

論文内容の要旨

氏名	まえのあまひろ 前野 寛大			
学位の種類	博士(工学)			
学位記番号	工第19号			
学位授与の日付	平成21年3月21日			
学位授与の要件	学位規程第4条第1項該当			
学位論文題目	Thermodynamic Stability, Conformational Fluctuation and Folding of Proteins Studied by High Pressure NMR and Fluorescence Spectroscopy			
論文審査委員 (主査)	教授	橘	秀	樹
(副主査)	教授	赤坂	一	之
(副主査)	教授	泉井	桂	

精巧にデザインされた蛋白質の機能と構造ダイナミクスとの関わりやダイナミックに揺らぐ蛋白質の実体を理解するためには、X線結晶構造解析で同定された蛋白質の静的構造を溶液中における生物学的現象に関するダイナミックな構造にまで拡張しなければならない。古くに確立された蛋白質の熱力学原理によっても、蛋白質は溶液中でフォールド構造(N構造)からアンフォールド構造(U構造)までの熱力学的平衡状態をとり、本質的に異なる複数の状態間をダイナミックに揺れ動く分子であることは明らかである。蛋白質ダイナミクスの全体像を理解するためには、様々な構造状態間の揺らぎを網羅的に観測し、その熱力学的・構造的な特性を知る事が重要となる。ここに審査に付された前野寛大の研究では、蛋白質が織り成す様々な構造揺らぎを圧力摂動を用いて幅広く探索し、蛋白質の熱力学的構造安定性と構造変化を追うことを目的としている。

蛋白質の最安定状態よりはエネルギー的に不安定な状態で、常圧下においては非常にわずかの分率でしか存在しないが、蛋白質機能の発現には重要であるような立体構造状態は、通常、最安定状態よりは低い部分モル体積を持つ。ル・シャトリエの原理により、加圧条件下ではそのような状態の存在分率が増加し、検出できるようになる。これが高圧力蛋白質実験の眼目であるが、この研究ではそれに限らず、研究対象となる現象を基礎から応用面にわたり広く選定している。

まず第二章において、従来の400 MPaから大きく改良されて700 MPaまで昇圧可能となった高圧蛍光システムを用い、ニワトリリゾチームのN構造とU構造間の転移を、-10°Cから50°Cの温度範囲で観測した。より高い圧力の使用が可能になったことにより、圧力軸に沿っての蛋白質の構造転移が明瞭に観測され、種々の熱力学的パラメータ値が正確に算出された。転移にともなう比熱変化は1.8-1.9 kJ mol<sup>-1</sup> deg<sup>-1</sup>であり、N-U状態間の転移のGibbs自由エネルギー変化量が最大となる温度として定義される蛋白質の最安定温度は、圧力250 MPaでの10°Cから550 MPaでの40°Cへと上昇した。このような最安定温度の上昇は、これまでに報告例がない。また、N-U状態間の部分モル体積変化ΔVは-10°Cでの-86 ml mol<sup>-1</sup>から50°Cでの-18 ml mol<sup>-1</sup>へと大きな温度依存性を示した。そして、温度に対するΔVのプロットの傾きから得られるN-U状態間の膨張係数の差は1.07 ml mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>と求められた。以上を総合して、圧力-温度平面上にニワトリリゾチーム蛋白質の自由エネルギーランドスケープを描くことができた。

第三章では、アレルゲン性蛋白質として知られるオボムコイドの、蛋白質分解酵素キモトリプシンによる分解が、高圧下で促進することを示している。一般に、アレルゲン性蛋白質は構造安定性が高く、熱処理で変性しても常温に戻すと再生がおこり、アレルゲン性は保たれたままとなる。しかし加圧下で、アレルゲン性蛋白質が天然のフォールド構造を逸脱し、部分モル体積のより小さい中間体構造の分布率が増加し、かつその圧力領域が蛋白質分解酵素が活性を失わないような領域であれば、そのような中間体構造が酵素分解を受け、結果としてアレルゲン性の減少が可能となるであろう。実際、高圧蛍光実験により、オボムコイドには、天然状態より高いエネルギーかつ低い部分モル体積をもつ中間構造が存在することが明らかとなった。この中間構造は、0.1 MPaにおいては1%以下の分率でしか存在しないが、400 MPaにおいてはほぼ100%の分率で存在する。キモトリプシンによるオボムコイドの酵素分解処理を400 MPaまでの圧力下で行い、処理産物をSDS-PAGEでモニターしたところ、昇圧に伴いオボムコイドの分解が大きく促進される事が示された。この分解はオボムコイドの第1ドメインおよび第2ドメインで起こっている。この高圧下における酵素分解の手法は、蛋白質の体積原理に基づいた一般的な手法であり、いろいろな基質蛋白質および加水分解酵素を対象として広く適用できるものと考えられる。

先の第二章では蛋白質全長にわたる協同性の高い大局的な構造転移について述べた。多次元可変圧力NMR法を用いれば、フォールド構造における蛋白質コンフォーメーションの揺らぎを観測することができる。第四章では、この多次元可変圧力NMR法を使い、分子内空隙（キャビティ）の体積をアミノ酸置換によって増大させたT4 リゾチーム L99A 変異体の構造揺らぎを調べている。T4 リゾチームの変異体は、蛋白質内部のダイナミクスに関する研究においてモデル蛋白として用いられてきたものである。まず、 $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ -TROSY スペクトルにおいて、フォールド構造ピーク強度の加圧による減少がキャビティ周辺残基について見られることを示している。さらに、 $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ -HSQC スペクトルにおいては、直接キャビティを構成しているいくつかのアミノ酸残基側鎖メチル基のピーク強度の、加圧による特異的な減少を観測している。これは、フォールド構造アンサンブル内で分子内キャビティ周辺の選択的な無構造化と水和が起こっているためと思われる。この過程はマイクロ秒からミリ秒の比較的遅い時間スケールで起きている。

圧力擾動は平衡系のみならずフォールディングのキネティクス研究においても効果的である。第5章では、高圧蛍光法と圧力ジャンプ蛍光法を用い、スタフィロコッカルスクレアーゼとその複数種の変異体を対象にして、遷移状態アンサンブルにおける水和に関する情報を得るための新規の解析法を提案している。特定の残基に関する変異体の構造転移にともなう活性化体積と部分モル体積変化の比は、その変異体で変性状態に比べて遷移状態がどの程度脱水しているかの指標となる。さらにこの脱水和の度合いを野生型蛋白での脱水和の度合いと比較することにより、遷移状態アンサンブルにおける各残基の水和状態に関する情報が得られることを示している。

以上、本研究は、蛋白質の大局的な構造転移、ドメイン領域の構造転移、フォールド構造内における局所的な構造揺らぎ、そして構造転移のキネティクスをとり上げ、高圧蛍光法、高圧下での酵素分解法、多次元可変圧力NMR法、圧力ジャンプ蛍光法などを用いて、種々の熱力学的パラメーター値の算出、自由エネルギーランドスケープの作成、アレルゲン性除去につながる新規の手法の開発・検討、分子内キャビティ周辺の選択的な無構造化と水和過程の解析、遷移状態アンサンブルにおける水和に関する情報を得る新規手法の開発などを行い、蛋白質ダイナミクスの種々の局面に関する知見を得たものである。

## 論文審査結果の要旨

蛋白質は巨大分子であり、低分子で見られる個々の原子間結合の伸縮や変角振動、回転などの微視的で速い揺らぎの他に、それよりは広い範囲の、しかし蛋白質のサイズから見れば局所的にすぎないような複数のアミノ酸残基で構成される構造の、より遅い時間スケールでの揺らぎ、さらには蛋白質を構成するドメインのレベルでの構造変化、そして蛋白質分子全体にわたる変性といった大局的な構造変換など、空間的・時間的にさまざまな範囲でダイナミックな構造転換を行う。それらの構造間の平衡は熱力学の法則に従う。異なる構造は、多くの場合、水和の効果も含めた上での部分モル体積が異なるので、圧力によって、その間の平衡を推移させることができる。ここに審査に付された前野寛大の研究は、蛋白質が織り成す様々なレベルでの構造揺らぎを圧力摂動を用いて解析したものである。

第二章においては、まず高圧 NMR 測定によりニワトリリゾチームの N 構造と U 構造間の転移が二状態転移であることを明確にした後に、700 MPa まで昇圧可能な高圧蛍光システムを用い、N-U 構造間転移を、広い圧力および温度範囲で観測している。より高い圧力の使用が可能になったことにより、圧力軸に沿っての蛋白質の構造転移をその終了点まで明瞭に観測するという、従来は困難であったことが実現できるようになり、種々の熱力学的パラメータ値が正確に算出されている。これは基本標準となる熱力学データの記載という点で非常に重要であり、その意義は大きい。より進んで、他の蛋白質の熱力学的記載へのこの手法の適用が期待される。この研究によって、ニワトリリゾチームの転移にともなう比熱変化が精度良く求められた他、N 構造の最安定温度が 250 MPa から 550 MPa への昇圧にともなって 10°C から 40°C へと上昇するという、新規の知見が得られている。また、N-U 状態間の部分モル体積変化の温度依存性、そして、膨張係数の N-U 状態間での差も求められている。熱力学的パラメータがここまで解析できた蛋白質は他に 3 例を数えるのみである。以上を総合して、圧力-温度平面上に、高温側、低温側、高圧側での変性相を含む、ニワトリリゾチーム蛋白質の自由エネルギーランドスケープを描くことができた。ここで得られた基本データは、今後、蛋白質の関係する種々の反応を論ずる際の基礎として大変有用なものになると評価できる。

次に第三章では、オボムコイドのアレルゲン性除去に高圧下での部分的変性反応と蛋白質分解酵素処理を利用している。一般に蛋白質の抗原性決定部位は複数のアミノ酸から構成される三次構造上のある部分からなる。目的蛋白質に種々の変性処理を行っても、変性因子が取り除かれた後に抗原性決定部位の三次構造が再生すればアレルゲン性は除去されない。従って、蛋白質分解酵素処理により

ペプチド鎖を化学的に分解することが望ましいわけである。しかしオボムコイドの安定性は高く、常圧においては酵素処理による分解が進まないことが知られていた。ここでは、まず、加圧下でオボムコイドが天然状態より高いエネルギーかつ低い部分モル体積をもつ中間構造に移行することを高圧蛍光実験から明らかにしている。そして、その状態でキモトリプシンによるオボムコイドの酵素分解処理を行い、分解がオボムコイドの第 1 ドメインおよび第 2 ドメインで起こり、アレルゲン性が見られないペプチド断片が生成することを示している。この高圧下酵素分解によるアレルゲン性除去は、蛋白質の体積原理に基づいた加圧下での構造移行に立脚するものであり、熱力学的原理の実学面への応用として評価できる。この手法はいろいろな基質蛋白質および加水分解酵素の系に広く適用できると思われる。

第四章では、多次元可変圧力 NMR 法を使い、フォールド構造における蛋白質コンフォメーションの比較的遅い時間スケールでの揺らぎを観測している。対象としたのは大きな分子内キャビティを持つ T4 リゾチーム L99A 変異体である。<sup>15</sup>N/<sup>1</sup>H-TROSY スペクトルや <sup>13</sup>C/<sup>1</sup>H-HSQC スペクトル測定の結果、キャビティを構成しているアミノ酸残基側鎖ピーク強度の、加圧による特異的な減少を観測し、フォールド構造アンサンブル内で分子内キャビティ周辺の選択的な無構造化と水和が起こっていることを示している。また第 5 章では、高圧蛍光法と圧力ジャンプ蛍光法をフォールディングのキネティクス研究に適用し、スタフィロコッカスクレアゼとその複数種の変異体を対象に、遷移状態アンサンブルにおける水和に関する情報を得るための新規の解析法を提案している。これにより、特定の残基に関する変異体の変性状態に比べて遷移状態がどの程度脱水しているかの指標が得られ、遷移状態アンサンブルにおける水和状態に関する情報が得られる。これらの研究は蛋白質科学の基礎的な面において世界に先駆けた新規性の高い成果を得たものと評価できる。

以上、前野寛大による本研究は、空間的・時間的にさまざまな領域で起こる蛋白質のダイナミックな構造転換を対象に、多次元可変圧力 NMR 法を始めとする高圧手法を用いて、蛋白質の大局的な熱力学的安定性、局所的な分子内キャビティの構造揺らぎ、遷移状態アンサンブルにおける水和、アレルゲン性除去につながる新規の高圧処理など、蛋白質ダイナミクスの種々の局面に関する新規かつ重要な知見を得たものであり、博士（工学）論文として価値あるものと認める。