

氏名	じょう ち やす まさ 城 地 保 昌
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学位記番号	理 博 第 2481 号
学位授与の日付	平成 14 年 3 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	Crystallographic Refinement of Protein Dynamic Structure (X線結晶回折データを用いた蛋白質の動的構造精密化法の開発とその応用)
論文調査委員	(主 査) 教授 郷 信 広 教授 三木 邦 夫 教授 鷲田 伸 明

### 論 文 内 容 の 要 旨

X線結晶構造解析は現在、蛋白質の形(=静的構造)を決定する最も有効な手段のひとつであるが、同時に蛋白質が静的構造のまわりでどのように動くか(=動的構造)についての情報を得ることもできる。蛋白質は動くことにより生命活動に必要な機能を発揮することができることを考えると、その動的構造を解析することは蛋白質の機能を理解するうえで重要である。そこで申請者は、木寺らによって提案された基準振動精密化法を、原子分解能解析の視点から改良し、X線結晶回折データから蛋白質の動的構造のより詳細な情報を抽出する方法を開発し、その実験データへの適用を試みた。

基準振動精密化法は、あらかじめ計算した基準振動を結晶構造の動的部分のモデルとして組み込み、そのモードの振幅・相関を実験データから決定することによって、そのダイナミクスの情報を取り出そうとする方法である。近年、実験技術の進歩により、分解能が1.2Åを超える、原子分解能と呼ばれる高精度の蛋白質結晶構造の解析が可能となった。この原子分解能データは、従来の分解能( $\geq 1.5\text{\AA}$ )のデータより多くの情報を含んでいる。そこで申請者は、方法論を拡張し、従来の分解能では無視されていた水素原子からの寄与を正しく考慮し、部分構造に複数の配置が考えられる Multiple Conformer を基準振動精密化法の特徴を崩すことなくモデルに組み込むことに成功した。さらに結晶中でのダイナミクスをより詳細に表現するために動的構造のモデルとして、基準振動よりもさらに確からしい主成分モードを用いる方法を開発した。

申請者は、このように開発したプログラムを用いて、結晶中における蛋白質動的構造の温度依存性を2種類の蛋白質結晶(ミオグロビン、リゾチーム)で調べた。多くの蛋白質は200K近傍で、「ガラス転移」類似現象を示すことが、メスバウアー分光法や中性子散乱などにより観測されている。これは、蛋白質には多くの準安定構造が存在し、転移温度以下では準安定構造内での調和的な運動が支配的であるが、転移温度以上では準安定構造間をジャンプする非調和な運動が現れるためである、と考えられている。蛋白質の機能発現には、一般的に、転移温度以上で現れる非調和な運動が必須であると考えられており、「ガラス転移」はその意味で蛋白質研究の重要な課題である。

まず、40~300Kにおける5つの温度領域で測定したミオグロビンのX線結晶回折データを基準振動精密化法で解析した。その結果、剛体運動である外部ゆらぎを取り除いた内部ゆらぎの二乗平均  $\langle \Delta r^2 \rangle_{\text{internal}}$  は、 $\langle \Delta r^2 \rangle_{\text{internal}} = \alpha T + \beta$  という形で表現され、 $\alpha$  の値は調和運動を仮定した基準振動解析による結果とよく一致した。 $\beta$  は準安定状態の空間的な分布を表していると考えられる。従って、全体のゆらぎは、準安定状態の分布関数と調和運動の畳み込みで表現されることとなる。ミオグロビンの「ガラス転移」が、X線結晶構造解析で観測されない理由は、メスバウアー分光法や中性子散乱が動きそのものを観測する非干渉性散乱であるのに対し、X線結晶構造解析は静的な分布を観測する干渉性散乱であることによっている。このことから申請者は、ミオグロビンでは、準安定構造の静的な分布が、転移温度を挟んで低温と高温で変化していないという結論を導き出した。

つぎに、113~178Kの7つの温度領域で測定したリゾチームのX線結晶回折データを基準振動精密化法で解析した。その結果、ゆらぎの温度依存性をみると150K付近で、外部ゆらぎに明らかな転移がみられ、内部ゆらぎにもわずかな転移が

みられた。また、転移温度近傍で、静的平均構造にも転移が観測された。このような転移現象は、低温で占有されていなかった準安定構造が150Kを越えた温度で現れたことを示している。さらにリゾチーム分子上の各部位ごとに、異なったゆらぎの温度依存性があることを示した。最後に申請者は、ミオグロビンでは転移が観測されず、リゾチームでは観測された理由を考察している。結晶構造を比べるとリゾチーム結晶には、ミオグロビン結晶にはない大きな solvent channel が存在する。150K 付近という温度は、bulk water が cubic ice に転移する温度であること、さらにリゾチーム結晶中で明らかな転移を示す部位が solvent channel のまわりに存在することから、リゾチームではこの大きな solvent channel に存在する bulk water が cubic ice に転移することが、静的、動的構造の変化を引き起こしたものと推測した。

## 論文審査の結果の要旨

申請論文は、近年の実験技術の進歩に対応した X 線結晶構造精密化法の開発と、その方法の適用としての結晶中における蛋白質動的構造の温度依存性の研究に関する成果である。

X 線結晶構造解析は現在、蛋白質の形 (=静的構造) を決定する最も有効な手段のひとつであるが、同時に蛋白質が静的構造のまわりでどのように動くか (=動的構造) についての情報を得ることもできる。蛋白質は動くことにより生命活動に必要な機能を発揮することができることを考えると、その動的構造を解析することは蛋白質の機能を理解するうえで重要である。そこで申請者は、木寺らによって提案された基準振動精密化法を、原子分解能解析の視点から改良し、X 線結晶回折データから蛋白質の動的構造のより詳細な情報を抽出する方法を開発し、その実験データへの適用を試みた。

蛋白質のダイナミクスを解析する手段として分子シミュレーションは有効な手段である。しかし、調和的な性質を解析することは比較的容易であるが、蛋白質の機能を理解するために重要である非調和的な性質は計算機技術上の制限などから、解析に多少の困難がある。そこで、分子シミュレーションと実験データを組み合わせることで実験データに即した蛋白質のダイナミクスの詳細な情報を取り出すという申請者のアプローチは、機能と蛋白質のゆらぎとの関連を明らかにしていくために極めて有効であると評価できる。

申請者は、このように開発したプログラムを用いて、結晶中における蛋白質動的構造の温度依存性を 2 種類の蛋白質結晶 (ミオグロビン、リゾチーム) で調べた。多くの蛋白質は 200K 近傍で、「ガラス転移」類似現象を示すことが、メスバウアー分光法や中性子散乱などにより観測されている。これは、蛋白質には多くの準安定構造が存在し、転移温度以下では準安定構造内での調和的な運動が支配的であるが、転移温度以上では準安定構造間をジャンプする非調和な運動が現れるためである、と考えられている。蛋白質の機能発現には、一般的に、転移温度以上で現れる非調和な運動が必須であると考えられており、「ガラス転移」はその意味で蛋白質研究の重要な課題である。

申請者は干渉性の散乱 (X 線結晶回折) と非干渉性の散乱 (メスバウアー分光, 中性子散乱) の性質の違いをふまえて、解析結果を考察し、X 線結晶解析で得られるゆらぎの温度依存性を調べた。その結果、非干渉性の散乱では得られない「ガラス転移」温度における、電子密度分布の変化を明らかにした。さらに、ミオグロビンとリゾチームでは、その結晶構造違いによって異なったゆらぎの温度依存性を生むことを示し、その相違を生む原因についても、明快な説明を与えている。このような解析は申請者らによって開発されたプログラムを用いることによりはじめて実現できるものである。この方法を多くの蛋白質に応用することは蛋白質動的構造からその機能を考察する手助けになると期待される。

よって本論文は、博士 (理学) の学位論文として価値があるものと認めた。また、論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。