

Title	The Role of NH···OC Hydrogen Bond towards the Photocycle of PhotoactiveYellow Protein
Author(s)	岡本, 健太郎
Citation	大阪大学, 2009, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/49737">https://hdl.handle.net/11094/49737</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a>〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	岡本健太郎
博士の専攻分野の名称	博士(理学)
学位記番号	第22701号
学位授与年月日	平成21年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 理学研究科高分子科学専攻
学位論文名	The Role of NH $\cdots$ OC Hydrogen Bond towards the Photocycle of Photoactive Yellow Protein (Photoactive Yellow Proteinの光サイクルにおけるNH $\cdots$ OC水素結合の役割)
論文審査委員	(主査) 教授 山本 仁 (副査) 教授 原田 明 教授 鬼塚 清孝

## 論文内容の要旨

Photoactive Yellow Protein (以下、PYP)、は紅色光合成細菌より単離された光受容蛋白質の一種であり、細菌が青色の光から逃げるための光センサー蛋白質として知られており、シグナル蛋白やセンサー蛋白に数多く含まれるドメイン部分 (PAS ドメイン) を持つことが知られている。蛋白質として取り扱いやすいこともあり、光受容蛋白質だけでなく、PAS ドメインを持つ、シグナル、センサー蛋白質のモデル蛋白質として注目を集めている。

PYP はアミノ酸 125 残基と、一つの補欠分子 4-ヒドロキシ桂皮酸から構成され、この 4-ヒドロキシ桂皮酸は 69 番目の Cys 側鎖とチオエステルで結合し、活性中心においてアニオン状態で発色団として存在していることが知られている。この発色団は近傍の Tyr42、Glu46、また、結合部位の Cys69 との間で水素結合ネットワークを形成しており、変異体を用いた研究を通じて水素結合ネットワークが発色団の性質、PYP が行う光反応サイクルを制御していることが考えられている。しかし、発色団と結合している Cys69 からの水素結合については、直接発色団と結合しているため化学修飾が難しく、これまで明らかにされていない。このように化学的に未知である Cys69 からの水素結合の役割について知るためには、これまで行われている蛋白を用いた研究とは異なるアプローチが必要であると考えられる。

蛋白質を用いた系では不可能であった PYP における Cys 主鎖アミドから発色団への NH $\cdots$ OC 水素結合について、天然同様に水素結合を形成するモデル化合物を用い研究を行った。本博士論文では、合成によって得られたモデル化合物のキャラクタリゼーションを通じ、PYP における Cys69 からの水素結合の役割について初めて明確にすることができた。基底状態 PYP<sub>dark</sub> における、発色団カルボニル基に対して水素結合が形成されることで発色団の電子状態は制御され、結果として、発色団の色や酸性度、光物性などの性質に NH $\cdots$ OC 水素結合が影響してくることがわかった。特に酸性度で得られた知見より、活性中心で発色団がアニオン状態として安定に存在するために NH $\cdots$ OC 水素結合が重要な役割を果たしていることを明らかにした。

また、シス体骨格を有する反応サイクル中間体のモデル化合物についても合成し、反応サイクルに

新たな知見を加えることができた。シス体モデル化合物の可視紫外吸収スペクトル測定、<sup>13</sup>CNMR 測定から、アニオン状態ではキノイド様の共鳴構造の寄与によりオレフィンの二重結合性が低下することを明らかにし、このとき NH...OC 水素結合の形成により、さらに結合性が低下することがわかった。このことから PYP の光反応サイクルにおける中間体 PYPM から基底状態への戻り過程は、まず、発色団の脱プロトン化反応がおき、さらに水素結合の形成によって、オレフィンの結合性を低下、熱異性化エネルギー障壁を低下させた状態で基底状態への熱戻り反応が起きていると考えられる。

#### 論文審査の結果の要旨

Photoactive Yellow Protein (PYP) は、細菌が光から逃げるためのセンサー蛋白質として知られており、これまでに様々な分光実験を通じて研究が進められている。この蛋白質は、同じように光を外部刺激として認識し機能を発現する光受容蛋白質はもちろん、シグナルやセンサーといった生体機能をもつ蛋白質のモデル蛋白質として学術的に価値のある蛋白質である。PYPはこれまでの研究から、反応休止状態だけでなく、準安定な中間体の化学構造について詳細に知られており、現在、PYPの研究における興味を中心は、光反応サイクルのそれぞれの中間体状態を繋ぐダイナミクス、発色団の脱プロトン・プロトン化反応やオレフィン部分の *trans-cis* 異性化反応といった化学反応についてであり、反応メカニズムの解明が望まれている。

この反応メカニズムの解明を行う上で重要となってくるのは、反応中心である発色団 (4-ヒドロキシ桂皮酸チオエステル) と、発色団を中心として形成されている水素結合ネットワークであり、発色団単体や蛋白質の部分変異の研究を通じて議論が行われている。その中でも、学位申請者は、これまで研究対象として取り扱うことのできなかつた Cys69 の主鎖アミドから発色団カルボニル基への水素結合に注目し、そのエッセンスを導入し、単体で水素結合を形成するという、これまでになかつた発色団モデル化合物を合成し、化学的に未知であつた発色団への水素結合の効果について初めて明確にしている。また、学位申請者は、これまでの PYP の研究では前例のないシス体骨格を有する発色団モデル化合物の合成にも成功し、その結果、光反応サイクルのすべての中間体状態について発色団モデル化合物で置き換えて検討することができるようになり、反応ダイナミクスについて新たなメカニズムの提言を行っている。本博士論文では以下の点を明らかにしている。1) 水素結合による PYP の色の制御、2) 水素結合と蛋白質環境場による発色団の脱プロトン化メカニズム、3) 水素結合によるオレフィン部分の光異性化反応の制御、4) 脱プロトン化とオレフィン部分の熱異性化反応を含む熱戻り反応のメカニズム、および、戻り反応時の水素結合の役割。このように、学位申請者が合成したこれまでにないコンセプトの発色団モデル化合物は、化合物のキャラクターションを通じて、PYP の生体機能発現過程における水素結合の役割について検討する上で有用なツールであることが考えられる。

以上のように、本申請者は、独創的なコンセプトの発色団モデル化合物の研究を通じ、これまで未知であつた PYP の生体機能発現過程における Cys69 からの水素結合の役割について明らかにした。従つて、本論文は博士 (理学) の学位論文として、十分価値あるものと認める。