

論文内容の要旨

博士論文題目:

Staphylococcal Nuclease の折りたたみ過程における非局所的相互作用の役割
に関する研究

氏名 加藤 真悟

(論文内容の要旨)

蛋白質の立体構造は、水素結合等に代表される、近接するアミノ酸残基間で生じる相互作用(局所的相互作用)と、疎水凝集効果によって誘起される、アミノ酸配列上離れた残基間で生じる相互作用(非局所的相互作用)によって保持されている。従って、蛋白質の立体構造形成機構を考える際には、これらの相互依存関係を明らかにすることが本質的である。

本研究では、黄色ブドウ球菌由来核酸分解酵素 Staphylococcal nuclease (SNase)をモデル蛋白質として用い、非局所的相互作用として、ジスルフィド結合を人為的に導入した変異体の構造形成過程を解析し、蛋白質の立体構造形成における非局所的相互作用の役割を明らかにすることを目的としている。

第1章では、研究背景および研究目的が述べられている。

第2章では、材料の調製法、並びに、構造形成、折り畳み反応の評価方法についての解説が述べられている。

第3章では、SNaseのC末端領域とN末端領域の間に、人為的な非局所的相互作用として、ジスルフィド結合を導入した変異体の溶液構造の解析結果が述べられている。C末端の一部を欠損したSNase(Δ 140-149)は、生理条件下で、非天然構造を示すものの、ジスルフィド結合を導入することで、折り畳み能が回復することが明らかとなった。この結果により、欠損によって失われた、非局所的相互作用は、天然構造形成に本質的であり、ジスルフィド結合によって交換可能であることを示した。

第4章では、ジスルフィド結合導入変異体の折り畳み反応について述べられている。ジスルフィド結合導入変異体では、変性状態で、すでに非局所的相互作用が存在するにもかかわらず、主要な2次構造形成が観測される、22ミリ秒以降の折り畳み反応が、野生型と同一の反応機構に従っていることが明らかとなった。この結果から、非局

所的相互作用が、局所的相互作用形成に先立って生じ、2 次構造形成を促進していることが示された。

第 5 章では、立体構造上 C 末端領域に近接するアミノ酸残基を、網羅的にアラニンに置換した変異体の、溶液構造、安定性、折り畳み反応について述べられている。解析の結果、Leu108 をアラニンに置換した変異体では、C 末端を欠損した変異体と同様に、巻き戻り能を失うことが明らかとなった。Δ140-149 に対し、C 末端領域と Leu108 を中心とするクラスターの間、ジスルフィド結合を導入したところ、折り畳み能が回復したことから、N 末端領域と C 末端領域に存在する疎水性クラスターの接触が、天然構造保持に関与する非局所的相互作用の実体であると結論した。

第 6 章では、これらの結果に基づき、折り畳み初期に、局所的な疎水性クラスターが形成し、クラスター間の非局所的相互作用による分子のコンパクト化によって、2 次構造形成が誘起されるとする、階層的疎水凝集モデルを提唱した。

以上のように、本論文では、SNase の構造形成における、非局所的相互作用の役割を明確に示し、新規の折り畳みモデルとして、階層的疎水凝集モデルを提唱するに至った。これは、蛋白質折り畳み研究において、局所・非局所的相互作用の依存関係に関する論争に明確に答えることに成功した重要な成果である。ここで明らかにされた構造形成機構は、蛋白質の折り畳み問題のみならず、蛋白質設計工学を実現にむけ、蛋白質科学広範に貢献するものである。

(論文審査結果の要旨)

蛋白質の立体構造は、水素結合等に代表される、近接するアミノ酸残基間で生じる相互作用(局所的相互作用)と、疎水凝集効果によって誘起されるアミノ酸配列上離れた残基間で生じる相互作用(非局所的相互作用)によって保持されている。これらの相互作用は、それぞれ、主に、2次構造形成、蛋白質分子のコンパクト化に関与しており、蛋白質の立体構造形成を考える上で、これらの相互依存関係を明らかにすることが本質的である。しかしながら、特に、非局所的相互作用の形成を直接観測する手法が存在しないため、これらの依存関係を明確に示した報告例はなかった。

本研究では、黄色ブドウ球菌由来核酸分解酵素 Staphylococcal nuclease (SNase)をモデル蛋白質として用い、非局所的相互作用として、ジスルフィド結合を人為的に導入した変異体の構造形成過程を解析することで、蛋白質の立体構造形成における非局所的相互作用の役割、局所的相互作用形成との依存関係を明らかにすることを目的としている。本論文で得られた成果は以下の通りである。

1. SNaseのC末端領域とN末端領域の間に、人為的な非局所的相互作用として、ジスルフィド結合を導入した変異体の溶液構造解析の結果、C末端領域とN末端領域の間に形成された非局所的相互作用が、天然構造形成に本質的であり、ジスルフィド結合によって、この相互作用は代用可能であることを示した。
2. 変性状態ですでに非局所的相互作用が存在する、ジスルフィド結合導入変異体の折り畳み反応を測定した結果、主要な2次構造形成が観測される、22ミリ秒以降の折り畳み反応が、野生型と同一の反応機構に従っていることを明らかにした。
3. 網羅的アラニン置換解析の結果、Leu108をアラニンに置換することで、折り畳み能が失われることを明らかにした。さらに、Leu108を中心とした疎水クラスターと、C末端領域間にジスルフィド結合を導入することで折り畳み能が回復することを見だし、N末端領域とC末端領域に存在する疎水性クラスターの凝集が、天然構造保持に関与する非局所的相互作用の実体であることを示した。
4. 以上の結果を踏まえ、折り畳み初期に、局所的な疎水性クラスター形成し、クラスター間の非局所的相互作用による分子のコンパクト化によって、2次構造形成が促進されるとする、階層的疎水凝集モデルを提唱するに至った。

以上のように、本論文では、SNaseの構造形成における、非局所的相互作用の役割を明確に示し、新規の折り畳みモデルとして、階層的疎水凝集モデルを提唱するに至った。これは、蛋白質折り畳み研究において、局所・非局所的相互作用の依存関係に関する論争に明確に答えることに成功した重要な成果である。ここで明らかにされた構造形成機構は、蛋白質の折り畳み問題のみならず、蛋白質設計工学を実現にむけ、蛋白質科学広範に貢献するものである。よって、審査委員一同は本論文が博士(理学)の学位論文として価値あるものと認めた。