

# 学位論文の要約

題目 Charge-density Features of Protein Molecules Revealed with Ultra-high Resolution X-ray Crystallography

(超高分解能 X 線解析法によるタンパク質電荷分布の解明)

氏名 高場 圭章

## 第一章 序論

X 線結晶構造解析は分子構造を決定する手法として最も強力なもののひとつであり、原理上、電子の分布を決定できる。低分子の構造解析では、実験的な電子分布をもとに分子間相互作用を定量的に評価する手法が確立されている。しかしながら、生体高分子の構造解析では個々の原子の位置を決定する精度がなく、電子分布を決定することはできなかった。このため、分子内環境が活性中心の化学状態に与える影響はこれまで未解明であった。本研究では NADH-シトクロム  $b_5$  還元酵素および緑色蛍光タンパク質の 2 例について超高分解能 X 線結晶構造解析による電荷密度解析を行い、タンパク質における電子分布と分子内相互作用を実験的に明らかにした。

## 第二章 NADH-シトクロム $b_5$ 還元酵素の電荷密度解析

フラビン分子はタンパク質の補因子として生体内での酸化還元過程に利用される。フラビンタンパク質の機能はフラビンとタンパク質との相互作用によって様々である。NADH-シトクロム  $b_5$  還元酵素(b5R)は NADH からシトクロム  $b_5$  (b5)への電子伝達を担うフラビンタンパク質のひとつであり、分子内に結合した FAD が電子伝達を仲介する。本研究では酸化型 b5R の構造を 0.78 Å 分解能で決定し、その電荷密度解析を行った。

決定した電子分布に対し、Atoms In Molecules (AIM) 理論に基づくトポロジー解析を展開した。これによって FAD のイソアロキサジン環部位を含む活性中心の相互作用を定量的に評価することが可能となる。得られた各パラメータと結合長との関係は低分子における解析で示されてきたパターンとよく一致しており、解析の妥当性が確かめられた。これには CH $\cdots$ N/O 型の弱い水素結合も含まれており、これらの相互作用がタンパク質とイソアロキサジン環の間にも認められた。イソアロキサジン環 N5 原子の外殻電子は 4 方向に伸びており (下図)、そのひとつが Thr66 主鎖 NH、および Tyr65 主鎖 C $\alpha$ H との水素結合を形成していた。また、Tyr65 主鎖 CO と His49 側鎖 C $\beta$ H の間にも同様の水素結合が認められた。これ

らの結合は FAD から b5 結合部位への経路を成しており、通常の水素結合のみから形成される経路よりも短距離で両者を連絡するものであった。イソアロキサジン環は N5 だけでなく O4、N3、O2 のピリミジン側の原子によっても Leu79-Lys82 主鎖と水素結合を形成していたが、これらの残基はそのペプチド平面が歪んでおり、電子伝達には不利な構造をとっていた。すなわち、電子伝達の方向は b5 結合部位へ繋がる N5 からの経路に限定される。今回の電荷密度解析により、フラビン分子とタンパク質との相互作用によって電子伝達に有利な状態が形成されていることを示すことができた。

### 第三章 緑色蛍光タンパク質の電荷密度解析

緑色蛍光タンパク質(GFP)は自発的に形成される蛍光発色団を持つタンパク質で、現在の分子生物学ではマーカー分子として必要不可欠なツールとなっている。その蛍光機構を理解し、応用するためには、発色団とその周辺残基の詳細な構造情報が必須である。GFP は中性型(A form)とアニオン型 (B form)の構造多型をとることに対応して、それぞれ異なる分光特性を示す。本研究では B form のみを持つ E222Q 変異型 GFP の構造を 0.78 Å で決定し、その電荷密度解析を行った。

まず、同様に高分解能で構造決定された T203I 変異型、S65T 変異型の発色団構造、および過去に構造決定された GFP 様タンパク質、計算化学的に最適化された GFP 発色団の構造モデルと比較したところ、Tyr66 由来の C<sub>γ</sub>-O<sub>η</sub> 結合について、決定した B form の構造は過去のどの構造とも異なる結合長を示した。これは、過去に決定された GFP 構造、およびそれらをもとに最適化された計算モデル構造の精度が不十分であることを示している。また、周囲の電子密度との比較により、発色団 O<sub>η</sub> と Thr203 側鎖の水素結合が非常に弱いことが判明した。従来この水素結合が B form の形成に重要と考えられてきたが、別の要因があることが示唆された。

B form 発色団の負電荷は、Thr203 との水素結合によってフェノレート基側に大きく偏ると考えられてきた。しかしながらトポロジー解析では、B form の発色団ではフェレートのほうがわずかに強いものの、イミダゾリノン基もほぼ同等の負電荷を示した。これは発色団が共鳴構造を成していることを意味する。それぞれに対する水素結合に関しても、結合の数は同数 (図) となるが、フェノレート基のほうがわずかに大きい結合エネルギーを示した。

非結合性の相互作用を検出するため、電荷密度に対して Non-Covalent Interaction (NCI) 解析を行った。この結果 Thr62 主鎖と発色団イミダゾリノン基との間に n→π 型の相互作用が認められた。この相互作用はイミダゾリノン基からフェノレート基への電荷移動を誘起することができる。以上の結果から、B-form におけるフェノレート基の負電荷の安定化には

Thr203 との水素結合ではなく  $n \rightarrow \pi$  型相互作用が寄与していることが示唆された。

#### 第四章 結論

本研究はタンパク質の電荷密度解析を実施し、得られた構造情報をもとにタンパク質内部での相互作用の性質と機能との関連について議論した重要な事例である。今後、他の生体高分子での同様の解析と比較されるだけでなく、理論的な解析によっても検証されることで、生体高分子の構造と性質に関する理解を深め、応用するための基礎となることが期待される。