

氏名	ば 殿 直 樹
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学位記番号	理 博 第 3202 号
学位授与の日付	平 成 19 年 9 月 25 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	理 学 研 究 科 化 学 専 攻
学位論文題目	Measurement of the Change in Protein-Solvent Interaction upon Protein Folding by Transient Grating Method (過渡回折格子法によるタンパク質フォールディング過程におけるタンパク質溶媒間相互作用の測定)
論文調査委員	(主 査) 教 授 寺 嶋 正 秀 教 授 竹 腰 清 乃 理 教 授 谷 村 吉 隆

### 論 文 内 容 の 要 旨

タンパク質は、生体内において変性状態から短時間で自発的に天然状態を形成する。この過程は、タンパク質フォールディング過程とよばれているが、まだその分子論的な理解は十分ではない。これまでこのフォールディングダイナミクスは、タンパク質側鎖のパッキングなど分子内の性質で主に決定されていると考えられていたが、近年、タンパク質と周囲の溶媒の相互作用も天然構造の決定に重要な因子と考えられはじめている。本研究では、フォールディング機構におけるタンパク質溶媒間相互作用の詳細を明らかにするために、フォールディング過程に現れる短寿命中間体の拡散係数 ( $D$ ) と熱力学量の測定を行った。両パラメータはともにタンパク質全体の水和状態を反映する。本研究では、過渡回折格子 (TG) 法を用いることで、天然状態に加えこれまで測定が困難であった短寿命中間体についても両パラメータを高い時間分解能で測定できた。

まず、 $D$  からタンパク質溶媒間相互作用を評価するために、定常平衡条件下でタンパク質構造と  $D$  の相関を調べた。その際に、TG 法と光反応性のラベル剤 sulfo-HSAB を組み合わせた新規  $D$  測定法を開発した。測定にはアポミオグロビン (アポ Mb) を用いた。このアポ Mb はヘリックス構造のみで構成されており、pH4 溶液中において平衡中間体を形成する。この平衡中間体は、pH ジャンプ実験で観測されるキネティックな中間体と似た構造をしているため、フォールディング中間体のモデルとしてよく研究されている。 $D$  測定の結果、変性状態では親水性アミノ酸残基が水に露出しタンパク質と水との相互作用が強くなっている一方で、pH4 中間体では溶媒との相互作用が天然状態と類似であることを示した。また、溶媒接触表面積に関連する熱容量変化と  $D$  の結果の比較から、この pH4 中間体内部にトラップされた水分子がある可能性も示した。このような水分子の存在は、フォールディング初期過程において重要な役割を果たしていると考えられる。

次に、フォールディングにともなうタンパク質溶媒間相互作用の変化を実時間で観測した。用いたタンパク質は修飾アポプラスチックアニン (修飾アポ Pc) である。実時間測定では反応開始法が重要であるが、ここでは光解離性のジメトキシニトロベンジル (DMNB) 基をアポ Pc のシステイン基に結合させることでアポ Pc を変性させ、その後レーザー照射により DMNB 基を光解離させることですばやくフォールディングを開始させた。TG 測定の結果、アポ Pc は、まず、最初の変性状態から修飾基が 400ns で光解離した後、270  $\mu$ s で疎水基が脱水和する一方で、親水基が水和することで体積収縮することがわかった。すなわち、この過程は疎水凝縮過程であると解釈できる。続いて、23ms で疎水基・親水基がともに脱水和した後、最終的にプロリン異性化を経て天然状態へと巻き戻ることがわかった。こうしたフォールディングスキームは、本研究での  $D$  および熱力学量測定から明らかにされたものである。

このように、フォールディングの初期過程に疎水凝縮が起こり、その後に側鎖の適切なパッキングや水の排出が起こることによってタンパク質天然構造が効率的に形成されていることが本研究により明らかとなった。

## 論文審査の結果の要旨

主論文は、タンパク質フォールディング機構におけるタンパク質と水との相互作用の寄与の解明に関する研究結果をまとめたものである。タンパク質フォールディングの機構解明は変性タンパク質が原因の多くの病気の原因究明に役立つと考えられており、これまで世界各国で研究が活発に行われている。その結果、タンパク質と水との相互作用がタンパク質の天然構造形成に重要な役割を果たしていることが現在示唆されている。したがってフォールディング機構にも水が影響を与えていると考えられるが、天然状態以外の短寿命フォールディング中間体の水和情報は未だに少ない。

こうした背景の下に、申請者は、タンパク質水和情報を得るために、拡散係数と熱力学量に着目した。なぜなら、これまでよく行われている蛍光測定などではタンパク質の局所的な水和状態しか反映しないが、両物理量ともタンパク質全体の水和状態を反映するため、その測定により有用な情報が得られると考えたためである。

まず、タンパク質構造と拡散係数の相関を構築するために、定常平衡での拡散係数測定を行っている。この目的のために、TG法と光反応性ラベル剤を組み合わせてタンパク質拡散係数の新規測定法も開発しており、タンパク質物性解析分野に大きく貢献している。円二色性と拡散係数の測定の結果、アポミオグロビンのpH4平衡中間体においてタンパク質内部にトラップされた水分子の存在の可能性を示した。このような水分子は他のタンパク質でも見られたことがあり、タンパク質の構造形成に普遍的な役割を果たしていると考えられていることから、本研究の結果は、この概念を支持するものとして重要である。

更に、時間分解測定のために、修飾アポプラストシアニン（修飾アポPc）を用いて、レーザー照射によりDMNB基を光解離させることですばやくフォールディングを開始させる方法を用いた研究を行っている。得られた幅広い時間領域でのTG信号を、全て矛盾なく説明できる反応スキームを構築した。また、フォールディングに伴う熱力学量を測定することに成功している。その結果、フォールディング初期に疎水凝縮が起こっていることを明らかにした。これまでフォールディング初期の疎水凝縮は計算機実験や小角X線散乱などで観測されているのみであり、拡散係数と熱力学量という水との相互作用の観点から直接モニターした報告はない。したがって本研究で得られた結果は貴重である。

以上のように、本論文は、タンパク質フォールディング研究において貢献するところが大きく、博士（理学）の学位論文として価値あるものと認める。また、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。