

論文の内容の要旨

論文題目 好熱菌由来チトクローム *c* の立体構造解析に基づく
蛋白質の安定性に関する物理化学的研究

氏名 長谷川 淳

ヒトゲノムシーケンスの解析がほぼ完全に達成された現在、ポストゲノム研究をどのように推進していくかということが、生命科学における最も重要な課題の一つである。蛋白質の立体構造解析は、その機能や物理化学的特性を把握する上で非常に有用な情報を与えてくれるために、ポストゲノム研究においても非常に重要であると考えられている。そのような背景の基に、網羅的に蛋白質の立体構造解析を行うプロジェクトとして構造ゲノムがあるが、相補的な研究として、特性のよく分かっているモデル蛋白質を用いて非常に詳細な解析を行い、他の蛋白質の解析にも適用できる知見をより多く得ることも重要である。

蛋白質の構造安定性に関する研究は、蛋白質の物理化学的特性を把握する上で非常に多くの知見を与えてくれ、上述したモデル蛋白質を用いた研究課題の一つの大きな柱である。安定性の研究を行う上では好熱菌と常温菌由来の二つの蛋白質を用いることが非常に有効であり、好熱性水素細菌由来のチトクローム *c*-552 (HT *c*-552) と緑膿菌由来のチトクローム *c*-551 (PA *c*-551) はこの点において非常に適している。この二つの蛋白質は、アミノ酸配列で 54% の相同性を有するにも関わらず、安定性においては大きな差異がある。また、PA *c*-551 は既に X 線結晶構造解析によって高分解能の立体構造が得られているので、HT *c*-552 の立体構造を決定することが出来れば、立体構造の詳細な比較から安定性に関する新たな知見が得られるものと期待される。

以上のような背景の基に、本研究では HT *c*-552 の立体構造を決定して PA *c*-551 の構造と比較し、得られた結果を基に PA *c*-551/HT *c*-552 における安定性の解析を行うことにより、構造・安定性相関における新たな知見を得ることを目的とした。

1. HT *c*-552 の NMR による水溶液構造解析

HT *c*-552 の溶液構造を、NMR と分子動力学計算を用いて決定することが出来た。得られた構造を PA *c*-551 と比較したところ、主鎖のフォールディングにはほとんど差異が見られなかったのに対して、側鎖の構造には空間的に離れた三箇所領域において、安定性の差に関与すると思われる差異が存在することが分かった。まず、PA *c*-551 の Phe-7 および Val-13 周辺の領域（領域 1）に明確な差異があることが分かった。PA *c*-551 の Phe-7 は HT *c*-552 では Ala になっており、ベンゼン環が消失したことにより生じた空間を埋めるように、周辺の側鎖が微妙に構造を変えていることが分かった。この結果、PA *c*-551 の Phe-7 周辺に存在していた非常に小さな空間が HT *c*-552 では消失していることが分かった。また、PA *c*-551 の Phe-7 のベンゼン環の高い平面性のために周辺の側鎖がエネルギー的に不利な構造を取っていたが、HT *c*-552 の場合はこれらの不利な側鎖構造が解消されていることが分かった。二つ目として PA *c*-551 の Phe-34、Gln-37 および Glu-43 周辺の領域（領域 2）にも明確な差異が発見された。これらの残基は HT *c*-552 ではそれぞれ Tyr, Arg および Tyr となっており、Tyr-34 と Tyr-43 のアミノ酸置換により HT *c*-552 では PA *c*-551 には存在しない新たな疎水性相互作用が形成されていることが分かった。また、Arg-37 のグアニジル基は Tyr-34 および Tyr-43 の側鎖と aromatic-amino 相互作用していることが分かった。更に三つ目として PA *c*-551 の Val-78 周辺の領域（領域 3）にも明確な差異が観測された。この残基は分子の中心に位置するヘムおよびその周辺の側鎖と疎水性コアを形成していたが、PA *c*-551 では非常に小さな空間が存在していることが分かった。HT *c*-552 ではこの残基が Ile となっており、一つ増えたメチル基によりこの小さな空間を充填していることが分かった。以上のように、両者の立体構造を詳細に比較することにより、幾つかの明確な側鎖の相互作用様式の違いを発見し、安定性に関与すると思われるアミノ酸残基をリストアップすることが出来た。

2. 大腸菌によるチトクローム *c* の大量発現系構築

リストアップされたアミノ酸残基が実際にどの程度安定性に寄与しているかを調べるためには、変異蛋白質が効率的に得られる系を確立する必要がある。そこで、大腸菌を用いたチトクローム *c* の大量発現系を構築した。PA *c*-551 は、ペリプラズム空間でヘムと共有結合することが必要なため、N 末側にシグナル配列を付与することによりペリプラズム空間に分泌するようにした。Cold osmotic shock 法でこの画分を抽出後、陰イオン交換およびゲル濾過により精製することが出来た。得られた PA *c*-551 は SDS-PAGE における CBB 染色でシングルバンドのレベルまで精製することが出来た。UV、CD および NMR を用いた分光学的分析により緑膿菌から分取・精製された PA *c*-551 とほぼ同じスペクトルが得られた。以上の結果から大腸菌で発現させた PA *c*-551 はペリプラズム空間に分泌された後にヘムと結合し、正常にフォールディングした状態で得られることが分かった。このように確立した系を用いて、少ない労力で大量にチトクローム *c* を得ることが出来るようになり、変異体を用いた解析がより簡便

に行えるようになった。

3. 変異体の作成

HT *c*-552 の立体構造解析から安定性に関与すると推測されたアミノ酸残基に関して、PA *c*-551 の相当する残基に変異を導入した変異蛋白質を作成して、その安定性を評価した。評価は、CD 測定により得られる 222nm の吸収を指標として、1.5M のグアニジン塩酸塩存在下での熱安定性、およびグアニジン塩酸塩を用いた変性剤に対する安定性の二つについて行った。その結果、作成した全ての変異体において熱及びグアニジン塩酸塩に対する安定性が上昇していることが明らかになった。従って、リストアップされたほとんどのアミノ酸残基が HT *c*-552 の高い安定性に寄与していることが明らかとなった。また、領域 1 および 2 においては、最も安定性が上昇するアミノ酸の組み合わせを同定することが出来た。領域 1 においては F7A/V13M の二残基置換が有効であることが分かった。領域 2 においてはそれぞれ単独のアミノ酸置換は安定性に寄与するにも関わらず、三残基を同時に置換した F34Y/Q37R/E43Y より F34Y/E43Y の方が高い安定性を示すことが分かった。これは、これらの残基が互いに直接相互作用して、単独の場合の効果に負の影響を及ぼすためであると考えられた。

4. 変異の組み合わせ効果の検証

3 で確認された安定性を上昇させる変異を組み合わせ、複数の領域において変異を導入した蛋白質を作成し、その有効性を検証する実験を行った。その結果、複数の領域において変異を導入した蛋白質は、いずれも単一の領域についてのみ変異を導入した蛋白質より安定性が上昇することが分かった。この傾向は 1.5M のグアニジン塩酸塩存在下での熱安定性およびグアニジン塩酸塩に対する変性のいずれにおいても同じであった。また、熱安定性の場合には、それぞれ単一の領域のみの変異蛋白質における温度上昇値をほぼ足し合わせた温度上昇値が得られることが分かった。その結果、特に三箇所の領域全てにおいて変異を導入した変異蛋白質 (F7A/V13M/F34Y/E43Y/V78I) は、熱安定性の実験において 33.4℃もの上昇を示し、HT *c*-552 に近い安定性を示した。また、グアニジン塩酸塩に対する変性に関しては全く同程度の安定性を示し、わずか 5 残基のアミノ酸置換で常温菌由来の蛋白質に好熱菌由来の蛋白質と同レベルの安定性を獲得させること可能であることが分かった。これらの結果から、空間的に離れて独立に寄与するアミノ酸変異を組み合わせることが、安定性を大きく上昇させるためには非常に有効な手法であることが示された。

5. 変異体の水溶液構造解析

HT *c*-552 に近い安定性を有する 5 残基置換 PA *c*-551 変異体の立体構造を NMR により決定することが出来た。得られた構造を PA *c*-551 および HT *c*-552 と比較したところ、5 残基置換 PA *c*-551 変異体は主鎖構造においては両者とほとんど変わらないが、側鎖構造に関しては HT *c*-552 のものと極めて近いことが確認された。

まとめ

HT *c*-552 と PA *c*-551 を用いた安定性研究を通じて、構造・安定性相関における新たな知見を得ることが出来た。NMR により決定された HT *c*-552 の立体構造から、好熱菌の蛋白質がどのようにしてその高い安定性を効率的に獲得しているかを明らかにすることが出来た。

また、本研究により、次のような手法が安定性を効率的に向上させる最もよい戦略の一つであることが示された。

- ① 立体構造情報に基づく詳細な解析を行った後に、安定性に寄与すると予想され、かつ空間的に離れた領域を特定する。
- ② 特定された領域に変異を導入して安定性を評価し、それぞれの領域で最も安定性を上昇させる変異体を同定する。
- ③ ②において同定された変異を組み合わせた変異体を作成する。

この手法はより高い安定性を必要とする酵素などに用いれば、産業上の利用価値があるものと期待される。

本研究によって得られた知見は、蛋白質の物理化学的性質をより深く考察するために有用なものであり、他の蛋白質の特性を研究する上でも有用であると考えられた。