

論文審査の結果の要旨

氏名 坂根 勲

本研究の目的は、タンパク質 1 分子を力学的にアンフォールドさせることにより、タンパク質の折れ畳み機構の新たな知見を得ることである。

これまでのタンパク質の折れ畳みの実験は、多数個のタンパク質分子を対象として、それらの平均値を測定する方法で行われてきた。この方法では、少数の折り畳み中間体や、不安定な折れ畳み中間体からの信号は、大多数の平均的な構造からの信号に埋もれてしまう。この問題を解決するためには、1 分子に対する測定が必要となる。論文提出者は、タンパク質スタフィロコッカルヌクレアーゼ (SNase) 1 分子を、分子間力顕微鏡を用いて、力学的に伸長することにより、アンフォールドさせる実験を行った。

本研究で用いられた分子間力顕微鏡 (IMF) とは、分子内や分子間に働く微細な力を計測するために、原子間力顕微鏡 (AFM) に独自の改良を施した装置である。自作の極めて柔らかいカンチレバー (0.1 pN/nm) と、光の輻射圧を利用したカンチレバーの位置制御機構により、サブピコニュートンの力分解能とナノメートルの位置分解能での計測が可能となった。

試料タンパク質 SNase は、149 個のアミノ酸から成る球状タンパク質である。その構造は、 α ヘリックスから成る C 末ドメインと、主に β ストランドから成る β バレルドメインで構成されている。論文提出者は、SNase を力学的に伸長するため、SNase の N 末端と C 末端にシステインを導入した変異体 (NC-Cys SNase) を作製した。システインの持つチオール基が、金に化学吸着する性質を利用し、タンパク質の一端を金蒸着したガラス基板に、他端を金を蒸着した IMF プロブに固定する。この変異体は、ジスルフィド結合により、自己重合する能力を持つため、単量体から多量体までの様々な形態の SNase について計測することが可能であった。

論文提出者は、1 分子の力学的アンフォールドが可能であるかを判定するための実験を行った。金蒸着基板に吸着した NC-Cys SNase が活性を持つ天然構造であることを示すため、金蒸着基板に吸着した SNase の DNA 加水分解活性を測定した。その結果、活性を持つ分子が 1 m^2 あたり 1 個存在すると見積もられた。また、金蒸着基板に吸着した SNase を一度に 1 個伸長することができるかを確認するため、Cy3 蛍光色素で標識された NC-Cys SNase を金基板に吸着させ、その蛍光像を観察した。その結果、金基板上的 SNase の間隔がおおよそ 1 m で有ることが分かった。IFM のプロブ先端の曲率半径は、大きく見積もっても 100 nm であることから、一度に 1 個のタンパク質を伸長することが可能であることが確認された。

論文提出者は、NC-Cys SNase を力学的に伸長する実験を行い、タンパク質の長さ、掛けられた力の関係（フォースカーブ）を得た。フォースカーブの解析から、SNase1 分子全体のアンフォールドに対応する 45 nm の伸長とともに、部分的アンフォールドに対応する 15nm の伸長が観測された。また、同一のタンパク質に対する連続した 2 回の伸長において、部分的なアンフォールドが見られる場合と見られない場合があることが観測された。これは、力学的アンフォールディング過程において、部分的なアンフォールド状態を経由する過程と、全体が一度にアンフォールドする過程の二つがあることを示している。球状タンパク質の一部が力学的にアンフォールドすること、力学的アンフォールディング過程が複数存在することが示されたのは初めてのことである。

カルシウムイオン (Ca^{2+}) や SNase の阻害因子である 3', 5'-phosphothymidine (pdTp) は、SNase と結合して、SNase の構造を安定化することが知られている。論文提出者は、 Ca^{2+} が SNase の力学的アンフォールディングに与える影響を調べるため、 Ca^{2+} 存在下で SNase の伸長実験を行った。その結果、多くの場合、SNase は IFM で計測できる力の範囲内では伸長せず、力学的に強固な構造をとっている事が分かった。

以上の実験で得られたフォースカーブについて、論文提出者は統計的な解析を行った。アンフォールディングによる、伸長距離差の分布において、 Ca^{2+} 非存在下ものでは、15 nm・30 nm・45 nm の距離差に対応したピークが見られた。15 nm と 30 nm の伸長距離は、部分的なアンフォールディングの結果として生じたものと結論された。 Ca^{2+} 存在下に対する分布には 15 nm に単一のピークが存在するのみで、 Ca^{2+} 非存在下に対する分布と明確な差が現れた。

論文提出者は、以上の結果を SNase の 2 次・3 次構造とを対応させて考察を行った。部分的なアンフォールディングは、伸長距離 15 nm に対応する C 末側の α ヘリックスドメインがアンフォールドしたものと同定された。また、 Ca^{2+} の結合部位が N 末側の β バレルドメインであることから、 Ca^{2+} は主に β バレルドメインを強固にする働きを示した。

以上を要約すると、論文提出者は、力学的アンフォールディングという手法によって、タンパク質折れ畳み機構の新たな知見を得た、という点において、生物物理学上有意義な貢献をしたものと認められる。よって審査員一同、博士（理学）にふさわしい研究であると判断した。