

氏 名 今 井 隆 志

学位（専攻分野） 博士(理学)

学 位 記 番 号 総研大甲第450号

学位授与の日付 平成12年3月24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 水溶液中における生体分子の安定性に対する統計熱力学的研究

論 文 審 査 委 員 主 査 教 授 中村 宏樹
教 授 平田 文男
助 教 授 青柳 睦
助 教 授 平等 拓範
教 授 野村 浩康（名古屋大学）

論文内容の要旨

タンパク質の安定性は溶媒、温度、圧力、共存溶質（変性剤、酸・塩基、塩）などの熱力学条件に敏感である。それら熱力学条件がタンパク質の安定性に与える影響を明らかにすることは、それ自体興味深い上、タンパク質の立体構造構築原理を解明する上でも非常に重要である。それらに関する実験的研究は古くから行われているが、理論的研究、特に、分子論的研究は極めて限られているのが現状である。本研究では、このうち塩効果と圧力効果について RISM 積分方程式理論（分子性液体の統計力学）を用いて考察した。

1：水溶液中におけるペプチドの安定性に対する塩効果

水溶液中におけるタンパク質の安定性に対する塩効果のイオンによる違いは Hofmeister 順列として知られている。Hofmeister 順列はタンパク質だけでなく非極性分子を含む様々な分子に対して成り立つ一般性の高い規則である。しかし、その分子論的解釈はいまだ行われていない。本研究では、Hofmeister 順列を分子論的に解釈するため、RISM 積分方程式理論を用いて、アルカリハライド（LiCl, NaCl, NaBr, NaI, KCl）溶液中でのペプチドの溶媒和自由エネルギーやペプチドのまわりの溶媒和構造を調べた。以下に得られた知見をまとめる。

○ペプチドの溶媒和自由エネルギーに対する塩効果

ペプチドの溶媒和自由エネルギーに対する塩効果を疎水的効果と静電的效果、さらにそれらをイオンからの直接的な寄与と水の構造変化を介した寄与にわけることにより以下の結論を導き出した。イオンは溶質の疎水的溶媒和と静電相互作用の両方に影響を及ぼすが、静電相互作用に対する効果は各寄与が打ち消すことにより塩効果としてほとんど現れてこず、溶質の疎水的溶媒和に対する効果が塩効果として前面に現れてくる。それは、塩効果が溶質の持つ静電的な特徴に依存しないということであり、Hofmeister 順列が様々な分子に対して成り立っている理由であると考えられる。また、Hofmeister 順列は水の構造変化を介した効果の順序とイオンからの直接的な相互作用の順序のバランスにより決まると言える。アニオンの場合は、水の構造変化を介した効果の方が支配的であるため、Hofmeister 順列はイオンによる水の構造変化を介した疎水的効果の順序により決まっている。カチオンの場合は両者が同程度の寄与をする。

○ペプチドのまわりの水和構造に対する塩効果

イオンの影響によりペプチドのまわりの水和構造がどのように変化するかを説明するために、次の3つのモデルを構築した。

「正水和効果」：イオンとペプチド原子の電荷が異符号の場合、イオンに水和した水分子がイオンと共にペプチド原子に引きつけられ、そのペプチド原子のまわりの水分子の分布が増加する。イオンとペプチド原子の電荷が同符号の場合、イオンに水和した水分子がイオンと共にペプチド原子に反発され、そのペプチド原子のまわりの水分子の分布が減少する。正水和イオン（今回用いたイオンの中では Li^+ , Na^+ ）がこの効果を期待される。

「負水和効果」：イオンがまわりの水分子の氷様構造を破壊し、まわりの水分子の密度を増加させる。それに伴い、そのペプチド原子のまわりの水分子の分布が増加する。負水和イオン（今回用いたイオンの中では K^+ , Cl^- , Br^- , I^- ）がこの効果を期待される。

「イオン交換効果」：イオンが静電相互作用によりペプチド原子に強く引きつけられる時、

そこにいた水分子と交換し、そのペプチド原子のまわりの水分子の分布が減少する。溶質サイトと強く相互作用するすべてのイオンがこの効果を期待される。

2：水溶液中におけるアミノ酸、ペプチドの部分モル体積

化学反応の平衡（速度）に対する圧力効果は反応物と生成物（遷移状態）の部分モル体積差と密接に関係している。それゆえ、タンパク質の圧力変性を議論するには、タンパク質の天然状態と変性状態の部分モル体積を知ることが必要である。本研究では、多原子分子の部分モル体積を理論的に計算するため、Kirkwood-Buff理論とRISM理論を組み合わせて定式化を行った（RISM-KB理論）。そして、それをタンパク質の構造単位であるアミノ酸とペプチドに応用した。以下に、その結果をまとめる。

○構造揺らぎによる理想体積

部分モル体積の理論値は対応する実験値と比較すると系統的な差を含んでいる（系統的に小さく見積もる）ことがわかった。その差は溶質の分子量（あるいは原子数）や温度におおよそ比例する。それは、RISM-KB理論では考慮されていない溶質の構造に関する自由度からくる理想項の寄与（構造揺らぎによる理想体積）であることを示唆している。

○アミノ酸の部分モル体積

アミノ酸の末端基や側鎖の解離基の解離は数 cm^3/mol の部分モル体積の減少を伴うことがわかった。一方、部分モル体積に対する部分電荷の寄与は負にはならず、いくつかの例外を除いて若干正になることがわかった。また、原子や官能基の部分モル体積はそれらがおかれている環境に大きく依存することがわかった。このことは、分子の部分モル体積をその成分である原子や官能基の経験的な部分モル体積の足し合わせにより計算するという伝統的な方法は信頼性が低いことを示唆している。

○ペプチドの部分モル体積の構造依存性

モデルペプチドの自由エネルギーと部分モル体積の二面角依存性を調べた。それらを用いて（このモデル系においては）常圧ではより伸びた構造が最安定であるが、圧力をかけることにより、よりコンパクトな構造を持つ他の極小エネルギー状態に遷移することを示した。自由エネルギー曲面あるいは反応経路さえ分かれば、タンパク質の圧力変性を含む一般的な反応（構造変化）に対して同様の議論を行うことができる。

論文の審査結果の要旨

本博士論文は、液体の統計力学の手法、特にRISM(Reference Interaction Site Model：参照相互作用サイトモデル)積分方程式理論に基づき、(1)水溶液中におけるペプチドの安定性に対する塩効果に関するHofmeister順列を分子論的に解明したこと、及び(2)タンパク質の圧力変性を議論する基本として、水溶液中におけるアミノ酸とペプチドの部分モル体積を評価したことから成っている。

先ず、塩効果については、タンパク質のみならず様々な中性分子の溶解度の大小が分子によらず塩イオンによって決まっているとHofmeister順列を、RISM理論に基づく大型計算を実行しアルカリハライド(LiCl, NaCl, NaBr, NaI, KCl)溶液中での溶媒和自由エネルギーや溶媒和構造を調べて始めて分子論的に解明し、塩効果を静電的效果と疎水的効果に分けてHofmeister順列を決めているのが疎水的効果である事を突き止めた。更に、イオンの影響によるペプチドの回りの水和構造の変化を説明する為に、「正水和効果」、「負水和効果」、及び「イオン交換効果」の3つのモデルを提唱し、様々なイオンを分類する事に成功した。「正水和効果」とは、イオンとペプチド原子の電荷の符号によって、イオンに水和した水分子がイオンと共にペプチド原子に引き付けられ水分子の分布が増加したり、逆にペプチド原子から反撥されて水分子の分布が減少する事を言う。Li⁺, Na⁺, F⁻等のイオンがこれに属する。「負水和効果」はイオンが回りの水分子の氷様構造を破壊して水分子の密度を増加させる。大きなイオン、K⁺, Cl⁻, Br⁻, I⁻等がこれに属す。「イオン交換効果」とはイオンが静電相互作用によりペプチド原子に強く引き付けられ水分子と置き換わる事により、ペプチド回りの水分子の分布を減少させる効果を言う。溶質との強い相互作用をもつイオンがこれに属す。

化学反応の平衡状態に対する圧力効果を理解するには、分子の部分モル体積を知る必要がある。従来から用いられている、個々の原子団の部分モル体積の経験値を用いた重ね合わせの方法の妥当性を調べる事、および、解離基の部分モル体積への効果を調べる目的で、ここでもRISM理論に基づき分子論的な解析を行った。先ず、Kirkwood-Buff(KB)理論とRISM理論を組み合わせる定式化を行い、それを用いて再び大規模な計算を実行し20種類の天然アミノ酸の部分モル体積を評価し実験と比較した。実験との定性的に良い一致を得ると共に、両者の間に現われる系統的差がRISM-KB理論では考慮されていない溶質の内部自由度から来る理想項への寄与である事を明確にした。また、アミノ酸の部分モル体積が両性イオン型の電荷を持つ事により減少する事を見出した。分子内の部分電荷は部分モル体積に対して大きな効果を与えない事も明らかにした。更に、原子団の部分モル体積への寄与は同じ原子団であってもその置かれている環境によって大きく変化し、従って、一定の経験値を用いた重ね合わせの方法は成り立たない事を明確に示した。

以上の通り、本博士論文はタンパク質の機能を解明する上で基本となるタンパク質の安定性に関して、その圧力及び塩効果をRISM理論を用いて分子論的に始めて解明したものであり高く評価される。RISM理論自身は既存の理論であるが、これをタンパク質の様な大きな分子のしかも塩を含んだ水溶液に適用し大規模計算を行い得た事は、この分野の研究に大きな突破口を開いたものと評価される。論文は日本語で書かれているが、要約の英語及び発表済の英語論文等から英語の能力も十分であると判断される。論文内容は3報の英語

論文として纏められており、内2報は掲載ないしは掲載可となっている。

以上から、本論文は博士論文として十分であると、審査委員全員の意見が一致した。