

先端科学技術研究科 博士論文要旨

所属研究室 (主指導教員)	機能超分子化学研究室 (廣田 俊 教授)		
学籍番号	2221022	提出	令和 6 年 12 月 17 日
氏名	藤原 綱大		
題目	ペプチドリinkerを利用した環状シトクロム c_{555} 多量体の構築とイオンによるシトクロム c_2 量体の安定化		

第1章 序論

天然には、秩序的に多量体構造をとることで機能を発揮するタンパク質が存在する。その機能発現機構を人工的に模倣し応用することを目指し、タンパク質構造体の構築法開発やタンパク質多量化の機序解明が盛んに研究されている。タンパク質の多量化機構の1つである、3D ドメインスワッピング (3D-DS) は、同じタンパク質の異なる分子間で同じ構造領域を交換して多量化する現象である。交換されるドメインと残りのドメインをつなぐループ部分はヒンジループと呼ばれ、3D-DS 後は2つのタンパク質ユニットをつなぐリンカーとなる。本研究では、3D-DS の際、タンパク質が2つのドメインに分割されることに着目し、ヘリックス構造を有するペプチドリinkerを組み合わせることで、集合化するタンパク質数を制御した環状構造体を構築した。また、溶液中のイオンはタンパク質の安定性に影響を与えることが知られている。そこで、各種イオンが 3D-DS によるタンパク質 2 量体の安定性に与える影響を調査した。

第2章 ペプチドリinkerを利用したシトクロム *c*₅₅₅ 3 量体と 4 量体の構築

所属研究室ではこれまでに、超好熱菌由来シトクロム *c*₅₅₅ (cyt *c*₅₅₅) の 3D-DS 2 量体構造を基に、円順列変異と α ヘリックス挿入を施した人工タンパク質 circular permuted cyt *c*₅₅₅ (cp-cyt *c*₅₅₅) を構築した。cp-cyt *c*₅₅₅ はエタノール添加、凍結乾燥、再溶解の操作により、主に環状 3 量体を形成したが、単量体や 2 量体、多量体も同時に観測され、集合化するタンパク質数の制御は困難であった。そこで本章では、cyt

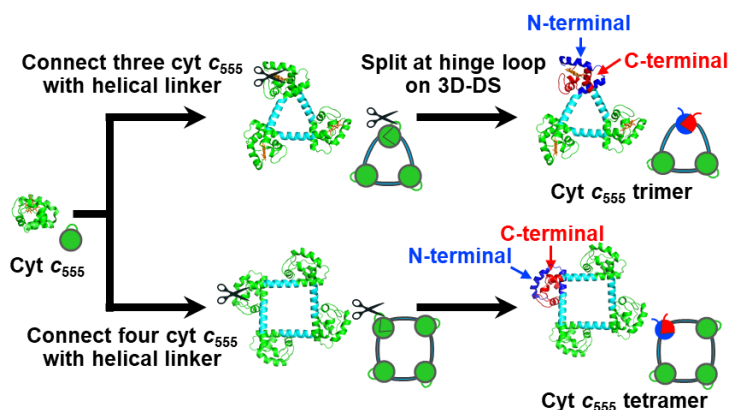


Fig. 1. Cyt *c*₅₅₅ 3 量体と 4 量体の設計の概略図。

*c*₅₅₅ 3 分子 (または 4 分子) の N 末端と C 末端のヘリックスをヘリカルリンカーで連結した環状タンパク質多量体を設計し、環を構成する cyt *c*₅₅₅ のうち一つを 3D-DS におけるヒンジループで 2 つのドメインに分割して新たな N および C 末端とすることで、環状構造を形成する cyt *c*₅₅₅ 3 量体 (または

4 量体) を作製した (Fig. 1)。Cyt *c*₅₅₅ 3 量体と 4 量体を組み換え大腸菌を用いて発現し、精製したところ、陽イオン交換クロマトグラフィーの溶出ピーク幅が広く、複数の構造が混在していることが示唆された。Cyt *c*₅₅₅ 3 量体または 4 量体にエタノール添加後、透析によりエタノールを取り除い

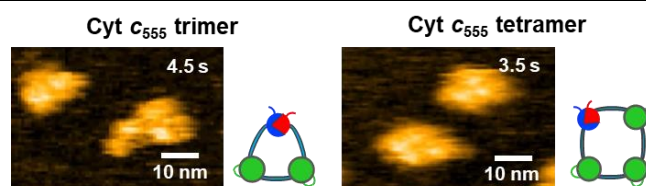


Fig. 2. エタノール処理後の cyt *c*₅₅₅ 3 量体と 4 量体の AFM 像。

たところ、cyt *c*₅₅₅ 3 量体と 4 量体のサイズ排除クロマトグラフィーにおける溶出時間は遅くなり、陽イオン交換クロマトグラフィーの溶出ピーク幅が狭くなった。これらの結果から、大腸菌から得られた目的タンパク質は、エタノール処理によりコンパクトな構造へ変化することが示唆された。さらに、SAXS と AFM 測定により、エタノール処理後の Cyt *c*₅₅₅ 3 量体と 4 量体は環状構造を形成していることが明らかになった (Fig. 2)。

第 3 章 各種イオンが 3D ドメインスワッピングによる cyt *c* 2 量体の安定性に与える影響

電子伝達タンパク質であるシトクロム *c* (cyt *c*) はエタノール添加、凍結乾燥、再溶解の操作により 3D-DS 2 量体を形成する (Fig. 3A)。本章では、コスモトロピックイオンであるクエン酸イオン、硫酸イオン、酢酸イオン、カオトロピックイオンである塩化物イオン、硝酸イオンによるウマ cyt *c* の 3D-DS 2 量体の安定性への影響を調べた。まず、各種イオン存在下で cyt *c* 2 量体の紫外可視吸収スペクトルを測定したところ、コスモトロピックイオン共存下では、Met80 のヘム鉄への配位に由来する 695 nm の吸収帯の強度が増加した。これはコスモトロピックイオンにより塩析効果が増大したことで、タンパク質の立体構造がコンパクトになり、ヘム鉄へ配位する Met80 が増加したためと考えられる。次に、これらのイオン共存下において cyt *c* 2 量体を 50 °C でインキュベートし、インキュベーション時間に対して 2 量体の割合をプロットした (Fig. 3B)。cyt *c* 2 量体の解離速度はコスモトロピックイオンを共存させてもあまり変化しなかったが、カオトロピックイオン共存下ではホフマイスター系列に従い速くなった。さらに、0.1–1.25 M のクエン酸イオン共存下で示差走査熱量測定を行うと、ク

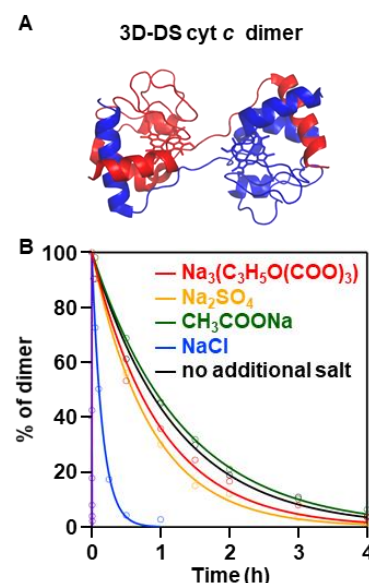


Fig. 3. (A) cyt *c* の 3D-DS 2 量体の結晶構造。(B) 各種イオン共存下 50 °C での cyt *c* 2 量体の割合の経時変化。

エン酸イオン濃度が高くなるにつれて、cyt *c* 2 量体の変性温度が上昇した。これらの結果から、3D-DS による cyt *c* 2 量体はコスモトロピックイオン共存下で安定化され、カオトロピックイオン共存下で不安定化されることが分かった。また、cyt *c* 単量体をクエン酸イオン共存下 50 °C でインキュベートすると 2 量体が形成され、その形成量は cyt *c* 濃度およびクエン酸イオン濃度が高いほど増加した。

第 4 章 結論

ヘリックス構造のペプチドリinkerを利用して cyt *c*₅₅₅ 分子を連結した cyt *c*₅₅₅ 3 量体と 4 量体はエタノール処理により環状構造を形成した。また、3D-DS を示す cyt *c* 2 量体はコスモトロピックイオン共存下で安定性が増加し、cyt *c* 単量体はクエン酸イオン共存下 50 °C でインキュベートすることで 2 量体を形成した。本研究では、集合数が制御された環状タンパク質多量体の構築手法を提案し、3D-DS 時の相互作用がコスモトロピックイオンにより強まることを示した。これらの知見は複雑な構造を有するタンパク質構造体の創製に役立つと期待される。

氏 名	藤原 綱大
-----	-------

(論文審査結果の要旨)

タンパク質の機能化を目指し、タンパク質構造体の構築法開発やタンパク質多量化の機序解明が盛んに研究されている。3D ドメインスワッピング (3D-DS) は、同じタンパク質の異なる分子間で同じ構造領域を交換して多量化する現象である。本研究では、3D-DS によりタンパク質が 2 つのドメインに分割されることに着目し、ヘリックス構造を有するペプチドリンカーを利用してタンパク質数の異なる環状構造体を構築した。また、タンパク質の安定性はイオンにより影響を受けることが知られているが、3D-DS 2 量体におけるイオンの影響は不明のため、各種イオンがシトクロム *c* の 3D-DS 2 量体の安定性に与える影響を調査した。本論文で得られた成果は以下の通りである。

1. シトクロム c_{555} 分子の C 末端と別のシトクロム c_{555} 分子の N 末端をヘリカルリンカーで 3 箇所または 4 箇所連結して環状タンパク質を設計した。この環状タンパク質のシトクロム c_{555} の 1 つを 3D-DS におけるヒンジループで 2 つの領域に分割することにより、新たな N 末端および C 末端を有し、環状構造を形成するシトクロム c_{555} 3 量体または 4 量体を 1 分子として設計した。大腸菌から得られた目的タンパク質は、エタノール処理によりコンパクトな構造へ変化することが示唆された。さらに、X 線小角散乱測定と高速分子間力顕微鏡測定により、エタノール処理後のシトクロム c_{555} 3 量体と 4 量体は環状構造を形成することが示唆された。

2. 3D-DS によるシトクロム *c* 2 量体はコスモトロピックイオン共存下で安定化され、カオトロピックイオン共存下で不安定化されることを明らかにした。また、シトクロム *c* 単量体をクエン酸イオン共存下 50 °C でインキュベートすると 2 量体が形成され、その形成量はシトクロム *c* 濃度およびクエン酸イオン濃度が高いほど増加することが示された。

以上のように、本論文では、集合数が異なる環状タンパク質多量体を構築し、3D-DS による相互作用がコスモトロピックイオンにより強まることを示した。本研究成果は複雑な構造を有するタンパク質構造体の創製に役立つと期待され、タンパク質科学分野の研究として高く評価でき、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。