

論文内容の要旨

博士論文題目 Mechanism of induced folding of staphylococcal nuclease mutants

(スタフィロコッカルヌクレアーゼ変異体の誘導折り畳み機構)

氏名 鬼塚 正義

(論文内容の要旨)

蛋白質の生理的機能発現のためには、固有の高次構造が必要であるとされている。しかし近年、天然変性蛋白質 (IDP) と呼ばれる生理的条件下で高次構造を有さない機能性蛋白質が多数発見されている。IDP は標的(リガンド)と結合する事により高次構造へ折り畳まれる誘導折り畳み(Induced folding)という現象を示す。また、蛋白質による分子認識においても、誘導折り畳みは重要な役割を果たすにもかかわらず、その反応機構は明らかにされていなかった。本研究では、生理的条件下で構造を有さないにも関わらず核酸分解活性を保持しているスタフィロコッカルヌクレアーゼ (SNase) の変異体を用いて、阻害剤による誘導折り畳み機構を研究し、その機構を明らかにしたものである。

第1章では、研究の背景及び研究目的が述べられている。

第2章では、 $\Delta 140-149$ 及び 33A34 を用いた誘導折り畳み機構の解析について述べている。阻害剤誘導折り畳みのストップフローCDによる速度論的測定を行い、阻害剤濃度依存性を調べた。 $\Delta 140-149$ では、明確なバースト相が観測され、バースト相強度は阻害剤濃度に依存した。33A34 では、阻害剤濃度にかかわらずバースト相は観測されなかった。緩和時間の阻害剤濃度依存性も両者で異なっていた。次の二つの反応機構を仮定して、反応方程式を解析に解いた。



その結果、33A34 は (1) の機構に従い、 $\Delta 140-149$ は (2) の機構に従うことを示した。また、様々な波長でのバースト相強度から求めたバースト相のCDスペクトルから、DL複合体の形成を明瞭に示している。

第3章では、 $\Delta 140-149$ の DL 複合体の構造的特徴を、 Φ 値解析を用いて明らかにしている。解析の結果、DL 状態においてリガンド結合部位以外の領域は低い Φ 値($\Phi_{DL} = 0.0-0.4$)を示し、変性構造を取っていること、リガンド結合部位は相対的に高い Φ 値($\Phi_{DL} > 0.4$)を持つが天然構造は形成されておらず、天然構造様の空間配置 (トポロジー) が実現していることを示している。また、遷移状態では DL 状態に比べ、全体的に Φ 値が上

昇し、構造形成が進んでいることを明らかにしている。以上のことから、DL 状態は確かに変性構造に阻害剤が結合していることを結論している。

第4章では、これらの結果に基づき、33A34 は(1)の機構に、 Δ 140-149 は(2)の機構に従う原因を考察している。

以上のように、蛋白質科学の分野で、これまでありえないとされていた(2)の機構が実在することを示した。これは世界で2例目になる。また、一つの蛋白質の単純な変異で二つの異なる機構を実現することを示した。これは世界で初めての成果である。ここで明らかにされた誘導折り畳み機構は、IDP や蛋白質構造形成機構の理解に重要であるのみならず、分子認識機構や分子進化機構の理解など蛋白質科学や生物学の広い範囲に貢献するものと考えられる。

(論文審査結果の要旨)

蛋白質の生理的機能発現のためには、固有の高次構造が必要であるとされている。しかし近年、天然変性蛋白質 (IDP) と呼ばれる生理的条件下で高次構造を有さない機能性蛋白質が多数発見されている。IDP は標的(リガンド)と結合する事により高次構造へ折り畳まれる誘導折り畳み(Induced folding)という現象を示す。また、蛋白質による分子認識においても、誘導折り畳みは重要な役割を果たすにもかかわらず、その反応機構は明らかにされていなかった。誘導折り畳みには、折り畳みと結合の二つの素過程が存在する。この順序により $D+L \leftrightarrow F+L \leftrightarrow FL$ (Folding before binding) と $D+L \leftrightarrow DL \leftrightarrow FL$ (Binding before folding) の二つの機構が考えられるが、これまで後者はありえないとされてきた。

本研究は、生理的条件下で変性構造にあり、酵素活性を有する黄色ブドウ球菌核酸分解酵素(SNase)の変異体、 $\Delta 140-149$ 及び 33A34 を用いて、阻害剤誘導折り畳みの分子機構を明らかにしたものである。本論文で得られた成果は以下の通りである。

1. 上述の二つの反応機構に基づき、反応方程式を解析的に解き、リガンド濃度を変えた速度論的測定から両機構を識別できることを明らかにした。
2. 阻害剤濃度に依存したストップフローCD による測定から、 $\Delta 140-149$ は装置の不感時間内に構造形成するバースト相が観測され、バースト相強度は阻害剤濃度に依存するが、33A34 では阻害剤濃度にかかわらずバースト相は観測されないことを示した。バースト相は DL 複合体の形成を表わし、その構造は変性構造とも天然構造とも異なる独立の構造状態であることを示した。
3. 1 の結果を適用し、33A34 は Folding before binding、 $\Delta 140-149$ は Binding before folding 機構に従うことを示した。
4. Φ 値解析から、 $\Delta 140-149$ の DL 複合体の構造を明らかにした。阻害剤結合部位は天然構造様の空間配置 (トポロジー) を形成しているが、それ以外は変性構造であること、折り畳みの遷移状態でさらに構造形成が進むことを示した。

以上のように、本論文では IDP のモデルとなる SNase 変異体を用い、誘導折り畳み機構を解析した。その結果、Folding before binding と Binding before folding の両機構が実現することを示した。特にこれまでありえないとされていた Binding before folding 機構を実証したのは世界で2例目であり、全長の蛋白質については初めての例である。また、一つの蛋白質の単純な変異で二つの機構をともに実現できることを示したのは世界で初めてである。これらの成果は、IDP や蛋白質折り畳み機構の理解のみならず、蛋白質の分子認識機構、蛋白質の分子進化など蛋白質科学、生化学、生物物理学等広汎な科学分野に貢献する質の高い先駆的な研究と高く評価でき、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 (理学) の学位論文として価値あるものと認めた。