

論文内容の要旨

博士論文題目 Folding mechanism of Staphylococcal nuclease
 - The role of C-terminal region
(スタフィロコッカル・ヌクレアーゼの折り畳み機構
 -C 末領域の役割)

氏 名 平野 聡

(論文内容の要旨)

蛋白質の立体構造が、一次構造であるアミノ酸配列によって一意的に決定されるメカニズムはいまだ解明されていない。この問題は折り畳み問題と呼ばれ、ポストゲノム時代のタンパク質研究の中心的課題となっている。本研究では、モデル蛋白質として *Staphylococcal nuclease* (以下 SNase) を用いて、アミノ酸配列中に記述された情報の解読、折り畳みのメカニズムの解明を目的とした。

SNase の C 末端の系統的欠損変異体 (C 末端 7-10 の欠損変異体) を作成し、それら変異体の溶液構造、酵素活性、安定性について評価した。その結果、142-149 の領域は、安定性を保つために必要であるが、構造形成の情報は含んでいないこと、141 番目の残基 (セリン) と 140 番目の残基 (トリプトファン) が構造保持のために必須な情報を含むことが示された。また、これらの位置の部位特異的置換から、構造形成の情報は、140 番目の残基の側鎖と 141 番目の主鎖に記述されていることが示された。

140 番目の側鎖に求められる性質について調べるために、W140 に対する可能なすべての置換変異体を作成し、構造、物性、機能を評価した。140 番目の残基の側鎖に芳香環を持つものだけが野生型様の構造と機能を示した。したがって、140 番目の側鎖には環状構造、特に N を含む 5 員環が要求されることが明らかになった。W140 は、その周辺の側鎖を束ねる中心的な役割を果たしている。その結果できあがる疎水クラスターが構造形成の際、一つの核になることが推定された。

欠損変異体が、阻害剤による誘導折り畳みを示すことから、C 末の欠損は、長距離相互作用を失っていると考えた。人工的なジスルフィド架橋の導入により、長距離相互作用を回復させれば、構造は形成されると仮定した。この仮説を確かめるため、W140 の側鎖を失った変異体 ($\Delta 140-149$ 及び W140A) の、54 部位と 139 部位にシステインを導入した。変性構造をとっていた変異体に、ジスルフィド架橋を導入することにより、二次構造と球状性を回復させることが出来た。この結果はドメイン間の長距離相互作用が SNase の構造形成を促進することを示すものである。

以上の結果から、SNase の折り畳み機構を以下のように推定した。W140 は、W140 を中心とする C 末端領域の疎水クラスター形成し、N 末端ドメインの別の疎水クラスターとの間の長距離相互作用を生み出す。この相互作用により SNase 全体がコンパクト化し、天然構造が形成する。

本研究により、構造形成に重要な情報は側鎖が担うだけではなく、主鎖が担う場合があることを示し、また、蛋白質の折り畳み過程においては、全体をコンパクト化させる長距離相互作用と、その長距離相互作用を形成する疎水クラスターの形成が重要であることが示された。これらは、全てのタンパク質の折り畳みに共通する性質であると考えられる。

(論文審査結果の要旨)

ゲノムプロジェクトの進展により、ヒトをはじめ多くの生物の遺伝情報が明らかにされてきている。これにより、生命の設計原理がわかり、ゲノム創薬やテーラーメイド医療が実現すると大いに期待されているところである。遺伝子があらわに決定しているのは、タンパク質のアミノ酸配列であるが、タンパク質は固有の立体構造を形成してはじめて、その固有の機能を発現する。したがって、遺伝情報を利用するためには、アミノ酸配列が立体構造を決定する原理を理解しなければならない。この原理の理解が、ポストゲノム時代のライフサイエンス研究の中でも中心的な課題となっている。

本論文では、このタンパク質折り畳み問題に対して、黄色ブドウ球菌核酸分解酵素 (SNase) をモデルタンパク質として、系統的欠損変異体および網羅的部位置換変異体の作成という独自の方法を用いて取り組み、以下の重要な結果を得た。

1. C 末の 8 残基は、安定性の向上に寄与しているが、折り畳み能および機能には関与していない。
2. 140 番目の残基は、側鎖情報が重要であり、トリプトファンが最適である。側鎖には、芳香族環を持つことが要求され、窒素を含む 5 員環構造が特に望ましい。
3. 141 番目の残基は、主鎖が重要であり、野生型のセリンである必要はない。
4. トリプトファン 140 は、C 末の疎水核を形成するために必須な残基である。C 末の疎水核が、N 末側ドメインの疎水核と長距離相互作用により、コンパクト化を促し、最終構造を獲得する。
5. 人工的なジスルフィド架橋により、疎水核間の長距離相互作用を代用できる。

これらの結果に基づき、SNase の折り畳み機構に関して、以下のモデルを提唱した。トリプトファン 140 を中心とする C 末疎水核形成および N 末ドメインのベータコア形成→両疎水核間の長距離相互作用によるコンパクト化→残基再配置による二次構造形成と最終構造の獲得。このモデルは、理論研究などから提唱されている核形成・凝縮モデルをより実体的にしたものであり、タンパク質折り畳み機構として一般化しうるモデルである。

本論文で、アミノ酸配列内での情報の記述は、主鎖に情報が書かれている場合、側鎖に情報が書かれている場合があることが明らかになり、また本質的情報を含まない部分があることも示された。この結果は、バイオインフォマティクスによる構造・機能予測の問題点を明確にした。また、系統的欠損変異体の構造、物性評価から、配列空間における構造形成は、二状態的であることを実験的に示すことにも成功している。

以上のように、本論文は、タンパク質折り畳み問題に本質的な貢献をしているばかりでなく、タンパク質の進化についても新たな視点を与えるものであり、学術上の価値が高い。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。