノ酸残基(F62, F63, F75, F92, Y94, F96) 対して行われた、網羅的アラニン置換変異解析の結果が述べられている。熱や酸に対する安定性、中間体からの戻り反応速度ともに、いずれの変異体においても著しい影響が観測されたことから、疎水コアが安定性や光反応に関与していることが明らかとなった。更に、芳香族アミノ酸側鎖間接触を考慮した間接距離を導入し、安定性や光反応に対して得られた物理量との関係を解析した。芳香族アミノ酸と発色団間の直接距離を含めて相関、偏相関解析を行った結果、コアを形成する芳香族アミノ酸側鎖の側鎖間接触が酸安定性や光反応に関与していることを示した。

第4章では、第3章で、もっとも変異効果の大きかった F96 に注目し、芳香環を有する疎水性残基、有さない疎水性残基へ置換した際の影響を解析した。この結果、中間体からの戻り反応速度は、芳香環の有無にかかわらず、疎水度と相関が見られたのに対し、暗状態の安定性については、芳香環を有さないアミノ酸残基において著しい影響が見られた。以上の結果から、中間体からの戻り反応に関しては、側鎖の疎水性が、暗状態の安定性に関しては、CH/ $\pi$ 相互作用が関与していることを明らかにした。

第5章では、第4章の結果を踏まえ、第3章の結果は、CH/ $\pi$ 相互作用ネットワークの寄与であることを結論した。この結果は、中性子結晶構造解析の結果と矛盾しない。また、戻り反応では疎水性が寄与することから、戻り反応では、折り畳みにおける疎水凝縮-核形成モデルが適用できることを提唱した。

以上のように、本論文では、PYP の構造安定性に疎水性コアを形成する芳香族アミノ酸間の CH/ $\pi$ 相互作用ネットワークが、また光反応においては芳香族アミノ酸の疎水性が、寄与することを明らかにした。これにより、蛋白質が芳香族アミノ酸の併せ持つ性質を使い分けているという、これまで知られていなかった新規な蛋白質の構築原理を提唱した。

(論文審査結果の要旨)

蛋白質を構成するアミノ酸のうち、芳香族アミノ酸は、蛋白質内部で疎水コアを形成することで、構造形成や機能発現に対して重要な役割を担っている。近年、芳香族アミノ酸では、側鎖の $\pi$ 電子とCH基の間にCH/ $\pi$ 相互作用が生じ、それが生体高分子の自己組織化や機能に関与していることが提唱されるようになった。しかし、一般に、芳香族アミノ酸側鎖は、疎水凝集に関与している上、CH/ $\pi$ 相互作用は、非常に弱い相互作用であることから、それらの役割が区別され報告された例はない。

本研究は、光センサー蛋白質 Photoactive Yellow Protein (PYP) をモデル蛋白質として、PYP の発色団を中心に形成されている疎水性コアを形成する芳香族アミノ酸が構造安定性や光反応に果たす役割を明らかにすることを目的としている。これらの芳香族アミノ酸の網羅的アラニン置換および発色団に近接する F96 の網羅的変異を用いて、その変異体の物性解析を行った。本論文で得られた成果は以下の通りである。

1. 疎水コアを形成する F62、F63、F75、F92、Y94、F96 に対し、アラニン置換変異解析を適応した結果、これらの残基が、酸や熱に対する安定性や、光反応制御に関与していることを明らかにした。
2. 芳香族アミノ酸側鎖間接触を考慮した間接距離を導入し、安定性や光反応に対して得られた物理量との関係を解析した。芳香族アミノ酸と発色団間の直接距離を含めて相関、偏相関解析を行った結果、コアを形成する芳香族アミノ酸側鎖の側鎖間接触が酸安定性や光反応に関与していることを示した。
3. 発色団に近接する F96 に注目し、他の疎水性アミノ酸残基 (W、Y、H、L、I、V、A) への変異解析を行った結果、中間体からの戻り反応に関しては、側鎖の疎水性が、暗状態の安定性に関しては、CH/ $\pi$ 相互作用が関与していることを明らかにした。
4. 3 の結果を踏まえ、2 の結果は、CH/ $\pi$ 相互作用ネットワークの寄与であることを結論した。この結果は、中性子結晶構造解析の結果と矛盾しない。また、戻り反応では疎水性が寄与することから、戻り反応では、折り畳みにおける疎水凝縮一核形成モデルが適用できることを提唱した。

以上のように、本論文では、PYP の構造安定性に疎水性コアを形成する芳香族アミノ酸間の CH/ $\pi$ 相互作用ネットワークが、また光反応においては芳香族アミノ酸の疎水性が、寄与することを明らかにした。これは、蛋白質が芳香族アミノ酸の併せ持つ性質を使い分けているという、これまで知られていなかった新規な蛋白質の構築原理を提唱したものである。これらの成果は、蛋白質科学、蛋白質工学、生物物理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。