

論文内容の要旨

博士論文題目 Conversion of a monomeric protein into a domain-swapped dimer by utilizing a tight hydrogen bond network at the hinge region for myoglobin

(ミオグロビンのヒンジ領域の強固な水素結合ネットワークの利用による単量体タンパク質からドメインスワップした 2 量体への変換に関する研究)

氏 名 XIE CHENG

(論文内容の要旨)

3次元ドメインスワッピングは、同一タンパク質が分子間で同一構造領域を交換することにより、多量体を形成する機構である。ドメインスワッピングは様々なタンパク質で起こることが知られており、酸素貯蔵タンパク質であるミオグロビンでは、単量体でループ構造であるヒンジ領域がドメインスワッピングにより 2 量体で α ヘリックス構造へと変わる。本論文では、ミオグロビンにおいてヒンジ領域の水素結合ネットワークがドメインスワッピングに及ぼす影響を明らかにすることを目的としている。

第 1 章では、ドメインスワッピング、ミオグロビン、タンパク質の水素結合について説明し、本研究の位置づけを示している。

第 2 章では、ミオグロビンのヒンジ領域の His82 が水分子を介して Lys79 と Asp141 と相互作用できるようにしたまま、Gly80 と His81 をヘリックス形成能が高い Ala に変異させた変異体 (K₃A₂H 変異体) および 2 量体のヒンジ領域の水素結合ネットワークの近くにある Leu137 を親水性アミノ酸 (Glu または Asp) に変異させた変異体 (K₃A₂H-L137E 変異体と K₃A₂H-L137D 変異体) を作製した。野生型ミオグロビンの 2 量体は 70°C で 30 分加熱すると全て単量体に解離したが、K₃A₂H、K₃A₂H-L137E および K₃A₂H-L137D 変異体では、単量体を加熱した場合と 2 量体を加熱した場合で単量体と 2 量体の比が等しくなり、単量体と 2 量体が平衡を形成することが明らかとなった。様々な温度で単量体と 2 量体の平衡を調べ、熱力学的解析により、ミオグロビン変異体の 2 量化は野生型に比べてエンタルピー的に有利だが、エントロピー的に不利であることが分かった。

第 3 章では、X 線結晶構造解析により、K₃A₂H-L137E 変異体では導入した Glu137 が水分子を介して水素結合ネットワークを Trp7 まで拡張して 2 量体構造を安定化させ、K₃A₂H-L137D 変異体では導入した Asp137 が Lys79 と新しい水素結合を形成して 2 量体構造を安定化することが示唆された。分子動力学シミュレーションにより、2 量体で強固な水素結合ネットワークを持つミオグロビン変異体ほど、ヒンジ領域の水素結合の数が増加し、ヒンジ領域の α ヘリックスが堅固になっていることが確認され、ヒンジ領域の水素結合ネットワークが強くなるとミオグロビン 2 量体が安定化するという仮説が裏付けられた。これらの

結果は、ドメインスワッピングによりミオグロビンの単量体から 2 量体を設計する際、水素結合ネットワークの検討が重要で有用であることを示している。

第 4 章では、本論文の総括が示されている。

以上のように、本論文では、ドメインスワッピングしたミオグロビン 2 量体の立体構造と 2 量化における熱力学的パラメータを求め、ヒンジ領域での水素結合ネットワークを強化するとドメインスワッピングを安定化することを実験および分子動力学シミュレーションにより示した。これらの結果は、タンパク質のドメインスワッピングに新しい知見を与えた。

(論文審査結果の要旨)

3次元ドメインスワッピングは、同一タンパク質が分子間で同一構造領域を交換することにより、多量体を形成する機構である。ドメインスワッピングは様々なタンパク質で起こることが知られており、酸素貯蔵タンパク質であるミオグロビンでは、単量体でループ構造であるヒンジ領域がドメインスワッピングにより2量体で α ヘリックス構造へと変わる。本論文では、ミオグロビンのヒンジ領域のアミノ酸残基を置換した変異体を作製し、ヒンジ領域の水素結合ネットワークがドメインスワッピングに及ぼす影響を熱力学的考察およびX線結晶構造解析により調べた。本論文で得られた成果は以下の通りである。

1. ミオグロビンのヒンジ領域の His82 が水分子を介して Lys79 と Asp141 と相互作用できるようにしたまま、Gly80 と His81 をヘリックス形成能が高い Ala に変異させた変異体 (K_3A_2H 変異体) および2量体のヒンジ領域の水素結合ネットワークの近くにある Leu137 を親水性アミノ酸 (Glu または Asp) に変異させた変異体 ($K_3A_2H-L137E$ 変異体と $K_3A_2H-L137D$ 変異体) を作製した。野生型ミオグロビンの2量体は 70°C で30分加熱すると全て単量体に解離するが、 K_3A_2H 、 $K_3A_2H-L137E$ および $K_3A_2H-L137D$ 変異体では、単量体と2量体が平衡を形成することを明らかにした。熱力学的解析により、ミオグロビン変異体の2量化は野生型に比べてエンタルピー的に有利だが、エントロピー的に不利であることを明らかにした。

2. X線結晶構造解析により、 $K_3A_2H-L137E$ 変異体では導入した Glu137 が水分子を介して水素結合ネットワークを Trp7 まで拡張して2量体構造を安定化させ、 $K_3A_2H-L137D$ 変異体では導入した Asp137 が Lys79 と新しい水素結合を形成して2量体構造を安定化することを示した。分子動力学シミュレーションにより、2量体で強固な水素結合ネットワークを持つミオグロビン変異体ほど、ヒンジ領域の水素結合の数が増加し、ヒンジ領域の α ヘリックスが堅固になっていることが確認され、ヒンジ領域の水素結合ネットワークが強くなるとミオグロビン2量体が安定化するという仮説が裏付けられた。

以上のように、本論文では、ドメインスワッピングしたミオグロビン2量体の立体構造と2量化における熱力学的パラメータを求め、ヒンジ領域での水素結合ネットワークを強化するとドメインスワッピングした2量体構造が安定化されることを実験および分子動力学シミュレーションにより示した。これらの結果は、タンパク質の3Dドメインスワッピングに新しい知見を与えるものであり、本論文で得られた結果は生体分子科学分野、タンパク質科学分野の研究として高く評価でき、学術的に大きな意義がある。よって、審査委員一同は本論文が博士(工学)の学位論文として価値あるものと認めた。