OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

| | |
|---|---|
| Title | Contribution of the Hydrophobic Effect to the Conformational Stability of a Protein |
| Author(s) | 高野, 和文 |
| Citation | 大阪大学, 1998, 博士論文 |
| Version Type | VoR |
| URL | https://doi.org/10.11501/3143785 |
| rights | |
| Note | |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

| | |
|---|---|
| 氏名 | 高野和文（たかのかずふみ） |
| 博士の専攻分野の名称 | 博士（理学） |
| 学位記番号 | 第 13671 号 |
| 学位授与年月日 | 平成10年3月25日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第1項該当<br>理学研究科高分子学専攻 |
| 学位論文名 | Contribution of the Hydrophobic Effect to the Conformational Stability of a Protein<br>（蛋白質立体構造の安定化に果たす疎水性相互作用の役割） |
| 論文審査委員 | （主査）<br>教授 月原 冨武<br>（副査）<br>教授 則末 尚志　教授 森島洋太郎　助教授 油谷 克英 |


## 論文内容の要旨

蛋白質は，そのアミノ酸配列によって規定される立体構造に依存して特異な機能を発揮する。一般の球状蛋白質の立体構造は，様々な因子による効果が複雑に絡み合った結果，変性状態に比べて40kJ／mol程度のギブスエネルギー差で安定化されている。この立体構造の安定化機構を解明することは，アミノ酸配列に含まれている立体構造に関する情報の解読に重要な役割を果たし，蛋白質の構造・機能予測，新規蛋白質の構築へとつながる。そのためには，どの様な立体構造中に位置するアミノ酸残基がどの様に安定化に寄与しているかを定量的に明らかにする必要がある。本研究は，蛋白質立体構造の主要な安定化因子と考えられている疎水性相互作用に注目し，その疎水性相互作用をもたらす疎水性残基を系統的に置換させた変異蛋白質の熱測定・構造解析を行い，疎水性残基が安定化に果たす役割を調べた。

本研究では，変異型蛋白質の作製，熱測定，X線結晶構造解析に有利であるヒトリゾチーム（130残基，4SS結合）をモデル蛋白質とした。アミノ酸置換は，立体障害による影響を避けるために，Ile→Val→Ala→Gly変異を用いた。作製した変異型蛋白質は，5種のIle→Val，5種のIle→Ala，2種のIle→Glyと9種のVal→Alaの計21種の一残基置換体である。さらに，得られた結果の一般性を検証するために，ヒトリゾチームに4本あるSS結合のうちの1本をアミノ酸置換により欠いた3SS型ヒトリゾチームでの5種のIle →Valと9種のVal→Alaの計14種の一残基変異型を作製した。

断熱型示差走査熱量計DASM4を用いた熱測定の結果，野生型からの置換の21種の変異型の安定性は，1種を除いて野生型に比べ低下した。しかし，同種の置換においても安定性の低下の大きさは一様ではなかった。このことは，置換部位の環境，置換による構造変化が安定性に影響をおよぼしていることを示唆している。構造解析の結果，置換による大幅な構造変化はなかったが，多くの変異型において置換部位周辺だけでなく離れた部位まで微妙な構造変化が生じていた。また，4種の変異型では，置換部位に生じたcavity内に新たな水分子が導入されていた。よって，これらの構造変化が安定性に影響をおよぼしていると考えられる。

置換による安定性の変化（ΔΔG）と構造変化との関係を調べた結果，置換による二次構造の傾向性の変化と新たに導入された水分子を考慮するとΔΔGと分子全体の$\Delta\Delta ASA_{HP}$（変性により露出される疎水性残基の表面積の変化）との間に良い相関関係（0.12kJ／mol Å$^2$）が得られた。この相関（0.12kJ／mol Å$^2$）はアミノ酸の疎水性度から得られる値と等しい。ここで，二次構造傾向性を高める置換では約3kJ／molの安定化効果があり，これは二次構

造傾向性の効果を調べた他の実験結果と一致する。また，分子内の水分子は水素結合の形成によって安定化に寄与していることが分かった。

次に3SS型ヒトリゾチームからの14種の疎水性残基変異型を用いて同様の実験を行った結果，3SS変異型においてもΔΔGと分子全体のΔΔASA$_{HP}$との間に良い相関が得られ，また，先に野生型からの置換で見いだされた結果と一致した。さらに，PDBに構造が登録され安定性の結果が報告されているT4リゾチームの6種の変異型についても同様の相関関係があることが分かった。以上の結果は，今回見いだされた相関関係は一般性があることを強く示唆している。

本研究は，一連の疎水性残基変異型の熱測定と構造解析から，蛋白質の安定化に寄与する疎水性相互作用，分子内の水分子，及び，二次構造傾向性による効果を明らかにした。さらに，これまで置換部位周辺の構造変化だけの考慮では説明し得なかった置換による安定性の変化を，置換が分子全体に影響をおよぼしているという構造解析の結果を基に，分子全体の構造変化を考慮することによって説明し得ることを示した。

## 論文審査の結果の要旨

蛋白質はその立体構造に依存して特異な機能を発揮する。この立体構造は様々な因子が絡み合って，安定化されている。35種のリゾーチームの熱測定と結晶構造解析に基づいて，蛋白質の安定化に対する疎水性相互作用，分子内水分子と二次構造傾向性の寄与を明らかにした。この研究は，博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。