

氏 名 春 田 奈 美

学位（専攻分野） 博士（理学）

学 位 記 番 号 総研大甲第550号

学位授与の日付 平成13年9月28日

学位授与の要件 数物科学研究科 機能分子科学専攻

学位規則第4条第1項該当

学 位 論 文 題 目 Ultraviolet Resonance Raman Studies on Myoglobin

Dynamics:Ligand Binding and Protein Folding

論 文 審 査 委 員 主 査 教授 岡本 裕巳
教授 北川 禎三
助教授 加藤 立久
助教授 田原 太平
教授 後藤 祐児（大阪大学）

紫外共鳴ラマン分光法によるタンパク質の構造変化の解明

タンパク質の機能発現に不可欠な三次構造がどのようにして組み立てられ、機能発現にあたってどのような構造変化が起こるのかを、紫外共鳴ラマン分光法 (UVRR) を用いて調べた。

244 nm 励起の UVRR 分光法では芳香族アミノ酸残基であるトリプトファン (Trp) 残基とチロシン (Tyr) 残基由来のバンドが選択的に検出される。ミオグロビン (Mb) 一分子あたり Trp 残基が2残基、Tyr 残基はマッコウクジラ由来で3、ウマ由来で2残基含まれる。これらの残基をタンパク質の構造変化のプローブとしてリガンド結合及びタンパク質の折れ畳み反応に伴う構造変化を追跡した。両残基とも幾つかのバンドが現れるが、特に Trp 残基では、W3 バンドと W7 バンドの、Tyr 残基では Y9a バンド($1170-1180\text{ cm}^{-1}$) の変化に注目した。 $1560-1550\text{ cm}^{-1}$ に現れる W3 バンドは側鎖の二面角と振動数に良い相関があり、側鎖構造の情報を与える。一方、W7 バンドは、フェルミ共鳴によって 1360 cm^{-1} と 1340 cm^{-1} 付近に二つに分裂しており、その強度比 (I_{1360}/I_{1340} , R 値) は非極性環境下だと1より大きく、極性環境下であると0.5 近くまで減少するため、Trp 側鎖の環境変化を見積もる指標とした。

リガンド結合に伴うミオグロビンの構造変化

マッコウクジラ由来 Mb の五配位還元型と六配位 CO 結合型の UVRR スペクトルを比較すると、W3 バンドの強度変化及び Y9a バンドの低波数シフトが観察され、分子量17,000の単量体タンパク質である Mb においてもリガンド結合に伴う構造変化があることが明らかになった。二つある Trp 残基をそれぞれフェニルアラニン (Phe) に置換した変異体、W14F, W7F を作成した。それを用いて、変化のあった Trp 残基を同定したところ、N末端に近い7番目の Trp 残基の環境及び構造が変化していることが示唆された。一方、ウマ由来の Mb では W3 バンドの変化は同様にあったものの、Y9a バンドの変化はみられなかったことから、Tyr バンドの変化は、マッコウクジラにのみある Tyr151 由来の変化であると帰属した。

結合ポケット側に変化を与えるかさ高いリガンドの結合した n-ブチルイソシアニド結合型でも CO 結合型と同じ変化を示したことから、リガンド結合に伴うタンパク質の構造変化が、ヘムの五配位型から六配位型への変換が最も大きな構造変化の要因と考えられた。これは、ヘム鉄と共有結合している軸配位子の近位ヒスチジン (His) 側から構造変化が誘起され、一方で、遠位 His の動きは局所的なものであると結論した。

遠位 His の変異体 H64Y、F46V/H64Y の性質

遠位 His とその周辺のヘムポケットを形成する残基は、二原子分子の親和性に大きく関与している。この遠位 His を Tyr 残基に置換した H64Y 変異体は自動酸化速度が非常に早く、64 番目の Tyr 残基がヘム鉄に配位していることが指摘されていた。実際、244 nm 励起の UVRR 測定によって Tyr 残基のプロトンが解離してチロシネート (Tyr^-) として配位していることが明らかになった。F46V/H64Y 変異体は H64Y よりも高い pH で鉄から外れるが、これは遠位側残基の動き易さに起因するものと考えられた。

アポミオグロビンの酸変性過程

アポミオグロビン(apoMb) は、速度論的な後期の巻き戻り中間体が、平衡条件下でも比較的安定に存在することが知られており、中間体の構造はタンパク質の構造形成を知る上で重要な情報となる。そこで酸性側 (pH 5.5-1.9) の各 pH で平衡状態にあるアポミオグロビン(apoMb) の UVRR スペクトルを測定し、その酸変性過程を追跡した。W3 バンドは三状態変化を示し、先に変異体から求めた Trp7 と Trp14 の天然状態と、完全な変性状態での波数から、中間状態のスペクトルを抽出した。その結果、pH 4 以上では天然状態と中間状態の二状態変化でその中点は pH 4.5、pH 4 以下では中間状態と変性状態の二状態変化と考えられ、その中点は pH 3.5 であった。この結果は、疎水性環境から親水性環境への変化を示す W7 バンドの強度比(R 値)の減少曲線とも一致した。これらの結果から、pH 4 付近の平衡中間体では、すでに骨格がランダム構造になっていて、Trp7 は外に露出していることが示唆された。一方、Trp14 はまだ天然状態と同程度の疎水性環境下に埋もれていることが分った。W3 バンドの波数から、中間状態での Trp14 の側鎖の配向は、何らかの構造制約を受けているが、天然状態とは異なることが示唆された。

サブミリ秒時間領域でのアポミオグロビンの巻き戻り過程

紫外共鳴ラマン分光法に、連続フロー型高速混合装置を組み合わせ、数百マイクロ秒から数ミリ秒時間領域での apoMb の酸変性からの巻き戻り反応を追跡した。W7 バンドと W3 バンドの変化から、大きく分けて 3 種の中間体が存在することが示唆された。1 つ目は、測定時間限界の 250 マイクロ秒よりも早く形成するが、その状態で W3 バンドは平衡論的の中間体と同程度の波数シフトを示すもののまだ極性環境下にある状態で、Trp14 が局所的な相互作用を受けたものと推測された。最も考えられる可能性は、Trp14 が位置する A ヘリックスの形成であり、その後の中間体で W3 バンドがシフトしなかったことから、平衡中間状態において Trp14 は非特異的な疎水性相互作用をしてタンパク質内部に埋もれているものと考えられる。2 番目に現れる中間体の時定数はおよそ 400 マイクロ秒で一時的に疎水性環境が高まった状態である。この時 Trp14 同様 Trp7 も一時的にタンパク質内部に埋もれており、タンパク質全体が大きな疎水性コアを形成しているものと考えられる。最後に、約 3 ミリ秒の時定数でやや極性環境に戻るが、これは pH 4 の平衡中間状態に近い。この後期の中間体から、完全な天然状態への変化は非常に遅く律速段階となっている。

モデルペプチドのヘリックス形成に伴う Trp 側鎖構造への影響

α ヘリックスの形成に伴い、Trp側鎖の構造を反映する W3 バンドがシフトをするのかどうかを調べるために、19 残基からなる A ヘリックスのモデルペプチドを用いた測定を行った。このペプチドは、水溶液中ではランダムコイル構造をしているが、アルコールの添加によりヘリックス構造形成が誘起される。そこで、遊離の Trp とペプチドについて、アルコールの非存在下と存在下での W3 バンドを比較した。その結果、骨格鎖の α ヘリックス形成が Trp 側鎖に影響を与え、W3 バンドにシフトが起こることが実証された。これは、apoMb の巻き戻りでの早期中間体で W3 バンドがシフトするのは A ヘリックスが形成したためであるという考察を支持する結果である。

論文の審査結果の要旨

本論文は英文で書かれた150ページのもので3章からなる。第1章は研究のバックグラウンドの説明、第2章はミオグロビンへのリガンド結合による蛋白部分の構造変化、第3章はアポミオグロビンのフォルディングの構造化学、である。第2章は既に一流の国際誌に印刷され、第3章も国際誌に投稿中と記されている。

第1章は蛋白質ダイナミクスとそれを研究する方法としての紫外共鳴ラマン分光法についての説明が主である。本研究でとりあげるミオグロビン(Mb)へのリガンド結合による蛋白構造の変化が生理学的にもつ意味を、色々な機能をもつヘム蛋白質の性質との関連において記述しており、自分の研究の位置を十分把握して研究を進めていることが読み取れる。また本研究に用いる実験テクニックを説明しており、その特色を十分生かした研究展開をしたいという意図が理解できる。

第2章は遺伝子操作による蛋白質の部位特異的アミノ酸置換法と244nm励起の共鳴ラマン分光法とを組合せ、リガンド結合によるグロビンの構造変化を明らかにしようとするものである。トリプトファン(Trp)とチロシン(Tyr)のラマンバンドが共鳴励起されるので、まずマーカースペクトルの性質をモデル化合物の溶媒効果で調べた。次にW7F及びW14Fミュータント各々でTrp14及びTrp7のスペクトルを同定した後、リガンド結合によるそれらのバンドのスペクトル変化が何を意味するかについて考察した。またクジラMbとウマMbとの比較から、Tyr151がリガンド結合により露出されるようになる事を見出した。ヘムポケット内の要となる残基をチロシンに置換して、そのTyrのリガンド結合によるスペクトル変化と、蛋白質表面にあるTrp7のスペクトル変化の関係を調べた。明確な相関が見つからない事から、ヘム鉄へのリガンド結合は、リガンド結合側ではなくてヘムの反対側のトランスリガンドである近位ヒスチジンを通して分子表面に伝達されると結論している。また二重アミノ酸置換の蛋白質も用意して、それらの残基がリガンド結合の際に果していると思われる役割についても議論している、この章だけでも1つの十分興味深い研究成果である。

第3章は蛋白質の酸変性を平衡論的に追跡した部分と、新しい高速混合フローセルシステムを自分で製作して、酸変性状態の蛋白を中性にして巻き戻る過程をマイクロ秒の時間刻みで紫外共鳴ラマン分光スペクトルを観測したという、国際的にも新しくオリジナリティの高い研究成果である。完全に酸変性してほどけたU状態から、I1, I2, I3という3つの中間体を経た後本来のN状態になり、I1→I2が0.4ms, I2→I3が3msの時定数で変化し、U→I1は0.25msより短く、またI3→Nは秒オーダーであると記してある。各状態のスペクトルの解析は、第2章で決めたTrp7とTrp14のスペクトルが基礎になっており、その意味で第2章の上に立った第3章であるが、議論していることは蛋白質のフォルディングという全く別の現象である。この分野では初めてのタイプの実験方法であるが故に、ここで得られた結論が同分野の専門家に受け入れられるかどうかは現段階では未知であるが、それ程ユニークでオリジナルな成果といえる。

このように本論文は、レベルの高さ、オリジナリティ、量のいずれ観点から見ても学位論文レベルは十分超えていることで審査員全員の意見が一致した。

口述試験は1時間の発表、2時間の質疑応答として実施した。

申請者は学位論文の内容を1時間でわかりやすく説明した。蛋白質の折れたたみ機構に関して、「本研究で得られた結論がどれだけ一般性をもつものであるか」といった質問に対する返答から、自分の研究成果の意義と限界についてはよく理解していることがわかった。とくに折れたたみ初期段階に対して提出されている一般モデルと本研究の結論との関係や、ファネルモデルと反応座標モデル

との関係など、難しい質問に十分に対応していた。この討論から、申請者がよく文献を読み、自分のテクニックの特色を十分生かす事を自分で考えて研究を進めている事がわかった。論文は分かりやすい英語で書かれており、アメリカで英語でセミナーをした経験もあるので、語学力は十分と判断した。従って、口述試験は合格という事で委員全員の意見が一致した。公開発表では予定時間内に論文内容をわかりやすく説明し、質問に対して正しく応答した。