

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 本間 康平

本論文はタンパク質の結晶化研究のモデルタンパク質として、大腸菌由来ニトロ還元酵素 NfsB を選び、その結晶化の全体像を把握し、それにより理論的なアプローチで結晶化のコントロールを可能にした結果について述べている。また、タンパク質の結晶化パラメータには、重力、対流など物理学的なパラメータも存在するが、そのようなパラメータがタンパク質の結晶化にどのような効果をもたらすか報告している。さらに、構造生物学的な視点から、NfsB の F124S 変異体の X線結晶構造解析をおこない、NfsB F124S 変異体の基質認識機構について考察している。本論文は全 6 章からなる。

第 1 章ではタンパク質の結晶化・結晶成長研究の概説と、結晶化の相図・モルフォドロムからのアプローチによるタンパク質結晶化のコントロールの可能性について述べている。タンパク質の結晶化が困難な理由は、タンパク質の性質が多種多様であるのに加え、結晶化条件のパラメータも多岐にわたっているからである。このことは確かに結晶化剤選択の困難さを表しているが、同時に適切な結晶化剤を選んでやれば結晶化を確実にコントロールできる可能性があるということを示しており、タンパク質結晶化の最適化とコントロールが要求されている。また、本研究のモデルタンパク質となった大腸菌由来ニトロ還元酵素 NfsB について全般の概説を行い、その分類と生理学的意義について説明している。NfsB の F124S 変異体は野生型 NfsB よりはるかに高いフラビン還元活性を示すことが分かっており、構造機能相関の観点からとても興味深いものである。X線結晶構造解析による、F124S 変異体の基質認識機構の解明が求められている。

第 2 章では、タンパク質試料やその他の緩衝液試薬類の調製について、筆者のおこなった実験プロトコルが詳細に述べられている。これに従えば、筆者の実験条件、試料調製を完全に再現出来るようになっている。

第 3 章は、大腸菌由来ニトロ還元酵素である野生型 NfsB 及び NfsB F124S 変異体において、その結晶化の相図・モルフォドロムを把握し、かつその結晶化を理論的なアプローチで現実にコントロールしようとするものである。結晶化溶液はマイクロバッチ法で調製し、パラフィンオイルを重層して密封している。この方法によりサンプルは試料調製後に外部の系との間に物質の移動がないので、NfsB の結晶化のモルフォロジーを [NfsB 濃度-沈殿剤濃度] 平面上に点としてマッピングすることが出来ている。野生型 NfsB と同様のモルフォドロムを F124S 変異体についても作製している。さらに、野生型と変異体において第一基質の反応産物である NAD^+ を添加した系についても作製している。これらの結果、野生型と変異体の比較において、 NAD^+ 添加の系においても無添加の系においても、結晶化モルフォドロムがほぼ同一であった。F124 は活性ポケットの一番奥に位置することから、F124S 変異体の結晶化条件は野生型の結晶化条件と大差はないと予測されていた通り、結晶化の相図・モルフォドロムから確かに差がないこと

が明らかになった。次に、沈殿剤である PEG 4,000 の蒸気輸送速度の定量化をおこなうことにより、蒸気拡散法による結晶化ドロップの濃縮履歴を把握している。この結果とモルフォドロム・相図の結果を組み合わせることにより、タンパク質結晶化の最も一般的な方法である蒸気拡散法のコントロールを可能にした。すなわち、欲しい結晶を欲しい日数で得られるようになった。

第4章では、NfsB の結晶化を宇宙の微小重力環境下でおこなうことについて報告している。スペースシャトルによる宇宙実験においては15日間と限られた期間であるので、地上にいるフライト待機中に結晶が析出しては意味が無い上に、フライト期間中に構造解析可能なサイズにまで成長させる必要がある。NfsB については、結晶化を自在にコントロール出来るようになってきているので、宇宙結晶化実験の条件設定は正に理論的なものであった。また、クリノスタットという一種の回転装置を用いて NfsB の結晶化実験をおこなった結果についても報告している。クリノスタットをタンパク質の結晶化に利用した例はまだ報告がなく、初めての試みである。

第5章ではモルフォドロム・相図作製により NfsB F124S 変異体について結晶化条件を最適化された良質な単結晶が得られたので、NfsB F124S 変異体の X線結晶構造解析をおこなった結果について報告している。すでに結晶構造が解かれている NfsB の野生型の立体構造のモデルを用いて分子置換法による X線結晶構造解析を行った。その結果、2.0 Å の分解能で FMN との複合体の構造解析に成功した。R-factor = 19.4%, free-R = 22.8% であり、これは良質な立体構造モデルが得られたことを意味する。A 鎖の S124 残基付近に位置する補酵素 FMN ではイソアロキサジン環の *re face* において NAD⁺ とみられる電子密度が現れた反面、FMN の N1 原子に隣接する B 鎖の F70 残基はその電子密度がみだれていた。これは結晶化バッファーに添加した NAD⁺ が産物阻害により、活性中心に結合していることを示唆する。しかし、その電子密度は形がはっきりしないため NAD⁺ との完全な複合分子モデルを作成するにはいたらなかった。今までラベリングなど生化学的な研究では FMN の *re face* と相互作用する還元型 NADH のニコチン環の水素は pro-R 水素であることがわかっていることから NAD⁺ と NfsB の複合体形成の様式は推定可能であった。さらに、野生型 NfsB と F124S 変異体の立体構造モデルを重ね合わせた結果、特に A 鎖の F123, B 鎖の N67, F70 において側鎖が大きく変化し、変異体の構造は野生型に比べて活性ポケットが大きく広がっていることが明らかになった。このことから、NfsB のフラビン還元活性上昇は活性部位の広がりにより、ニトロ化合物よりも大きなフラビン類が基質となり得たと考えられた。

第6章では、以上の結果をまとめている。

本研究により、モデルタンパク質 NfsB の結晶化条件を探索し精密化することで、構造解析に適した良質な単結晶を実際に得ることが出来た。ひとつのタンパク質の結晶化条件と、結晶化に向けてその性質を詳細に調べることは、そのタンパク質の良質な単結晶を得られるばかりでなく、他のタンパク質の結晶化に有用な知見を得ることに繋がる。本研究で得られた知見は、学術上貢献するところ大であると考えられる。よって、審査委員一同は、本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。