

Title	タンパクシツ ノ アンテイ セイ
Author(s)	ユタニ, カツヒデ
Citation	大阪大学低温センターだより. 94 p3-p.8
Issue Date	1996-04
oaire:version	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/10265
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

蛋白質の安定性

蛋白研 油谷克英(内線8615)

E-mail: yutani @ protein.osaka-u.ac.jp

1. はじめに

生体にとって最も重要な構成成分の一つが蛋白質である。その蛋白質は20種のアミノ酸がペプチド結合によってつながってできている一本の分子鎖である。このペプチド鎖のアミノ酸の配列順序によって、特有な立体構造が形成される。この特有な立体構造が蛋白質の種々の機能発現に関わっている。蛋白質の安定性とはその特有な機能を持つ立体構造の安定性である。立体構造が破壊されれば、機能は消失する。機能の土台となる立体構造の安定性のメカニズムを知ることは蛋白質研究の基本課題である。

機能を保持している蛋白質の状態をN状態(Native state)と呼び、変性している状態をD状態(Denatured state)と呼んでいる。D状態はN状態に対比させて、機能のない状態を指すのであるが、一般には特有な立体構造が破壊された状態である。立体構造の破壊は分光学的手法によって確認できるが、D状態の構造に関してはホットな話題で、今日ではランダムコイル状態ではないとされている。水溶性球状蛋白質の場合、熱を上げたり、変性剤濃度を高めると蛋白質は機能とともに立体構造が破壊される。機能を指標にした場合も構造を指標にした場合も同じ変性曲線の上に重なることが多い。また、温度を下げたり、変性剤濃度を希釈すると機能と構造は回復し、それらを変性曲線の上に重ねることができる。つまり、蛋白質の変性は可逆的であり、2状態(NとD状態)間で平衡にある。天然状態ではN状態が優り、熱とか変性剤の過酷な条件ではD状態が優っている。

つまり、平衡関係(1)式が成立すると仮定できる。その安定性の量的尺度である、変性のギブスエネルギー変化、 $\Delta G(=G_d - G_n)$ は2式で表わされる。



$$\Delta G = -RT \ln K = \Delta H - T \Delta S \quad (2)$$

ここで、 $K(=[D]/[N])$ は(1)式の変性反応の平衡定数である。エントロピー項 $\Delta S(=S_d - S_n)$ は、真空中ではD状態はN状態に比べはるかに多くの数のコンホメーションをとるため大きな正の値となるが、水中では水和のエントロピーで相殺され、生理的条件下ではゼロに近い。また、 ΔH に寄与するのは多くの蛋白質内の非共有結合(ファンデルワールス相互作用、水素結合、疎水的相互作用など)である。しかし、この項も、水中では、水和の寄与と相殺されて、結局、僅かな値となる。結果的に、 ΔG はすぐ後に述べるように非常に低い値となる。

僅かなエネルギーバランスとなった結果を、比較的に大きな値を持つ多くのファクターの中から説明しなければならないところに、蛋白質の立体構造安定化のメカニズムを理解することの困難さがある。ここでは、私達がどのようにして蛋白質立体構造の安定化機構の研究を進めているかについて述べる。

2. 一残基置換で安定性は著しく変化する

球状蛋白質の生理的条件(水中で中性pH、25℃付近)での ΔG は20~60kJ/molの範囲内にはいることが知られている。蛋白質の立体構造は、このような僅少のエネルギーバランスによって保たれているので、Marginal Stableと呼ばれている。40kJ/mol程度のエネルギーは、非共有的相互作用による安定化エネルギーの数モル分に相当する。このことは、例えば、1本の水素結合の欠如によって、 ΔG が数十%も低下することを示唆している。実際、一残基置換によって安定性が著しく変化した例は多くある。トリプトファン合成酵素 α サブユニットの分子内部にある49位Gluを一連のアミノ酸に置換した変異型のpH7、

25℃での ΔG を野生型と比較する(表1)と、最も安定な変異型(E49I)の値は野生型の1.9倍も高く、最も不安定な変異型(E49Q)は野生型の0.7倍に低下している^{1, 2)}。 α サブユニットの分子量は29000、残基数は268である。1/268の変化で、本蛋白質の安定性を約2倍に高めたことになる。他の蛋白質では、一残基の変化で安定性を半分以下に低下させた例もある。このように蛋白質がMarginal stableであり一残基の置換で安定性を著しく変化させるので、立体構造の安定化機構の研究にとって変異(アミノ酸置換)蛋白質の利用は大変有効である。

49位の残基	ΔG (水中) (kcal/mol, 25°C)		49位の残基	ΔG (水中) (kcal/mol, 25°C)	
	pH7.0	pH9.0		pH7.0	pH9.0
Gly	7.1	6.4	Lys	7.9	7.5
Ala	8.5	6.8	Asn	8.2	6.2
Val	12.0	9.4	Gln	6.3	8.5
Ile	16.8	10.0	Asp	8.5	7.0
Leu	15.0	12.2	Glu	8.8	4.9
Pro	8.2	6.9	Cys	11.0	8.3
Tyr	8.8	6.8	Met	13.3	8.4
Phe	11.2	8.3	Thr	8.8	7.0
Trp	9.9	5.7	Ser	7.4	8.0
His	10.1	9.2			

表1. 蛋白質の安定性が一残基置換で著しい影響を受ける具体例。大腸菌トリプトファン合成酵素 α サブユニットの野生型と49位Gluを置換した18種の変異型の水中での変性のギブスエネルギー変化(ΔG)。野生型の49位Gluである。

3. 蛋白質の安定化に寄与する因子

天然のタンパク質は、そのN状態を安定化する因子と不安定化する因子、そして、D状態を安定化する因子と不安定化する因子の総和が僅かにN状態を安定化しているに過ぎない。それらの安定化因子はN状態とD状態の両方に影響する。そのため、N状態への安定化因子がD状態にどのように寄与するかを見きわめないと、その因子が生理的条件下でタンパク質を安定化させているかどうか分からない。それらの因子が結果的にどのように寄与しているかは立体構造上またはアミノ酸配列上の周辺残基との関連できる。これらのミクロな環境が互いに相互作用して、N状態の構造は保たれている。蛋白質の安定性を高めるルールとしては、①分子内部の疎水性相互作用の強化、②水素結合、塩結合の導入、③2次構造(α ヘリックス、 β 構造)の強化、④金属イオン(Caイオンなど)の導入、⑤変性状態のエントロピーの減少(SS結合、Pro置換)、⑥不安定化因子の除去、などがあげられる。しかし、これらの安定化因子の導入が、新たな不安定化要因となることもある。どの様な構造上の特徴を備えていれば安定化因子が不安定化要因とならないで実質的に蛋白質を安定化させられるのか。このことについてはまだ分かっていない。

4. 立体構造の安定化に果たす疎水性残基の役割

ヒト・リゾチームはアミノ酸残基数130からなる比較的小さい酵素蛋白質である。この蛋白質は、①アミノ酸置換蛋白質の作製法が確立されている。②熱変性の可逆的条件が確立されており、熱測定に最適である。③変異型の結晶が容易にでき、変異型のX線結晶構造解析が可能である。などの特徴を備えている。私達はこの蛋白質の系統的でかつ網羅的な変異型を作製し、各変異型について熱測定によって変性の熱力学的パラメータを求めると共に変異による構造変化をX線結晶解析によって明らかにしている³⁻⁷⁾。得られた結果から、個々のアミノ酸残基が立体構造の安定化にどのような役割を果たしているかを明らかにしようとしている。

ここでは、安定性を高める因子の一つである疎水性相互作用に関する研究例を示す。蛋白質を構成するアミノ酸残基の中で、非極性の疎水性残基はかなりの割合を占めている。水中ではこれらの疎水性側鎖が水との接触を避けて互いに蛋白質分子内部に凝集する。これらの疎水性相互作用が蛋白質分子の立体構造安定化の重要な因子である。疎水性相互作用に果たす疎水性残基の役割を明らかにするために、ヒト・リゾチームに5個あるイソロイシンからメチル基を一つ欠いたバリンに置換した5種の変異型と、9個あるバリンからメチル基を二つ欠いたアラニンに置換した9種の変異型を部位特異的アミノ酸置換法で作製した。図1に変異型ヒト・リゾチームの示差走査熱量計(DASM4)によって得られた典型的な熱変性曲線を示す。熱容量曲線の面積から熱変性温度(Td)での変性のエンタルピー(ΔH(Td))、熱転移前後の比熱(Cp)の差から変性に伴う比熱変化(ΔCp)を求めることができる。つまり、この熱容量曲線から得られたデータを基に、次式によって変性の熱力学的パラメータの温度関数を求めることができる。

$$\Delta H(T) = \Delta H(T_d) - \Delta C_p(T_d - T) \quad (3)$$

$$\Delta S(T) = \Delta H(T_d)/T_d + \Delta C_p \ln(T_d/T) \quad (4)$$

$$\Delta G(T) = \Delta H(T) - T\Delta S(T) \quad (5)$$

ここでは、20~80℃での実験結果をもとに、ΔCpは温度変化しないと仮定している。表2に65℃での14種の変異型の変性の熱力学的パラメータを示す。

5種のイソロイシンはいずれもほとんど完全に分子内部に埋もれているが、置換部位によって安定化への寄与の程度が異なることを示している。変性温度にして、-1.1から-3.6℃の範囲で変化している⁶⁾。I56V(56位のイソロイシンがバリンに置換した変異型)とI59V変異型の変性温度は類似しているが、変性のΔHは大幅な差が見られた。このことは同程度の安定性の低下をきたす変異型でも変性のメカニズムが異なることを示唆している。バリン変異型の場合は構造上多岐にわたっているため同じ種類のアミノ酸置換に関わらず熱力学的パラメータの変化

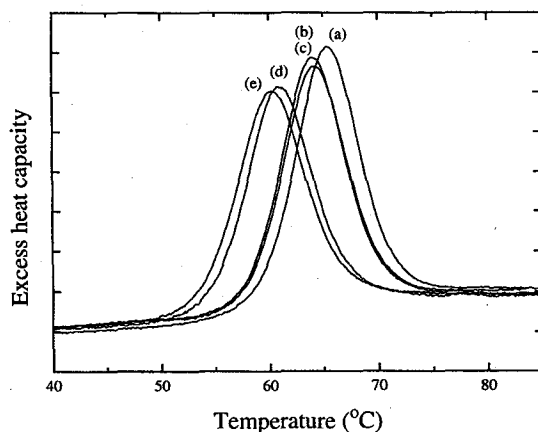


図1. 示差操作熱量計で求めた典型的なヒト・リゾチームの野生型と変異型の過剰熱容量曲線。(a):野生型、(b):V74A、(c):V100A、(d):V125A、

表2. ヒト・リゾチーム変異型(Ile→Val及びVal→Ala)の変性の熱力学的パラメータ。pH 2.7で野生型の変性温度(64.9℃)での比較。

protein	Td (°C)	ΔTd (°C)	ΔCp ^a (kJ/mol K)	ΔH _{cal} (kJ/mol)	ΔΔG (kJ/mol)	ΔH _{cal} /ΔH _{VH}
wild-type	64.9±0.5		6.6±0.5	477±4	(0)	0.95
I23V	63.8±0.4	-1.1	5.8±1.8	468±11	-1.5±0.4	0.93
I56V	61.3±0.3	-3.6	5.6±1.7	475±13	-5.0±0.4	0.97
I59V	61.5±0.4	-3.4	5.0±1.0	461±7	-4.6±0.4	0.94
I89V	63.5±0.6	-1.4	8.0±0.3	484±3	-2.0±0.8	0.95
I106V	62.7±0.3	-2.2	5.9±0.7	457±10	-3.0±0.4	0.96
V2A	60.3±0.2	-4.6	6.5±0.5	468±4	-6.3±0.2	0.98
V74A	63.8±0.1	-1.1	6.2±0.4	476±2	-1.5±0.2	0.95
V93A	62.6±0.2	-2.3	6.4±0.4	466±4	-3.1±0.3	0.93
V99A	61.9±0.02	-3.0	6.6±0.5	463±3	-4.1±0.1	0.95
V100A	64.1±0.2	-0.8	4.2±0.4	461±3	-1.1±0.3	0.92
V110A	66.4±0.4	+1.5	5.2±0.4	484±2	+2.2±0.6	0.95
V121A	60.4±0.2	-4.5	6.4±0.3	460±3	-6.0±0.3	0.98
V125A	60.9±0.1	-4.0	5.4±0.1	472±0.5	-5.5±0.1	0.97
V130A	62.3±0.1	-2.6	6.3±0.6	464±5	-3.5±0.1	0.93

^a ΔCp was obtained from the slope of ΔH against Td.

は更に大きい。ΔGは+2.2~-6.3kJ/molで、ΔHは+7~-17kJ/molの範囲にわたっている⁷⁾。分子内部に含まれている疎水性残基が蛋白質の安定性にどの程度の寄与をしているかは、アミノ酸残基の溶解度実験よりVal→AlaのΔΔGは-5.2 kJ/mol、Ile→Valは-3.3 kJ/molと見積もられている。これは蛋白質分子内部の疎水性部分(メチル基)の減少によって安定性の低下する量を予測できることを示している。この値は疎水性残基の分子内部への埋もれ度、逆に言えば、どれだけ溶媒に露出しているか(溶媒露出表面積: Accessible Surface Area: ASA値)に関連する。変性に伴って溶媒に露出される疎水性残基のASA値の差(ΔASA=D状態のASA-N状態のASA)の変異型と野生型との差(ΔΔASA=変異型のΔASA-野生型のΔASA)が減少すればするほど安定性の低下(ΔΔG)が期待される。図2にΔΔASAと

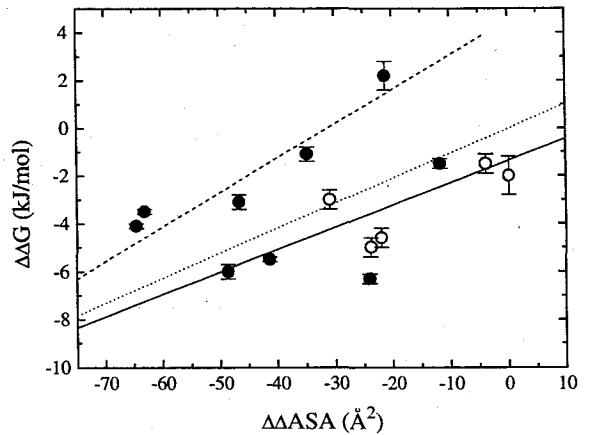


図2. 変異型ヒト・リゾチームの安定性の変化量(ΔΔG)と変性に伴って表面に露出される疎水性残基表面面積(ΔΔASA)との関連。Ile→Val変異型は黒丸、Val→Ala変異型は白丸で表す。実践は二次構造を持たない位置で置換(V74A, V121A, V1525A, I23V, I89V, I106V)、破線はαヘリックス上で置換(V93A, V99A, V100A, V110A)した変異型を比較。相関係数はそれぞれ0.88と0.95なる

表3. ヒト・リゾチーム変異型(Ile→Val及びVal→Ala)の置換部位の特徴と熱測定から得られた変性のギブスエネルギーの野生型との差 ($\Delta \Delta G$) と残基の疎水性から期待される $\Delta \Delta G$ 。期待される $\Delta \Delta G$ は溶媒露出表面積で補正してある。完全に埋もれているときのきたい値は、Ile→Val変異型では-3.3及びVal→Ala変異型では-5.2kJ/molである。

Mutant	Position of substitution		Measured $\Delta \Delta G$ (A) (kJ/mol)	Expected $\Delta \Delta G$ (B) (kJ/mol)	Discrepancy (A-B) (kJ/mol)
V93A	α -Helix	N3	-3.1	-5.0	+1.9
V99A	α -Helix	C1	-4.1	-5.1	+1.0
V100A	α -Helix	C	-1.1	-5.2	+4.1
V110A	α -Helix	N	+2.2	-1.5	+3.7
V2A	β -Sheet	N1	-6.3	-1.5	-4.8
V121A	β -Turn	i TypeIII	-6.0	-4.4	-1.6
V125A	β -Turn	i+3 TypeIII	-5.5	-4.4	-1.1
		i TypeII			
V74A			-1.5	-1.3	-0.2
V130A	C-Terminal		-3.5	-5.1	+1.6
I59V	β -Sheet	N1	-4.6	-3.3	-1.3
I23V	β -Turn	i+3 TypeI	-1.5	-3.1	+1.6
I56V	β -Turn	i+1 TypeI	-5.0	-3.3	-1.7
I106V	β -Turn	i+1 TypeIII	-3.0	-3.0	0
		i TypeIII			
I89V			-2.0	-3.2	+1.2

$\Delta \Delta G$ との関連を示す。全てのデータに関して、相関があるようには見えない。表3には、実験的に得られた変性のギブスエネルギー変化の野生型との差 ($\Delta \Delta G$)、置換により除かれたメチル基から期待される $\Delta \Delta G$ (ASA値で補正済み)、実験値と期待値の差、及び置換部位の構造上の特徴が示されている。表から分かるように、 α ヘリックス上に位置する変異型の実験値と期待値の差はいずれもプラスになっている。アミノ酸残基の種類によって蛋白質二次構造 (α ヘリックス、 β シートなど) 形成の傾向性に差のあることが知られている。 α ヘリックスの傾向性はAla>Val、 β シートのそれはVal>Alaである。そこで、二次構造を持たない位置での置換と α ヘリックス上での置換を区別して $\Delta \Delta ASA$ と $\Delta \Delta G$ との相関を求めると、相関係数はそれぞれ0.88と0.95となり、良い相関が得られた。このことは、疎水性残基 (メチル基) の除去による不安定化が二次構造形成の傾向性によって左右されることを示している。 α ヘリックス上で α ヘリックス形成の傾向性の高い残基への置換は、疎水性の減少による不安

定化を相殺していることになる。更に、それぞれの変異型のX線結晶解析で見られた構造変化との関連で、どのような構造変化の差異が安定性に寄与したかを詳細に検討してみると、置換の影響が僅かずつ分子全体に及んでおり、その僅かずつの変化のトータルが安定性に影響していることが判明している。

5. おわりに

アミノ酸置換による安定化の変化は、同じアミノ酸残基であっても置換部位によって大幅に異なるので、置換部位の構造の特徴をどのように記述するかが最も重要な課題となっている。これまでに報告されているような置換部位の特徴表示では、不十分である。そのためには、系統的で網羅的にアミノ酸置換体を作製し、それぞれの変異型の安定性を精度高く定量し、併せて置換に伴う構造変化（できればN、Dの両状態ともに）を解析する必要がある。今後、これらの多くの基礎データの蓄積を基にして立体構造上の特性と安定性を結びつける経験則の確立をめざしたい。

ここでは、本研究の目的とするところを意識的に述べなかった。それは、これと同じテーマで、この春に出版される大阪大学の「生産と技術」48巻、第2号（1996）にも執筆しているからである。そこには本研究のゴールとするところを詳しく書いた。

文献

- 1) Yutani, K., Ogasahara, K., Sugino, Y., & Matsushiro, A. (1977) *Nature* 267, 274-2752)
- 2) Yutani, K., Ogasahara, K., Tsujita, T., Sugino, Y., (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 4441-4444.
- 3) Herning, T., Yutani, K., Taniyama, Y., & Kikuchi, M. (1991) *Biochemistry* 30, 9882-9891
- 4) Kuroki, R., Kawakita, S., Nakamura, H., & Yutani, K., (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 6803-6807.
- 5) Kuroki, R., Inaka, K., Taniyama, Y., Kidokoro, S., Matsushima, M., Kikuchi, M., and Yutani, K. (1992) *Biochemistry* 31, 8323-8328.
- 6) Takano, K., Ogasahara, K., Kaneda, H., Yamagata, Y., Fujii, S., Kanaya, E., Kikuchi, M., Oobatake, M., & Yutnai, K. (1995) *J. Mol. Biol.* 254, 62-76.
- 7) Takano, K., Yamagata, Y., Fujii, & Yutnai, K. (1996) *J. Mol. Biol.* 投稿中