

論文内容の要旨

博士論文題目 **Development of an artificial fluorescent protein
derived from Photoactive Yellow Protein**
(Photoactive Yellow Protein を用いた人工蛍光蛋白質の開発)

氏 名 Dian Novitasari

(論文内容の要旨)

生物は環境中の光をエネルギー源や情報源として利用している。近年では、緑色蛍光蛋白質に代表されるように、個体自身を発光させるためのエネルギー源としても活用されていることが知られている。光情報変換を司る光センサー蛋白質では、これまでの研究から発色団を取り囲む水素結合ネットワーク中で生じるプロトン移動反応が機能発現のトリガーとして機能することが明らかにされつつある。同様に、蛍光蛋白質においても発色団近傍に存在する水素結合ネットワークが発光特性に影響を与えていることが示唆されている。本論文では、この類似性から、光センサー蛋白質である Photoactive Yellow Protein (PYP) の蛋白質内水素結合ネットワークを活用することで蛍光蛋白質への改変が可能であるとの作業仮説の元、人工蛍光蛋白質の開発を試みた。さらに、得られた蛍光蛋白質の発光特性の解析から、光情報変換の分子機構を理解することを目的とした。得られた結果は以下のとおりである。

- 1) 天然由来の発色団 (*p*-クマル酸) の代わりに **trans-lock** 体である 7-ヒドロキシクマリリン-3-カルボン酸を **PYP** に再構成した (**PYP-coumarin**)。 **PYP-coumarin** の吸収極大波長、発色団の **pKa** は野生型 **PYP** と同程度の値を示したことから、7-ヒドロキシクマリリン-3-カルボン酸は蛋白質中に取り込まれ、野生型 **PYP** と同様に近傍アミノ酸残基と水素結合を形成していることを明らかにした。
- 2) **PYP-coumarin** は野生型 **PYP** に比べ約 30 倍の蛍光強度を示した。
- 3) 発色団がプロトン化した **PYP-coumarin** の蛍光スペクトルは 2 つの極大を示した。蛍光寿命測定の結果から、これら 2 つの極大波長を示す発光成分は異なる寿命を有し、その一方は脱プロトン化した **PYP-coumarin** が示す蛍光極大波長に一致した。以上の結果から、**PYP-coumarin** では発色団由来のプロトンが励起直後に移動する反応 (**Excited State Proton Transfer, ESPT**) が生じていることを明らかにした。
- 4) 発色団に対する水素結合受容体である **E46** を **Q** に置換した変異体 (**E46Q**) と近接する塩基性アミノ酸残基 (**R52**) を **Q** に置換した変異体 (**R52**) について同様の測定を行った。これらの変異体では **ESPT** 効率の低下が確認されたことから、近傍アミノ酸残基が発光特性を制御していることを明らかにした。特に、**E46** は脱プロトン化しており発色団と直接水素結合していることを踏まえ、**ESPT** におけるプロトンの受容体の一つとして機能していることが示唆された。

以上の結果、光センサー蛋白質 (**PYP**) の機能を改変し、新規の人工蛍光蛋白質の作製に成功した。更に、発色団の励起直後に生じるプロトン移動反応の存在を明らかにし、蛍光蛋白質における発色団近傍の水素結合ネットワークの関与を示し、**PYP** の光励起直後の分子内反応の理解を進めるに至った。

(論文審査結果の要旨)

光応答性の蛋白質では、一般に発色団近傍の水素結合ネットワークが本質的な役割を担っている。本研究では、光センサー蛋白質 (PYP) の水素結合ネットワークを活用することで新規の蛍光性蛋白質の開発を試みたと同時に、発色団の光励起直後の分子内反応を同定した。得られた成果は以下の通りである。

- 1) 天然の発色団 (*p*-クマル酸) の代わりに **trans-lock** 体である 7-ヒドロキシクマリン-3-カルボン酸を PYP に再構成した (PYP-coumarin)。
PYP-coumarin の吸収極大波長、発色団の pKa は野生型 PYP と同程度の値を示したことから、7-ヒドロキシクマリン-3-カルボン酸は野生型 PYP と同様に近傍アミノ酸残基と水素結合を形成していることを明らかにした。
- 2) PYP-coumarin は野生型 PYP に比べ約 30 倍の蛍光強度を示した。
- 3) 発色団がプロトン化した PYP-coumarin の蛍光スペクトルは 2 つの極大を示した。蛍光寿命測定の結果から、これら 2 つの極大波長を示す発光成分は異なる寿命を有し、その一方は脱プロトン化した PYP-coumarin が示す蛍光極大波長に一致した。以上の結果から、PYP-coumarin では発色団由来のプロトンが励起直後に移動する反応 (Excited State Proton Transfer, ESPT) が生じていることを明らかにした。
- 4) 発色団に対する水素結合受容体である E46 を Q に置換した変異体 (E46Q) と近接する塩基性アミノ酸残基 (R52) を Q に置換した変異体 (R52) について同様の測定を行った。これらの変異体では ESPT 効率の低下が確認されたことから、近傍アミノ酸残基が発光特性を制御していることを明らかにした。特に、E46 は脱プロトン化しており発色団と直接水素結合していることを踏まえ、ESPT におけるプロトンの受容体の一つとして機能していることが示唆された。

以上の結果、光センサー蛋白質 (PYP) の機能を改変し、新規の人工蛍光蛋白質の作製に成功した。更に、発色団の励起直後に生じるプロトン移動反応の存在を明らかにし、蛍光蛋白質における発色団近傍の水素結合ネットワークの関与を示し、PYP の光励起直後の分子内反応の理解を進めるに至った。これらの成果は、広くライフサイエンス分野で活用されている蛍光性蛋白質の開発に対して新しい指針を示すだけでなく、光応答性蛋白質一般に生じる励起状態での分子内反応の解明につながるものである。本論文は、蛋白質科学、蛋白質工学的に重要であり学術的価値が高い。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のあるものと認めた。