

Title	Photochemical and Supramolecular Properties of Artificially Constructed Cytochrome b562 Assemblies
Author(s)	梶原, 竜太
Citation	大阪大学, 2019, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/72363
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

論文内容の要旨

氏名 (梶原 竜太)

論文題名

Photochemical and Supramolecular Properties of Artificially Constructed Cytochrome *b*₅₆₂ Assemblies
(人工的に構築したシトクロム*b*₅₆₂集合体の光化学および超分子特性)

論文内容の要旨

タンパク質集合体は、タンパク質同士が非共有結合による相互作用により集合化した構造体であり、その秩序だった構造とユニークな機能から天然、非天然を問わず様々な集合体がこれまでに報告されている。本著者の所属研究室では、これまでにヘムタンパク質の一種であるシトクロム*b*₅₆₂を構成単位とするヘムタンパク質集合体の構築について報告してきた。これは、タンパク質に変異導入したシステイン残基に合成ヘムを修飾することで、ヘム分子とタンパク質のヘムポケット間の相互作用により一次元状の集合体を形成している。また、この集合体をシトクロム*b*₅₆₂の80番目の残基にシステインを導入した変異体(N80C)で調製することで、タンパク質間に水素結合による相互作用が生じ、タンパク質間の配向が固定され剛直な構造の集合体が形成されることが明らかになっている。さらに、これらの水素結合に関わる残基を変異することで、相互作用が弱まり、半剛直な集合体や柔軟な集合体が形成される。本研究では、ヘムタンパク質集合体の更なる改変を施すことで、集合体の超分子特性の変化が及ぼす光化学特性などの物理化学的な特性への影響を評価することを試みた。

第一章では、ヘムと亜鉛ポルフィリンの両方を有するシトクロム*b*₅₆₂共集合体における光誘起電子移動速度を評価することで、タンパク質間の水素結合による相互作用の変化が電子移動に与える影響を評価した。調製した共集合体に対してパルスレーザー照射後の過渡吸収変化を測定して電子移動速度を評価したところ、タンパク質間の水素結合が最も強い剛直な集合体で最も速い結果となり、水素結合が弱くなることで電子移動速度が減少することが明らかになった。さらに、ヘムと亜鉛ポルフィリンの両方を含む二量体にてMarcus理論に基づく電子移動の詳細な解析を行ったところ、本系における電子移動は一段階で起きていることが示唆された。

第二章では、剛直なシトクロム*b*₅₆₂集合体と柔軟なシトクロム*b*₅₆₂集合体の細胞内への取込を評価した。シトクロム*b*₅₆₂のC末端に細胞膜透過性ペプチドであるオリゴアルギニンを融合したタンパク質で調製した集合体をHeLa細胞に投与したところ、剛直・柔軟のどちらの集合体においてもタグペプチドによる多点効果による取込量の向上が見られた。特に、テトラアルギニンを融合した剛直な集合体ではアルギニンタグが存在しない剛直な集合体と比べて取込量が約10倍高いことが明らかになった。これらの結果から、オリゴアルギニンの配向が固定されている剛直な集合体の方がオリゴアルギニンの配向がランダムである柔軟な集合体よりより効率的な多点効果が誘起されることが明らかになった。

第三章では、N80C変異体シトクロム*b*₅₆₂に対し適度な長さのリンカーを持つ合成ヘムを修飾することで調製したシトクロム*b*₅₆₂集合体は、鎖状集合体と環状三量体の二つの構造体を形成し、さらにそれら二つの構造体の変換を熱力学的に制御することが可能であることを明らかにした。この環状三量体は希釈条件下において鎖状集合体よりも熱力学的に安定であることと、単離した環状三量体は速度論的にも鎖状の集合体より安定であることが判明した。さらに、原子間力顕微鏡により単離した環状三量体を観測したところ、環状三量体のモデル構造から予測される像とのように直径約15 nmほどの環状の像が観測され、単離した集合体が真に環状三量体であることが確認された。

以上のように、シトクロム*b*₅₆₂集合体において集合体の超分子的な構造の変化が物理化学的な性質に対して大いに影響を及ぼすことを明らかにした。特に、集合体の剛直性のわずかな変化が集合体そのものの性質に大きな影響を与えることを示した。本研究で得られた知見はタンパク質集合体を用いて新たな性質をもつバイオマテリアルを設計する際に重要な指針となりうる。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (梶原 竜太)		
	(職)	氏 名
論文審査担当者	主 査	教授 林 高史
	副 査	教授 桑畑 進
	副 査	教授 櫻井 英博
	副 査	教授 南方 聖司
	副 査	教授 今中 信人
	副 査	教授 宇山 浩
	副 査	教授 町田 憲一
	副 査	教授 能木 雅也
	副 査	教授 古澤 孝弘

論文審査の結果の要旨

タンパク質集合体は、タンパク質同士が非共有結合による相互作用により集合化した構造体であり、その秩序だった構造とユニークな機能から天然、非天然を問わず様々な集合体がこれまでに報告されている。本著者の所属研究室では、これまでにヘムタンパク質の一種であるシトクロム b_{562} を構成単位とするヘムタンパク質集合体の構築を実施している。これは、タンパク質に変異導入したシステイン残基に合成ヘムを化学的に修飾することで、ヘム分子とタンパク質のヘムポケット間の相互作用を介した一次元状の集合体形成をめざしたものである。また、この集合体をシトクロム b_{562} の 80 番目の残基にシステインを導入した変異体(N80C)で調製することで、タンパク質間に水素結合による相互作用が生じ、タンパク質間の配向が固定され剛直な構造の集合体が形成されることが明らかになっている。さらに、これらの水素結合に関わる残基を変異操作で交換することにより、相互作用が弱まり、半剛直な集合体や柔軟な集合体が形成される。本研究では、ヘムタンパク質集合体の更なる改変を施すことで、集合体の超分子特性の変化が及ぼす光化学特性などの物理化学的な特性への影響を評価することに焦点をあて、研究を実施している。

第一章では、ヘムと亜鉛ポルフィリンの両方を有するシトクロム b_{562} 共集合体における光誘起電子移動速度を評価することで、タンパク質間の水素結合による相互作用の変化が電子移動に与える影響を評価している。調製した共集合体に対してパルスレーザー照射後の過渡吸収変化より電子移動速度を評価し、タンパク質間の水素結合が最も強い剛直な集合体で最も速い電子移動が観測され、水素結合が弱くなることで電子移動速度が減少することを確認している。さらに、ヘムと亜鉛ポルフィリンの両方を含む二量体にて Marcus 理論に基づく電子移動の詳細な解析を行い、本系における電子移動は一段階で起きていることが示唆される結果を得ている。

第二章では、剛直なシトクロム b_{562} 集合体と柔軟なシトクロム b_{562} 集合体の細胞内への取込を評価している。シトクロム b_{562} の C 末端に細胞膜透過性ペプチドであるオリゴアルギニンを融合したタンパク質で調製した集合体を HeLa 細胞に投与し、剛直・柔軟のどちらの集合体においてもタグペプチドの多点効果による取込量の向上を確認している。特に、剛直な集合体ではアルギニンタグの多点効果により取込量が顕著に向上することを明らかにしている。これらの結果から、オリゴアルギニンの配向が固定されている剛直な集合体の方がオリゴアルギニンの配向がランダムである柔軟な集合体よりより効率的な多点効果が誘起されることを明らかにしている。

第三章では、N80C 変異体シトクロム b_{562} に対して適度な長さのリンカーを持つ合成ヘムを修飾することで調製したシトクロム b_{562} 集合体は、鎖状集合体と環状三量体の二つの構造体を形成し、さらにそれら二つの構造体の変換を熱力学的に制御することが可能であることを確認している。この環状三量体は希釈条件下において鎖状集合体よりも熱力学的に安定であること、単離した環状三量体は速度論的にも鎖状の集合体より安定であることが判明されている。さらに、原子間力顕微鏡により単離した環状三量体を観測した結果、環状三量体のモデル構造から予測される像のよ

うに直径約 15 nm ほどの環状の像が観測され、単離した集合体が環状三量体であることを直接確認している。

以上のように、本論文はシトクロム b_562 集合体において集合体の超分子的な構造の変化が物理化学的な性質に対して大いに影響を及ぼすことを実証している。特に、集合体の剛直性のわずかな変化が集合体そのものの性質に大きな影響を与えることを明らかにしている。本成果はタンパク質集合体を用いて新たな性質をもつバイオマテリアルを設計する際に重要な指針を与えている。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。