

氏 名	あき 秋 やま 山 しゅう 修 じ 志
学位(専攻分野)	博 士 (工 学)
学 位 記 番 号	工 博 第 2132 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	工 学 研 究 科 分 子 工 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	Stepwise Folding Mechanisms of Globular Proteins (球状蛋白質の多段階的な折れ畳み機構)

論文調査委員	(主 査) 教 授 森 島 續 教 授 尾 崎 邦 宏 教 授 川 崎 昌 博
--------	--

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は、蛋白質のアミノ酸配列（一次配列）と立体構造の相関を明らかにするべく、球状小蛋白質の折れ畳みメカニズムについて研究した結果をまとめたものであり、5章8節で構成されている。

第1章では序論として、ランダムコイル状に変性した蛋白質（変性状態）が、特異的な立体構造（天然状態）へと折れ畳むプロセスについて紹介している。天然状態を安定化する相互作用は、近接的相互作用と遠隔的相互作用の2種類に大きく分類される。変性状態が、これら性質の異なる2種類の相互作用を、一次配列の情報に基づいて巧みに構築しながら天然状態へと折れ畳むプロセスは、実験および理論どちらの観点からもよく理解されていない。このような問題点を指摘した上で、2種類の相互作用が折れ畳む過程で構築されていく順序や、折れ畳んだ後の構造を支える2種類の相互作用のバランスを調べることで、一次配列と立体構造の関係を理解するために重要であることを述べ、本研究全体の研究指針を明示している。

第2章では、種々の蛋白質に共通して見出されるシェルマンモチーフに着目し、その構造を支える各相互作用のバランスを検討している。6残基という短い配列で構成されることから、シェルマンモチーフは主に近接的相互作用によって安定化されていると推測されるが、構造決定因子を実験的に検証した例はない。本論文では、ミオグロビンやヘモグロビンをモデル蛋白質として用い、アミノ酸置換法や各種分光法を駆使してモチーフ構造を支える各相互作用のバランスを検討している。その結果、シェルマンモチーフが形成されるためには、近接的相互作用だけでなく、モチーフ内に含まれる2つの疎水性残基を介した遠隔的相互作用が必要不可欠であることを初めて明らかにしている。

第3章では、蛋白質の折れ畳み過程において、近接的相互作用と遠隔的相互作用がどのような順序で働くのかを検討している。変性した蛋白質が折れ畳む反応は一般的に速く、ストップト・フロー装置に代表されるミリ秒程度の時間分解能で反応を追跡することは困難である。本論文では、高速液体混合技術と各種分光法（円二色性分光法、X線小角散乱法、パルス水素・重水素交換 NMR 法）を組み合わせた装置開発を独自に行うことで、溶液混合により開始された折れ畳み反応をサブミリ秒の時間分解能で追跡することに初めて成功している。これらの装置でシトクロム *c* の折れ畳みプロセスを観察したところ、折れ畳み反応開始後100マイクロ秒以内の初期段階では、疎水性アミノ酸残基同士に遠隔的相互作用が働き、コンパクトなクラスターが形成されることを明らかにしている。また、100マイクロ秒からミリ秒にわたる後期段階では、近接的相互作用と遠隔的相互作用が協同的に働くことで、二次構造の形成と分子半径の収縮が同期して進行することを示している。以上の結果から、「特異的な遠隔的相互作用により折れ畳み運動が開始され、その際に生じた折れ畳みクラスターを核として、近接的相互作用と遠隔的相互作用が協同的に構築される」という多段階的な折れ畳みメカニズムを提唱している。

第4章では、寿命の短い折れ畳み中間体をトラップし、その二次構造含量やコンパクトさを定量する手段としてゾル・ゲル法に着目している。シトクロム *c* をゾル・ゲル中に封入し、その折れ畳み反応を円二色性分光法、蛍光分光法、電子吸収スペクトルで追跡したところ、折れ畳み反応が溶液中の1万分の1程度にまで減速されることを実験的に示している。このような結果に基づき、観察の難しい溶液中の速い折れ畳み反応を追跡する手段として、ゾル・ゲル法が有用である可能性を

提唱している。

第5章では全編を通じての総括と、研究結果の要旨がまとめられている。

論文審査の結果の要旨

本論文は、蛋白質のアミノ酸配列と立体構造の相関を明らかにするべく、球状小蛋白質の折れ畳みメカニズムについて研究した結果をまとめたものであり、得られた主な成果は以下の通りである。

1. 蛋白質構造を安定化する相互作用は、近接的相互作用と遠隔的相互作用の2種類に大きく分類される。種々の蛋白質に共通して見出されるシェルマンモチーフが形成されるためには、近接的相互作用だけでなく、モチーフ内に含まれる2つの疎水性残基を介した遠隔的相互作用が必要不可欠であることを実験的に初めて明らかにした。
2. 蛋白質の折れ畳み反応は一般的に速く、ミリ秒程度の時間分解能で反応を追跡することは困難である。本論文では、高速液体混合技術と各種分光法（円二色性分光法、X線小角散乱法、水素・重水素交換 NMR 法）を組み合わせた装置を独自に設計・開発し、折れ畳み反応をサブミリ秒の時間分解能で追跡することを可能とした。
3. 上述の装置でシトクロム *c* の折れ畳みプロセスを観察し、「特異的な遠隔的相互作用により折れ畳み運動が開始され、その際に生じた折れ畳みクラスターを核として、近接的相互作用と遠隔的相互作用が協同的に構築される」という多段階的な折れ畳みメカニズムを実験的に明らかとした。
4. シトクロム *c* をゾル・ゲル中に封入し、その折れ畳み反応を各種分光法で追跡したところ、折れ畳み反応が溶液中の1万分の1程度にまで減速されることを実験的に示し、寿命の短い折れ畳み中間体を捕捉する手段として、ゾル・ゲル法が有用である可能性を提唱した。

以上、本論文は、球状小蛋白質の折れ畳みメカニズムに関する重要な知見を与えるだけでなく、今後、アミノ酸配列から蛋白質の立体構造を理論的に予測する際に指針を与えるものである。また、独自に開発された装置の時間分解能はサブミリ秒と非常に高く、様々な蛋白質への応用が十分に期待できる。従って、本論文は、学術上、実際上寄与するところが少なくない。よって、本論文は博士（工学）の学位論文として価値あるものと認める。また、平成14年1月28日、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。