

Title	Charge-density Features of Protein Molecules Revealed with Ultra-high Resolution X-ray Crystallography( Abstract_要旨 )
Author(s)	Takaba, Kiyofumi
Citation	Kyoto University (京都大学)
Issue Date	2018-03-26
URL	<a href="https://doi.org/10.14989/doctor.k20938">https://doi.org/10.14989/doctor.k20938</a>
Right	学位規則第9条第2項により要約公開; 許諾条件により要約は2019-02-28に公開
Type	Thesis or Dissertation
Textversion	none

( 続紙 1 )

京都大学	博士 ( 理学 )	氏名	高 場 圭 章
論文題目	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)		
(論文内容の要旨) <p>X線結晶構造解析は分子構造を決定する最も強力な手法の一つであり、その原理上、分子における電子の分布を決定できる。低分子化合物のX線構造解析では、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を得るのが困難で、電子分布を決定するまでには至っていなかった。そのため、分子内環境が活性中心の電子状態に与える影響について、これまで十分な情報は得られていなかった。本研究では、二つのタンパク質 (NADH-シトクロム<math>b_5</math>還元酵素および緑色蛍光タンパク質) の超高分解能X線結晶構造解析ならびに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について実験的情報を得た。</p> <p>NADH-シトクロム<math>b_5</math>還元酵素 (<math>b_5R</math>) はNADHからシトクロム<math>b_5</math> (<math>b_5</math>) への電子伝達を行うフラビタンパク質であり、分子内に結合したフラビン (FAD) が電子伝達を担っている。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。本研究では酸化型<math>b_5R</math>の結晶構造を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行った。AIM理論では、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になり、検出された相互作用にはCH...N/O型の弱い水素結合も含まれ、これらの相互作用は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原子の外殻電子は四つの方向に伸びており、その一つはThr66主鎖NHおよびTyr65主鎖<math>C_\alpha H</math>との水素結合を形成していた。また、Tyr65主鎖COとHis49側鎖<math>C_\beta H</math>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<math>b_5</math>結合部位への経路にあり、通常の水素結合のみから形成される経路よりも短い距離で両者を結ぶものであった。イソアロキサジン環はLeu79-Lys82主鎖とも水素結合を形成していたが、これらの残基で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、電子伝達の方法は<math>b_5</math>結合部位へ繋がるN5からの経路に限定されると考えられる。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が示された。</p>			

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ち、その蛍光機構を理解してさまざまに応用するためには、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、および先行する計算化学的研究において最適化されたGFP発色団の構造モデル、過去に決定されたGFP様タンパク質構造と比較したところ、Tyr66由来のC<sub>ε</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ったことを示している。また、周囲の電子密度との比較によって、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側に大きく偏ると考えられてきた。しかしながら、今回の電荷密度解析ではイミダゾリノン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有することを意味している。それぞれの酸素原子、O<sub>η</sub>、O<sub>2</sub>に対する水素結合の結合エネルギーやC-O結合次数もこの共鳴構造を支持したが、フェノレート側の負電荷がわずかに大きいことも示唆した。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。その結果、Thr62主鎖と発色団イミダゾリノンとの間に 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からフェノレート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の負電荷の安定化には、Thr203との水素結合ではなく n→π 型相互作用が寄与していることが示唆された。

本研究は、これまでほとんど事例がなかったタンパク質の電荷密度解析を行い、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ものである。今後、他の生体高分子における同様の電荷密度解析との比較のみならず、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。

(論文審査の結果の要旨)

化学反応を司るのは電子であり、分子中の電子分布を実験的に決定することは分子機能を理解する上で重要である。X線結晶構造解析は分子構造を決定する代表的な手法であるが、生体高分子について、その電子分布を決定できるほどの高精度で解析することはこれまで難しいことであった。本研究は、超高分解能でのX線結晶構造解析を行うことで、NADH-シトクロム $b_5$ 還元酵素 ( $b_5R$ ) および緑色蛍光タンパク質 (GFP) という二つの例についてその電荷密度解析を行い、タンパク質内部の電子分布と分子内相互作用を実験的に明らかにしたものである。

フラビンタンパク質  $b_5R$  に関しては、酸化型  $b_5R$  の 0.78 Å分解能での結晶構造解析で決定した電子密度分布に AIM 理論を適用して、CH...N/O 型の弱い水素結合を含む非共有結合で FAD とペプチド鎖が相互作用していることを示している。また、FAD のイソアロキサジン環N5原子の外殻電子が四つの方向に分布し、Tyr65-Thr66 のペプチド鎖との水素結合に寄与することも示している。これらの水素結合がシトクロム $b_5$ との結合部位まで連なり、FAD から電子が伝達する経路となり得ることを提唱している。このように解析結果に基づき、フラビン分子とタンパク質との相互作用が電子伝達に有利な状態を形成すると提言している。

GFPに関しては、アニオン型の B form のみを持つ E222Q 型変異体 GFP を用いて、0.78 Å分解能での結晶構造に基づいた電荷密度解析を行っている。決定した発色団構造と、先行研究での計算法的構造モデルおよびこれまで報告された結晶構造を比較することで、決定した高分解能構造が他のどの構造とも異なる結合長の特徴を示すことを見いだしている。また、観察された電子密度の比較から、B formの形成に必要と考えられていた Thr203 と発色団との水素結合が非常に弱いことを示している。発色団の負電荷がフェノレートとイミダゾリノンの両方で分担され、わずかにフェノレート側に偏っていることも示している。さらに NCI 解析を導入することで、この電荷の偏りが Thr62 との  $n \rightarrow \pi$  型相互作用によって誘起されていると提言している。このように、本研究は、GFP 発色団の電子状態とその制御に関して、従来とは異なる新たな知見を与えたものである。

タンパク質の超高分解能構造解析およびそれに基づく電荷密度解析はほとんど前例のない手法であるが、本研究における解析は、生体高分子の機能と構造の関係を理解する上で重要な知見を与えるものと評価することができる。よって、本論文は博士(理学)の学位論文として価値あるものと認める。平成30年1月16日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。