

Title	超好熱菌由来タンパク質の遅い変性反応の解析
Author(s)	岡田, 淳
Citation	大阪大学, 2013, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/27550">https://hdl.handle.net/11094/27550</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

Osaka University

# 博士学位論文

超好熱菌由来タンパク質の遅い変性反応の解析

Studies on the slow unfolding pathway of proteins from  
hyperthermophile

岡田 淳

2013年1月

大阪大学大学院工学研究科

# 博士学位論文

超好熱菌由来タンパク質の遅い変性反応の解析

Studies on the slow unfolding pathway of proteins from  
hyperthermophile

岡田 淳

2013年1月

大阪大学大学院工学研究科

## 目次

### 序論

1. タンパク質のフォールディング機構
2. 超好熱菌由来タンパク質
3. 超好熱古細菌と超好熱細菌
4. Ribonuclease H
5. 研究の目的

### 第一章 超好熱古細菌と超好熱細菌由来タンパク質の耐熱化機構の比較

#### 1-1. はじめに

#### 1-2. 実験材料及び方法

- 1-2-1. プラスミド構築
- 1-2-2. 大量発現と精製
- 1-2-3. タンパク質濃度
- 1-2-4. 円二色性 (CD) スペクトル測定
- 1-2-5. GdnHCl 変性による平衡論的安定性測定
- 1-2-6.  $\Delta G(H_2O)$ の温度依存性
- 1-2-7. 熱変性測定
- 1-2-8. GdnHCl 変性による速度論的安定性測定

#### 1-3. 実験結果

- 1-3-1. CD スペクトルと GdnHCl による変性の可逆性
- 1-3-2. 平衡論的安定性測定
- 1-3-3. 熱変性測定
- 1-3-4. 速度論的安定性測定

#### 1-4. 考察

- 1-4-1. 超好熱菌由来 RNase H の平衡論的安定性解析
- 1-4-2. 超好熱菌由来 RNase H の変性剤存在下での変性反応
- 1-4-3. 水中での超好熱菌由来 RNase H の変性速度
- 1-4-4. 非常に遅い変性速度の原因
- 1-4-5. 埋もれた疎水性残基の役割

#### 1-5. 結論



## 第二章 超好熱菌由来タンパク質の構造安定性及びフォールディングに果たすプロリン残基の役割

### 2-1. はじめに

### 2-2. 実験材料及び方法

#### 2-2-1. 大量発現と精製

#### 2-2-2. タンパク質濃度

#### 2-2-3. CD スペクトル測定

#### 2-2-4. 熱変性測定

#### 2-2-5. GdnHCl 変性による平衡論的安定性測定

#### 2-2-6. GdnHCl 変性による速度論的安定性測定

### 2-3. 実験結果

#### 2-3-1. CD スペクトル測定

#### 2-3-2. 熱変性測定

#### 2-3-3. 速度論的安定性測定

#### 2-3-4. 平衡論的安定性測定

### 2-4. 考察

#### 2-4-1. プロリン残基が超好熱菌由来タンパク質の熱力学的安定性におよぼす影響

#### 2-4-2. プロリン残基が超好熱菌由来タンパク質の遅い変性に与える影響

#### 2-4-3. 超好熱タンパク質の安定化

### 2-5. 結論

## 第三章 Pulse proteolysis 法による超好熱古細菌由来 Tk-RNase H2 の変性過程解析

### 3-1. はじめに

### 3-2. 実験材料及び方法

#### 3-2-1. プラスミド構築

#### 3-2-2. 大量発現と精製

#### 3-2-3. タンパク質濃度

#### 3-2-4. CD スペクトル測定

#### 3-2-5. GdnHCl 変性による速度論安定性測定

#### 3-2-6. Tk-subtilisin による天然状態、変性状態タンパク質に対する pulse proteolysis 法

#### 3-2-7. Tk-subtilisin による遅い変性反応に対する pulse proteolysis 法

#### 3-2-8. N 末端配列決定及び質量分析

#### 3-2-9. 熱変性測定

3-2-10. Anilino-8-naphthalenesulfonic acid (ANS) 蛍光スペクトル測定

3-2-11.  $\Delta G(H_2O)$ の温度依存性曲線

### 3-3. 実験結果

3-3-1. Tk-RNase H2 の far-UV CD スペクトルと CD による遅い変性反応の測定

3-3-2. Tk-RNase H2 の Tk-subtilisin 耐性

3-3-3. Pulse proteolysis 法による Tk-RNase H2 の変性過程の観測

3-3-4. Tk-RNase H2 の fragment の同定

3-3-5. Tk-RNase H2 の変性の中間体様変異体の構築と CD スペクトル測定

3-3-6. Fragment 9 の速度実験

3-3-7. Fragment 20 の速度実験と Pulse proteolysis 法による解析

3-3-8. 変性過程と温度の関係

3-3-9. Tk-RNase H2 と fragment 20 の温度による変性過程の比較

3-3-10. Tk-RNase H2 と fragment 20 の anilino-8-naphthalenesulfonic acid (ANS) 結合能の比較

3-3-11. Fragment 20 の速度論的安定性解析

3-3-12. Pulse proteolysis 法による Tm-RNase H2 の変性過程の観測

### 3-4. 考察

3-4-1. Tk-RNase H2 の変性の速度論的中間体構造

3-4-2. Tk-RNase H2 の遅い変性の原因

3-4-3. Tk-RNase H2 の C 末端領域の役割

### 3-5. 結論

総括

参考文献

本研究に関する論文

その他の論文

謝辞

## 序論

### 1. タンパク質のフォールディング

タンパク質は20種類のアミノ酸が遺伝情報にしたがって一本の鎖状に結合した高分子である。そのアミノ酸の鎖は各タンパク質特有の配列で結合され、配列が同じであれば決まった形の立体構造（天然状態）に折り畳まれる（フォールディング）。しかし、鎖状に結合したアミノ酸が、どのような経路をたどってそれぞれの決まった立体構造に折り畳まれていくのか、また、タンパク質がどのような物理化学的な力でその立体構造を維持しているのか。このような、タンパク質構造の『物性』に関する疑問には、はっきりとした回答は得られていない。

1960年に Anfinsen は、試験管内で天然状態のタンパク質を一本の鎖状（変性状態）に解き（アンフォールディング）、そのタンパク質が自発的に天然状態の立体構造に巻き戻ることを証明した [1]。この実験により、タンパク質のフォールディング過程は単純な熱力学的過程であることがわかった。熱力学的に言い換えれば、タンパク質のフォールディング過程とはタンパク質が高いギブスエネルギーを示す変性状態からギブスエネルギー最小の天然状態へ転移する過程であることが示された。このときのフォールディング反応前後のギブスエネルギーの差 ( $\Delta G$ ) が天然状態の安定性を支えている熱力学的要因であり、これは平衡論的な安定性とよばれている。しかし、1968年に Levinthal は思考実験により、100 残基程度のタンパク質でもランダムに可能な全てのコンフォメーションを経験しながら天然構造に至るためには天文学的な時間がかかってしまうことに気づき、熱力学だけではタンパク質のフォールディングの説明ができないことを提唱した [2]。そこでタンパク質のフォールディング反応が素早く進行するためには、アミノ酸配列によって規定された特異的な経路が存在することを主張した。さらに、その経路上には特異的なフォールディングの中間体構造があることを予測した。この『特異的な経路や中間体』の検索のため、様々なタンパク質でフォールディング・アンフォールディング反応の速度に注目した速度論的な解析がおこなわれた。この平衡論、速度論の双方からの解析により、タンパク質の物性の理解は急速に深まっていった。さらに、Levinthal の予測の通り様々なタンパク質で中間体の検出が報告され、その物理化学的な解析が試みられた [3-9]。1990年代になると計算機の発達に伴ってタンパク質を単純化したモデルを用いた理論研究が盛んになり、タンパク質のフォールディングに新しい仮説が示された [10]。タンパク質のフォールディング過程は常に天然状態に向かったギブスエネルギー最小化への傾きの上に存在し、そこには無数の経路があり、反応が進むにつれて経路の数が減少し天然構造へと収斂していくようにデザインされている。そのとき、『特異的な経路や中間体』は必須ではなく、『様々な経路や中間体』が存在することになる。この理論研究は、タンパク質のフォールディング速度が天然状態のトポロジカルな複雑さと強い相関関係を持つことが実験的に示されたことによって支持された [11-12]。これは、フォールディング反応の律速は、ギブスエネルギー的な安定化を駆動力にしながら構造のエントロピーを減らす過程であ

ることを示し、それまで説明のつかなかったタンパク質のフォールディングや中間体の特徴を包括して理解することに役立った。しかし、この新しい仮説に当てはまらないタンパク質も多く [13]、フォールディング研究は現在も非常に興味深い疑問を呈したままである。

これらの疑問に対してタンパク質のフォールディング過程を実験的に探ろうとする場合、現在でも重要になるのは中間体に対する物理化学的なアプローチである。中間体構造はフォールディング過程の中でタンパク質がどのような構造を経ているのか知るための数少ない手掛かりであり、そこから得られる情報は重要な証拠になりうる。しかし、中間体は一般的にタンパク質の速いフォールディング・アンフォールディング反応中に構築されることから存在時間が短く、さらに天然状態のような高度な安定性を示さないため構造が柔軟であり、その詳細な観測や測定は非常に困難である。そのため現在もタンパク質構造の『物性』の理解をえるため、中間体構造の検出や解析のための様々な手法が試され、また新しい手法が求められている。

## 2. 超好熱菌由来タンパク質

生物は地球上の様々な環境に適応し生育している。特に原核生物では、南極の氷山の下、人間の体内、川や温泉、海底の熱水噴出孔から噴き出る熱水にもその存在が確認されている。その中に、生育至適温度が 80 度を超える超好熱菌が存在する。超好熱菌によって生産されるタンパク質は一般に熱に対して非常に高い安定性を示し、このようなタンパク質はその構造の安定性から様々な分野で産業利用されている。しかし、中温生物由来タンパク質のフォールディングや安定性に関する研究に対して、これら超好熱菌由来タンパク質のフォールディングや安定性に関する研究は少ない。中温生物由来タンパク質では、主にタンパク質工学的な手法を用いた網羅的な安定性解析によって、いくつかの安定化因子の影響が定量的に示されている。例えば、比較的大きな影響を与える要素として分子内の疎水性相互作用、イオン結合、S-S 結合やプロリンによる変性状態のエントロピーの減少等が示されている [14-17]。ところが、超好熱菌由来タンパク質はその高い安定性がゆえに、熱による変性に 100°C を超える温度が要求されることや、多くの場合に変性が不可逆であることから、定量的な物性の解析が困難である。しかし、近年になり、いくつかの超好熱菌由来タンパク質の定量的な安定性解析の結果が報告されている [18-21]。その結果、超好熱菌由来タンパク質でも中温生物由来タンパク質同様の、分子内の疎水性相互作用、イオン結合、S-S 結合等の要素が安定化因子として働いていることも観測された。このような超好熱菌由来タンパク質の安定化因子や、フォールディング過程の研究は上述の通り困難ではあるが、産業利用等の社会的な需要は高い。さらに、タンパク質が非常に高い安定性を示すことはタンパク質の物性としての安定性の理解を得るための有利な特徴でもある。超好熱菌由来タンパク質の解析を進めることはタンパク質の新たな物性の理解に繋がると考えられる。

## 3. 超好熱古細菌と超好熱細菌

遺伝子配列に基づき描かれた進化系統樹によれば、古細菌と細菌は進化の初期の段階で分化されている。そして、そのどちらにも超好熱菌が存在し、熱に対して非常に安定なタンパク質を生産していることが確認されている [22-25]。近年、多くの種の全ゲノム配列の解析が完了しているなかで、古細菌に分類される超好熱菌（超好熱古細菌）や、細菌に分類される超好熱菌（超好熱細菌）の全ゲノム配列も決定された。双方のゲノム配列を比較した結果、超好熱古細菌の発生は高温環境であることに対して、超好熱細菌は中温環境に一度適応した細菌が高温環境に再適応していることが示唆された [26]。この指摘は、双方の非常に高い耐熱性を示すタンパク質のアミノ酸配列に注目した理論研究の結果からも支持され、超好熱古細菌由来タンパク質と超好熱細菌由来タンパク質には、異なる安定化機構が存在することを示した [27, 28]。そのため、古細菌と細菌の安定化機構の理解のためにはこの二つの種の進化的背景を考慮する必要がある。しかし、一見すると離れた分野に見える進化的背景といった生物学的な要素と、タンパク質のフォールディング、安定性といった物理化学的な要素を組み合わせた実験的な研究例はまだない。このような多面的な研究が今後、生命現象の理解に非常に重要になるとと思われる。

#### 4. Ribonuclease H

Ribonuclease H (RNase H) はアミノ酸配列の相同性に基づき、type 1 と type 2 の大きく二種類に分けられ、type 1 には RNase H1 が type 2 には RNase H2 が分類されている [29-30]。双方とも二価イオン存在下で RNA/DNA ハイブリットの RNA 鎖のみを塩基非特異的に加水分解して 5' 位にリン酸基、3' 位に水酸基をもつ RNA オリゴマーを生成するエンドヌクレアーゼで、細胞の正常な生育に必須の酵素であるために生物界で普遍的に存在する。RNase H はすでに超好熱古細菌 *Thermococcus kodakarensis* 由来の RNase H2 (Tk-RNase H2)、*Sulfolobus tokodaii* 由来の RNase H1 (Sto-RNase H1)、超好熱細菌 *Thermotoga maritime* 由来の RNase H2 (Tm-RNase H2)、高度好熱細菌 *Thermus thermophilus* 由来の RNase H1 (Tt-RNase H1)、中温細菌 *Escherichia coli* 由来の RNase H1 (Ec-RNase H1) 等で、X 線結晶構造解析によって立体構造が決定されている [30-34]。その結果、それぞれの構造は非常に類似しており、RNase H-fold とよばれる、5 つの  $\beta$  シートと 2 つの  $\alpha$  ヘリックスからなる共通のフォールディングモチーフを形成している (PDB ID 2RN2, 1RIL, 2EHG, 1IO2, and 2ETJ)。Tk-RNase H2、Sto-RNase H1、Tt-RNase H1、Ec-RNase H1 については物理化学的な解析も進んでいる [21, 35-46]。高度好熱細菌由来 Tt-RNase H1 と中温細菌由来 Ec-RNase H1 の比較研究からは多くの知見が得られており、重水素パルスラベル法等により、そのフォールディングの中間体構造の形成も確認されている。さらに近年、超好熱古細菌由来 Tk-RNase H2 が非常に遅い変性反応によって高い速度論的安定性を示すことが確認された。その変性速度定数は Tt-RNase H1 に比べて 4 桁程度小さく、Ec-RNase H1 に比べて 5 桁程度小さかった。遅い変性速度を示すタンパク質が超好熱菌由来タンパク質に多く存在することがわかっているが、ホモログタンパク質間でのこのような違いは確認できていない。さらに、Luke [47]らは超

好熱菌由来タンパク質の速度論的解析の結果をまとめているが、Tk-RNase H2 のように単量体で存在し、高度な可逆性を示す定量的な解析に向いているタンパク質は少なく、超好熱細菌 *Thermotoga maritima* 由来の Cold shocked protein (Tm-Csp) と超好熱細菌 *Aquifex aeolicus* 由来の Ribosomal protein S16 (Aa-S16)、Tk-RNase H2 の三つに絞られてしまう。しかし、Tm-Csp と Aa-S16 は遅い変性反応を示さない。これらの変性反応が異なるのは、超好熱古細菌由来タンパク質と超好熱細菌由来タンパク質であるからなのか、S16 や Csp のように全く異なる構造のタンパク質であるからなのか、あるいは、RNase H1 と RNase H2 といった一次配列の相同性の違いによるものなのかまだわかっていない。

## 5. 本研究の目的

以上の背景を受けて本研究では、超好熱古細菌由来タンパク質と超好熱細菌由来タンパク質の物性を進化的背景を踏まえながら比較、解析することによって、タンパク質のフォールディング、安定化機構の新たな知見を与えることを目的とした。

本論文は三つの章から構成されている。第一章では、超好熱性 RNase H の平衡論的安定性と速度論的安定性の測定を行い、タンパク質の進化的背景の観点から比較した。測定に用いたタンパク質は変性剤変性に対して可逆的な変性を示すことから、定量的な安定性の解析に優れたモデルタンパク質であった。さらに超好熱性 RNase H は高い平衡論的安定性を示すが、変性反応速度は宿主の進化的背景に強く依存していた。第二章では、超好熱古細菌由来 RNase H の非常に遅い変性反応速度の原因として  $\alpha$  ヘリックス N 末端領域のプロリン残基に注目した。超好熱古細菌由来 Tk-RNase H2 には、 $\alpha$  ヘリックス N 末端領域にプロリン残基が配置されている箇所は 5 つあるが、超好熱細菌由来 Tm-RNase H2 では Tk-RNase H2 のもつ 5 つの箇所のうちの 2 つの箇所にしかプロリン残基は保存されていない。そこで、Tk-RNase H2 のプロリン残基をアミノ酸置換してその変性速度に与える影響を調べた。その結果、プロリン残基と変性反応速度の間に相関はなかった。第三章では、遅い変性反応を示すタンパク質である超好熱古細菌由来 Tk-RNase H2 の変性過程を、超安定なプロテアーゼである超好熱古細菌 *Thermococcus kodakarensis* 由来 subtilisin (Tk-subtilisin) [48]を用いて追跡するという新しい手法で解析した。その結果、Tk-RNase H2 の遅い変性反応には N 末側領域が重要な役割を担い、C 末端領域は復元反応と構造安定性に寄与していること、本実験手法がタンパク質の変性過程を解析する手段として有効であることがわかった。

第一章から第三章までの研究成果により、超好熱古細菌と超好熱細菌由来のタンパク質の進化的背景による物性の違いを実験的に観測することができた。そして、超好熱古菌由来 RNase H の特徴である非常に遅い変性反応の原因部位を特定し、その物性を解析することで今まで観測できなかった新しい変性反応経路を提案し、タンパク質のフォールディング、安定性の新しい知見を得ることができた。



# 第一章 超好熱古細菌と超好熱細菌由来タンパク質の安定性機構の比較

## 1-1. はじめに

一般的に超好熱菌由来タンパク質は中温生物由来タンパク質に比べて高い安定性を示す [22-24]。さらに、いくつかの超好熱菌由来タンパク質の高い安定性は遅い変性反応によって保たれている [49-60]。しかし、その遅い変性反応の原因はまだわかっていない。近年、超好熱古細菌由来 Tk-RNase H2 が中温生物由来 Ec-RNase H1 に比べ、高い平衡論的安定性と遅い変性反応によって耐熱化していることが報告された [21]。一方、高度好熱細菌由来の Tt-RNase H1 は Ec-RNase H1 と比べ、高い平衡論的安定性は示すが、遅い変性反応は示さず耐熱化している [36-37]。

Tk-RNase H2 と Tt-RNase H1 はどちらも安定な RNase H であり、立体構造も類似しているが (Figure 1-1)、その速度論的安定性は大きく異なっていた。なぜ二つのタンパク質で速度論的安定性は異なるのか。その原因として二つ仮説をたてた。一つ目は、Tk-RNase H2 と Tt-RNase H1 は、一次配列に相同性がない異なる祖先をもつタンパク質であるため。二つ目は、Tk-RNase H2 は古細菌由来であり、Tt-RNase H1 は細菌由来で宿主の進化的背景が異なるため。原因はどちらなのか確かめるためには、新たな超好熱細菌由来の RNase H2 と超好熱細菌由来の RNase H1 の安定性の解析が必要である。

そのため本章では、超好熱細菌由来 Tm-RNase H2、超好熱細菌 *Aquifex aeolicus* 由来 RNase H2 (Aa-RNase H2)、超好熱古細菌由来 Sto-RNase H1 の安定性の解析を行い、Tk-RNase H2、Tt-RNase H1、Ec-RNase H1 と速度論的安定性と平衡論的安定性を比較することによって超好熱菌由来タンパク質の安定化機構について考察した (Table 1-1)。これらの RNase H はすでに構造決定がなされており、その立体構造は非常に類似していることがわかっている (Figure 1-1)。

Table 1-1. Types and origins of RNase H.

	Archaea	Bacteria
Type 1 RNase H1	Sto; <i>Sulfolobus tokodaii</i> (hyperthermophile) <sup>a</sup>	Ec; <i>Escherichia coli</i> (mesophile)  Tt; <i>Thermus thermophilus</i> (thermophile)
Type 2 RNase H2	Tk; <i>Thermococcus kodakarensis</i> (hyperthermophile)	Aa; <i>Aquifex aeolicus</i> (hyperthermophile) <sup>a</sup>  Tm; <i>Thermotoga maritima</i> (hyperthermophile) <sup>a</sup>

<sup>a</sup> This work.

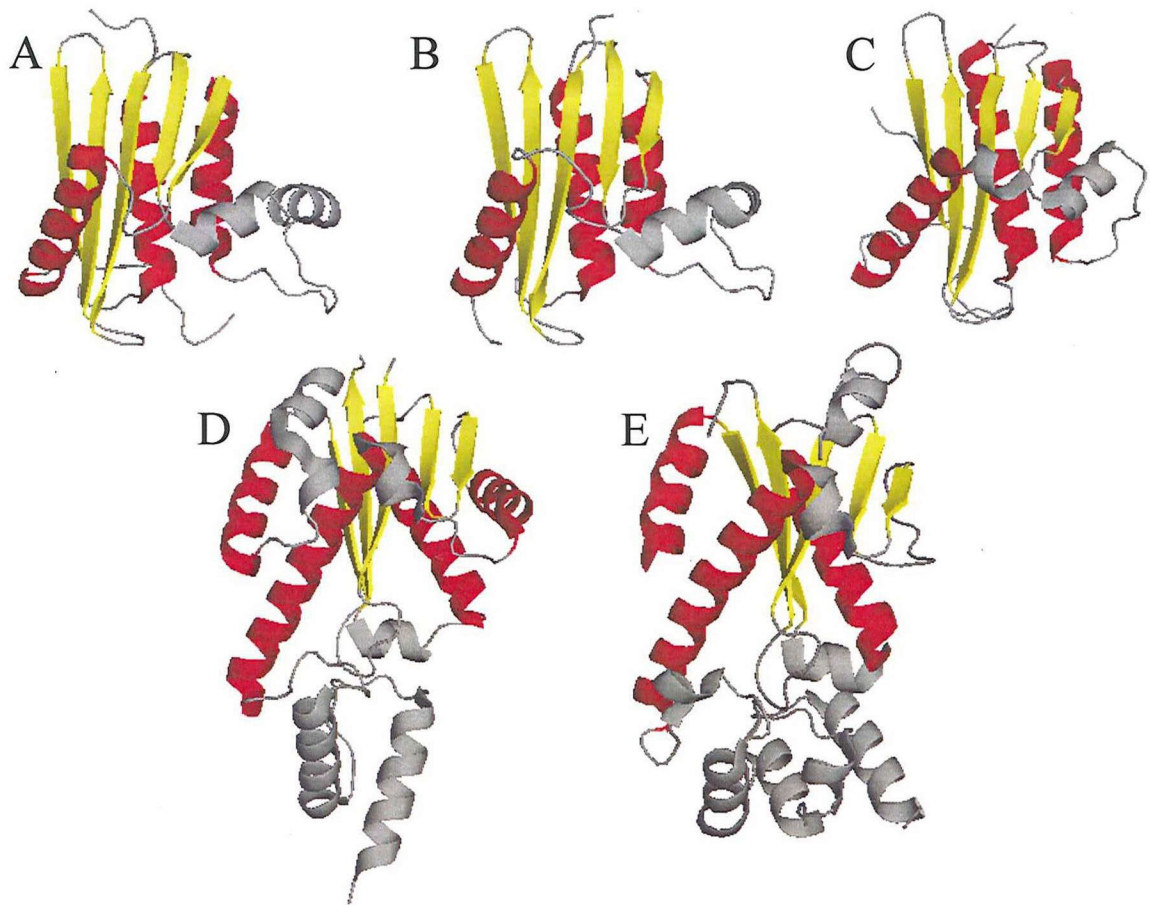


Figure 1-1. Crystal structures of (A) Ec-RNase H1 (PDB ID: 2RN2), (B) Tt-RNase H1 (1RIL), (C) Sto-RNase H1 (2EHG), (D) Tk-RNase H2 (1I02), and (E) Tm-RNase H2 (2ETJ). The figures were created by PyMOL [86].

## 1-2. 実験材料及び方法

### 1-2-1. プラスミド構築

Tm-RNase H2 と Aa-RNase H2 を大量発現するために、それぞれの大量発現用プラスミド (pET800TM、pET600AA) の構築を行った。Tm-RNase H2 と Aa-RNase H2 をコードした各 DNA 配列 (714bp と 588bp) は Tm と Aa のゲノム DNA をテンプレートに RCR によって増幅した。pET800TM と pET600AA の構築は各 DNA 断片を pET25b (Novagen) の NdeI-SalI サイトに挿入して構築した。PCR プライマーとして使用した DNA オリゴマーの合成は北海道システムサイエンス社に依頼した。DNA の塩基配列は Prism 310 DNA sequencer (Applied Biosystems) を用いて確認した。

### 1-2-2. 大量発現と精製

pET800TM と pET600AA で形質転換した大腸菌 BL21(DE3)をアンピシリン ( $50 \text{ mg L}^{-1}$ )、クロラムフェニコール ( $30 \text{ mg L}^{-1}$ ) を含む NZCYM 培地 (Novagen) によって  $37^\circ\text{C}$  で、 $\text{OD}_{660}$  が 0.5 になるまで培養した後、IPTG ( $1 \text{ mM}$ ) を加えてさらに 4 時間培養した。

pET800TM で形質転換した大腸菌は  $5000 \text{ rpm}$ 、10 分間の遠心で菌体を回収し、model 450 sonifier (Branson Ultrasonic Corp.) により超音波破碎後、 $30000 \text{ g}$ 、30 分間遠心の後、可溶性画分を回収した。可溶性画分を  $75^\circ\text{C}$  で 20 分間熱処理し、 $30000 \text{ g}$ 、30 分間遠心の後、可溶性画分を回収した。可溶性画分を  $20 \text{ mM Tris-HCl}$ ,  $10 \text{ mM EDTA}$  (pH 8.0) のバッファーで平衡した陰イオン交換カラム (Hitrap Q HP, Amersham Biosciences) に供した。そのフロースルー溶液を  $20 \text{ mM Tris-HCl}$ ,  $10 \text{ mM EDTA}$  (pH 8.0) のバッファーで平衡した陽イオン交換カラムとアフィニティーカラム (Hitrap SP HP, Hitrap Heparin, Amersham Biosciences) に供した。双方とも  $20 \text{ mM Tris-HCl}$ ,  $10 \text{ mM EDTA}$  (pH 8.0) のバッファーでカラムを洗った後、NaCl 濃度  $0 - 1 \text{ M}$  の直線的なグラジエントにより目的タンパク質を溶出した。最後は  $20 \text{ mM Tris-HCl}$  (pH 8.0) のバッファーに対して透析を行い、回収したタンパク溶液を以降の解析に用いた。

pET600AA で形質転換した大腸菌は  $5000 \text{ rpm}$ 、10 分間の遠心で菌体を回収し、フレンチプレスにより破碎後、 $30000 \text{ g}$ 、30 分間遠心の後、可溶性画分を回収した。可溶性画分を  $20 \text{ mM Acetate-NaOH}$ ,  $10 \text{ mM EDTA}$  (pH 5.5) のバッファーで平衡した陰イオン交換カラムに供した。そのフロースルー溶液を  $20 \text{ mM Acetate-NaOH}$ ,  $10 \text{ mM EDTA}$  (pH 5.5) のバッファーで平衡した陽イオン交換カラムに供した。20 mM Acetate-NaOH, 10 mM EDTA (pH 5.5) のバッファーでカラムを洗った後、NaCl 濃度  $0 - 1 \text{ M}$  の直線的なグラジエントにより目的タンパク質を溶出した。目的タンパク質を含む溶液を  $20 \text{ mM Acetate-NaOH}$ ,  $10 \text{ mM EDTA}$  (pH 5.0) のバッファーに対して透析を行い、回収したタンパク溶液を  $20 \text{ mM Acetate-NaOH}$ ,  $10 \text{ mM EDTA}$  (pH 5.0) で平衡化したアフィニティーカラムに供した。20 mM Acetate-NaOH, 10 mM EDTA (pH 5.0) のバッファーでカラムを洗った後、NaCl 濃度  $0 - 1 \text{ M}$  の直線的なグラジエントにより目的タンパク質を溶出した。最後は  $20 \text{ mM Acetate-NaOH}$  (pH 5.0) のバッファーに対して透析を行い、回収したタンパク溶液を以降の解析に

用いた。Sto-RNase H1 は既報の通りの大量発現、精製の方法で得た [33]。

Tm-RNase H2 と Aa-RNase H2、Sto-RNase H1 の精製度は 15%SDS-PAGE に供し、Coomassie Brilliant BlueR250 で染色することで判定した。

### 1-2-3. タンパク質濃度

Tm-RNase H2 と Aa-RNase H2、Sto-RNase H1 のタンパク質濃度は波長 280 nm における Tyr と Trp の  $\epsilon$  値 1,576、5,225 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> を用いて算出した吸光係数  $A_{280}^{0.1\%} = 0.24$ 、0.89、1.02 を用いて計算した [61]。

### 1-2-4. 円二色性 (CD) スペクトル測定

GdnHCl 存在下、非存在下での短波長 CD スペクトルは日本分光の J-725 spectropolarimeter により測定した。タンパク質濃度はすべて 0.16 mg mL<sup>-1</sup> で光路長は 2 mm のセルを用いた。平均残基分子楕円率 $[\theta]$  (deg cm<sup>2</sup> dmol<sup>-1</sup>) はアミノ酸の平均分子量 110 を用いて換算した。Tm-RNase H2、Aa-RNase H2、Sto-RNase H1 のバッファーはそれぞれ、20 mM Tris-HCl (pH 8.0)、20 mM Acetate-NaOH (pH 5.0)、20 mM Glycine-HCl (pH 3.0)を使用した。測定は 25°Cで行った。

### 1-2-5. GdnHCl 変性による平衡論的安定性測定

GdnHCl 変性による平衡論的安定性測定は波長 220 nm の CD 値  $[\theta]_{220 \text{ nm}}$  を J-725 spectropolarimeterにより追跡することで調べた。GdnHCl濃度の異なるタンパク質溶液を調整し、変性反応が平衡に達するまで測定温度で温置した。 $[\theta]_{220 \text{ nm}}$ の測定を光路長 2 mm のセルを用いて一分間行い、その平均値をそれぞれのタンパク質溶液の $[\theta]_{220 \text{ nm}}$ とした。Tm-RNase H2、Aa-RNase H2、Sto-RNase H1 のバッファーはそれぞれ、20 mM Tris-HCl (pH 8.0)、20 mM Acetate-NaOH (pH 5.0)、20 mM Glycine-HCl (pH 3.0)を使用した。その際、Tris-HCl バッファーの pH が温度に依存することを考慮して、バッファーの pH が測定温度で pH 8.0 になるように調整した。タンパク質濃度は 0.16 mg mL<sup>-1</sup>で行った。各タンパク質溶液の $[\theta]_{220 \text{ nm}}$ を溶液に含まれる GdnHCl 濃度に対してプロットすることで得られる変性曲線を以下に示す二状態転移モデルに基づいた式で近似した [62]。近似は Signa Plot (Jandel Scientific) を用いた。

$$y = ((b_n^0 + a_n [D]) + (b_u^0 + a_u [D]) \exp((\Delta G(\text{H}_2\text{O}) - m [D])/RT)) / (1 + \exp((\Delta G(\text{H}_2\text{O}) - m [D])/RT)) \quad (1)$$

ここで、 $y$  は GdnHCl 濃度 $[D]$ において観測される $[\theta]_{220 \text{ nm}}$ の値である。 $a_n$ 、 $a_u$ はそれぞれ転移前、転移後の GdnHCl 濃度を $[\theta]_{220 \text{ nm}}$ に対して直線近似したときの傾きを示し、 $b_n^0$ 、 $b_u^0$ はそれぞれ GdnHCl 濃度が 0 M のときの天然状態、変性状態の $[\theta]_{220 \text{ nm}}$ を示している。 $\Delta G(\text{H}_2\text{O})$ は GdnHCl が含まれていないときの変性に伴う  $\Delta G$  の値である。 $m$  は  $\Delta G$  を GdnHCl 濃度に対して直線近似したときの傾きである。 $T$  は測定温度 (K) を、 $R$  は気体定数を表している。

### 1-2-6. $\Delta G(H_2O)$ の温度依存性

各タンパク質の  $\Delta G(H_2O)$ を様々な温度条件で測定した。その  $\Delta G(H_2O)$ の温度依存性は Gibbs-Helmholtz の式で近似した。近似は Signa Plot を用いた。

$$\Delta G(H_2O) = \Delta H(T_0) - T \Delta S(T_0) + \Delta C_p (T - T_0 - T \ln (T/T_0)) \quad (2)$$

ここで、 $\Delta H(T_0)$ と  $\Delta S(T_0)$ はそれぞれ各タンパク質の変性のエンタルピー変化、エントロピー変化を示している。 $\Delta C_p$ は天然状態と変性状態の比熱の差を表している。

### 1-2-7. 熱変性測定

各タンパク質の熱変性測定は波長 220 nm の CD 値 $[\theta]_{220 \text{ nm}}$ を J-725 spectropolarimeter により追跡することで調べた。 $[\theta]_{220 \text{ nm}}$ の測定を光路長 2 mm のセルを用い、Tm-RNase H2、Aa-RNase H2 のバッファーはそれぞれ、20 mM Tris-HCl (pH 8.0)、20 mM Acetate-NaOH (pH 5.0)を使用した。タンパク質濃度は  $0.16 \text{ mg mL}^{-1}$ で行った。温度上昇は  $1^\circ\text{C min}^{-1}$ で行った。得られた熱変性曲線は反応を二状態と仮定した以下の式で近似した [63]。近似は Signa Plot を用いた。

$$y = ((b_n + a_n [T]) + (b_u + a_u [T]) \exp((\Delta H_m/RT) ((T - T_m)/T_m))) / (1 + \exp ((\Delta H_m/RT) ((T - T_m)/T_m))) \quad (3)$$

ここで、 $y$ は温度 $[T]$ において観測される $[\theta]_{220 \text{ nm}}$ の値である。 $a_n$ 、 $a_u$ はそれぞれ転移前、転移後の温度を $[\theta]_{220 \text{ nm}}$ に対して直線近似したときの傾きを示し、 $b_n$ 、 $b_u$ はそれぞれ $0^\circ\text{C}$ のときの天然状態、変性状態の $[\theta]_{220 \text{ nm}}$ を示している。 $\Delta H_m$ は変性中点の温度 ( $T_m$ ) におけるエンタルピー変化である。 $T$ は温度 (K) を、 $R$ は気体定数を表している。測定は Tm-RNase H2 では GdnHCl 濃度 1.0-2.0 M の間で、Aa-RNase H2 では GdnHCl 濃度 1.2-2.0 M の間のそれぞれのタンパク質が熱変性において完全に可逆的な条件で数回行った。各タンパク質の  $T_m$  値は各 GdnHCl 濃度での変性温度を GdnHCl 濃度に対して直線近似したときの GdnHCl 濃度が 0 M の値を想定した値を算出した。

### 1-2-8. GdnHCl 変性による速度論的安定性測定

各タンパク質の熱変性測定は波長 220 nm の CD 値 $[\theta]_{220 \text{ nm}}$ を J-725 spectropolarimeter により追跡することで調べた。Tm-RNase H2、Aa-RNase H2、Sto-RNase H1 のバッファーはそれぞれ、20 mM Tris-HCl (pH 8.0)、20 mM Acetate-NaOH (pH 5.0)、20 mM Glycine-HCl (pH 3.0)を使用した。その際、Tris-HCl バッファーの pH が温度に依存することを考慮して、バッファーの pH が測定温度で pH 8.0 になるように調整した。タンパク質濃度は  $0.16\text{-}0.032 \text{ mg mL}^{-1}$ で行った。測定には光路長 1 cm のセルを用いた。変性反応はタンパク質溶液を GdnHCl 含む溶液で 10 倍希釈することで行った。様々な GdnHCl 終濃度での変性反応の測定には溶液中に含まれる GdnHCl 濃度を変え

ることで行った。測定結果は以下の式で近似した。

$$A(t) - A(\infty) = A e^{-kt} \quad (4)$$

ここで  $A(t)$  は、時間  $t$  において観測される  $[\theta]_{220 \text{ nm}}$  の値である。 $A(\infty)$  は  $t \rightarrow \infty$  における  $[\theta]_{220 \text{ nm}}$  の値である。 $k$  は見かけの反応速度定数で、 $A$  は振幅である。 $\text{GdnHCl}$  の終濃度を変えて見かけの反応速度定数 ( $k_{\text{app}}$ ) の対数値の  $\text{GdnHCl}$  濃度依存性を調べた。 $k_{\text{app}}$  の対数値と  $\text{GdnHCl}$  濃度の間に比例関係が認められたので、以下に示す式で直線近似した。

$$\ln k_{\text{app}} = \ln k_u(\text{H}_2\text{O}) + m_u [\text{D}] \quad (5)$$

ここで、 $k_u(\text{H}_2\text{O})$  は水中での変性反応速度、 $m_u$  は  $\ln k_u$  を  $\text{GdnHCl}$  濃度  $[\text{D}]$  に対して直線近似したときの傾きである。近似は **Signa Plot** を用い、測定は 2、3 回行った。



### 1-3. 実験結果

#### 1-3-1. CD スペクトルと GdnHCl による変性の可逆性

Tm-RNase H2、Aa-RNase H2、Sto-RNase H1 の GdnHCl 存在下、非存在下での Far-UV CD スペクトルを 25°C で測定した (Figure 1-2)。スペクトルはそれぞれのタンパク質の天然状態、GdnHCl 存在下での変性状態、さらに一度 GdnHCl 存在下で変性した状態から GdnHCl の希釈によって自発的に巻きもどった天然状態を示している。これらの結果は Tm-RNase H2、Aa-RNase H2、Sto-RNase H1 が GdnHCl による変性に対し可逆的であることを示した。Tk-RNase H2、Tt-RNase H1、Ec-RNase H1 はすでに変性剤による変性において可逆的であることがわかっている [21, 36, 38]。したがって、これらの RNase H は安定性、フォールディング機構を比較解析するにあたって非常に優れたモデルタンパク質であることが示された。

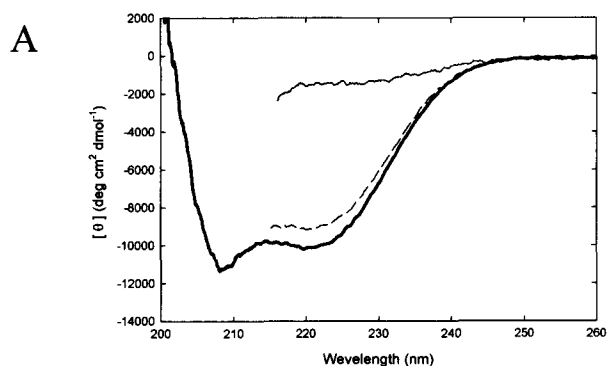
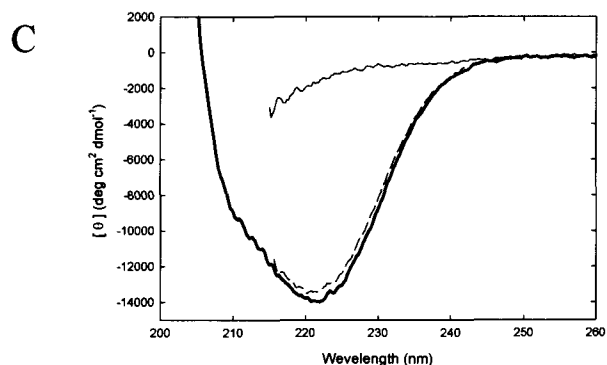
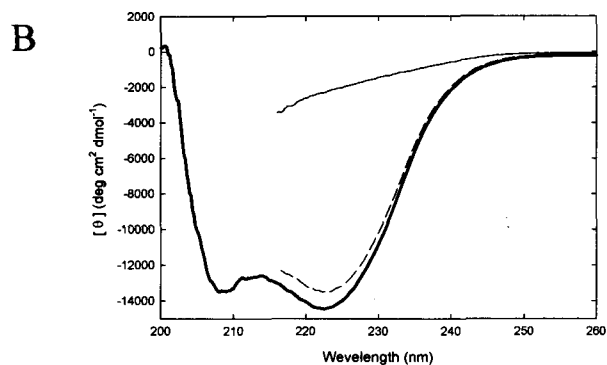


Figure 1-2. Far-UV CD spectra of RNase H at 25°C. (A) The spectra of Tm-RNase H2 were measured at pH 7.5 in the absence (thick line) and presence (thin line) of 4.0M GdnHCl. The dashed line represents the spectrum of the refolded protein in the presence of 1.5M GdnHCl. (B) The spectra of Aa-RNase H2 were measured at pH 5.0 in the absence (thick line) and presence (thin line) of 4.0M GdnHCl. The dashed line represents the spectrum of the refolded protein in the presence of 1.5M GdnHCl. (C) The spectra of Sto-RNase H1 were measured at pH 3.0 in the absence (thick line) and presence (thin line) of 6.4M GdnHCl. The dashed line represents the spectrum of the refolded protein in the presence of 1.0M GdnHCl.



### 1-3-2. 平衡論的安定性測定

Tm-RNase H2、Aa-RNase H2、Sto-RNase H1 の平衡論的安定性を求めるために、GdnHCl 変性を波長 220 nm の CD 値の変化を追跡することで調べた。まず、20°C で測定したところ、反応が平衡に達するまで Tm-RNase H2 と Aa-RNase H2 は約 3 日、Sto-RNase H1 は約 3 週間を要した (Figure 1-3)。このことから Tm-RNase H2、Aa-RNase H2、Sto-RNase H1 の変性反応が非常に遅いことがわかった。得られた変性曲線を天然状態と変性状態の二状態転移であると仮定した式 (1) で近似することにより、GdnHCl 変性における  $\Delta G(H_2O)$  を算出した。さらに、他の温度における  $\Delta G(H_2O)$  の算出を行い、 $\Delta G(H_2O)$  の温度依存性 (Figure 1-4) を式 (2) で近似することにより各タンパク質の熱力学パラメータを求めた (Table 1-2)。得られた結果より、測定したすべての超好熱菌由来の RNase H は中温菌由来の Ec-RNase H1 よりも全温度帯を通して高い安定性を示した。さらに、その中でも Sto-RNase H1 が最も高い安定性を示した。

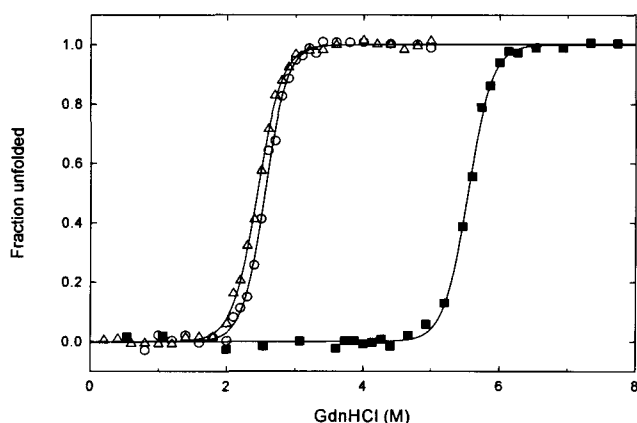


Figure 1-3. GdnHCl-induced denaturation curves of RNase H at 20°C. Open circles represent the GdnHCl-induced denaturation curves of Tm-RNase H2 at pH 7.5; open triangles, those of Aa-RNase H2 at pH 5.0; and closed squares, those of Sto-RNase H1 at pH 3.0. The lines represent the fit of Eq. (1).

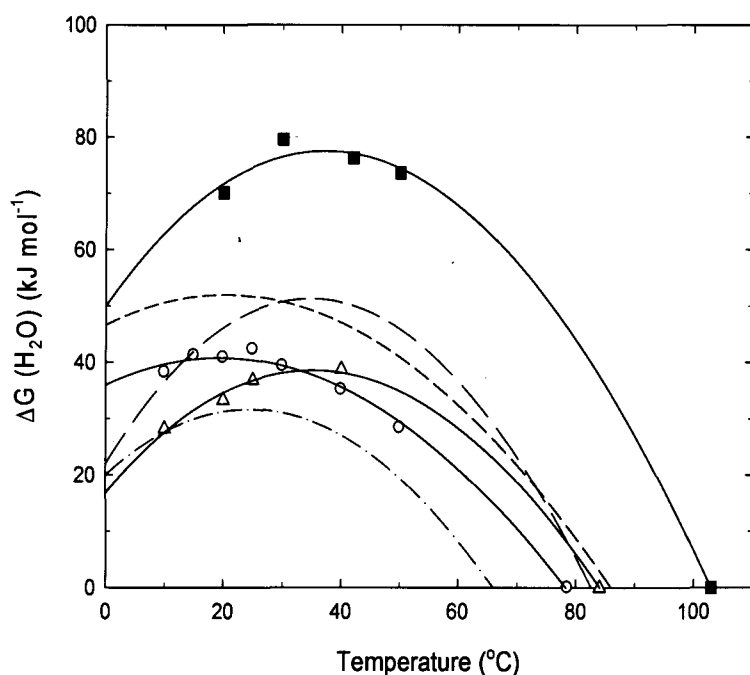


Figure 1-4. Thermodynamic stability profiles of RNase H. Open circles represent the temperature dependence of  $\Delta G(H_2O)$  of Tm-RNase H2 at pH 7.5; open triangles, those of Aa-RNase H2 at pH 5.0; and closed squares, those of Sto-RNase H1 at pH 3.0. The  $T_m$  at which  $\Delta G(H_2O)$  becomes zero were estimated from the heat-induced unfolding experiments. The lines represent the fit of Eq. (2). Long-dashed line represents the stability profiles of Tk-RNase H2; the short-dashed line, that of Tt-RNase H1; and the one-point dashed line, that of Ec-RNase H1 [21, 36].

Table 1-2. Comparison of the thermodynamic parameters of Tm-, Aa-, Tk-RNase H2 and Sto-, Tt-, Ec-RNase H1.

	RNase H2			RNase H1		
	Tm	Aa	Tk <sup>a</sup>	Sto	Tt <sup>b</sup>	Ec <sup>b</sup>
T <sub>m</sub> (°C)	78.6	84.0	82.8	102.0	86.0	66.0
ΔC <sub>p</sub> (kJ mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> )	7.3 ± 0.6	10.4 ± 0.6	14.5 ± 1.8	11.9 ± 1.2	7.5 ± 0.4	11.3 ± 0.8
ΔH <sub>m</sub> (kJ mol <sup>-1</sup> )	471 ± 19	549 ± 21	745 ± 49	858 ± 45	548 ± 21	502 ± 17
T <sub>s</sub> <sup>c</sup> (°C)	19.3	35.2	40.0	37.4	20.0	24.0
ΔG(T <sub>s</sub> ) <sup>d</sup> (kJ mol <sup>-1</sup> )	40.7	38.5	51.2	77.5	53.1	31.3

<sup>a</sup> Data from ref. 21.

<sup>b</sup> Data from ref. 36.

<sup>c</sup> T<sub>s</sub> is the temperature at which the protein exhibits the maximal ΔG(H<sub>2</sub>O) value.

<sup>d</sup> ΔG(T<sub>s</sub>) is the ΔG(H<sub>2</sub>O) value at T<sub>s</sub>.

### 1-3-3. 熱変性測定

Tm-RNase H2 と Aa-RNase H2 の熱変性を波長 220 nm の CD 値の変化を追跡することで調べた。熱変性は GdnHCl 存在下の変性に対して可逆な条件で測定され、変性温度を GdnHCl 濃度に対して直線近似したときの GdnHCl 濃度 0 M の値を算出した。その結果、Tm-RNase H2、Aa-RNase H2 の変性温度はそれぞれ 78.6°C、84.0°C であった。Sto-RNase H1 の熱変性の測定はすでに DSC 測定による結果が報告されており、Sto-RNase H1 の変性温度は 102.0°C である [33]。これらは Tt-RNase H1 (86.0°C)、Tk-RNase H2 (82.0°C) の変性温度を含めて中温生物由来の Ec-RNase H1 の変性温度 (66.0°C) より非常に高い値であった [21,36, 38]。

### 1-3-4. 速度論的安定性測定

Tm-RNase H2、Aa-RNase H2、Sto-RNase H1 の速度論的安定性を求めるために変性反応の速度実験を行った。反応はタンパク質溶液に終濃度が任意の GdnHCl 濃度になるようにあらかじめ計算された量の GdnHCl 溶液を瞬時に加え攪拌することによって行った。その変性過程は波長 220 nm の CD 値の変化を追跡することで調べた。まず、各 RNase H を 25°C で測定したところ Figure 1-5 の結果が得られた。すべての変性は一次の指数関数に近似できた。GdnHCl の終濃度を変えて測定を行い、見かけの反応速度定数 (k<sub>app</sub>) の対数値を GdnHCl 終濃度に対してプロットしたのが Figure 1-6 である。Figure 1-6 には Tk-RNase H2 と Ec-RNase H1 のデータも含まれている [21, 38]。超好熱菌由来のタンパク質は中温生物由来の Ec-RNase H1 よりも、いずれの GdnHCl 濃度存在下でも非常に遅い変性反応を示した。得られた k<sub>app</sub> の対数値と GdnHCl の終濃度の間に比例関係が認められたので式 (5) によって直線近似し、水中での変性反応速度 (k<sub>v</sub>(H<sub>2</sub>O)) を算出した。得られた速度論的パラメータは Table 1-3 にまとめた。その結果、細菌由来の Tm-RNase H2 と Aa-RNase H2 の変性速度は細菌由来の Tt-RNase H1 や Ec-RNase H1 と同様に速く、古細菌由来の Sto-RNase H1 の変性速度は古細菌由来の Tk-RNase H2 同様に遅いことがわかった [21, 38]。

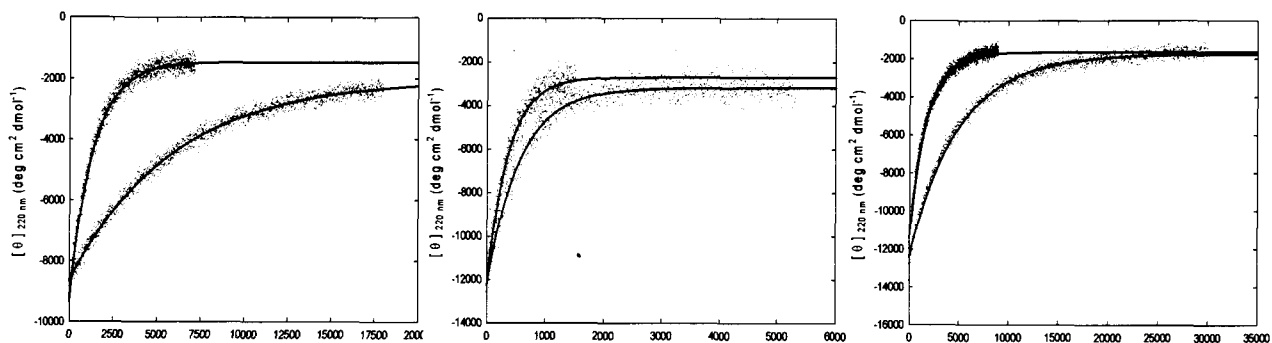


Figure 1-5 Unfolding kinetic curves of RNase H at 25°C. (A) Curves 1 and 2 represent the unfolding traces to a final concentration of 4.8 and 3.8 M GdnHCl of Tm-RNase H2 at pH 7.5. (B) Curves 1 and 2 represent the unfolding traces to a final concentration of 4.0 and 3.5 M GdnHCl of Aa-RNase H2 at pH 5.0. (C) Curves 1 and 2 represent the unfolding traces to a final concentration of 7.5 and 7.0 M GdnHCl of Sto-RNase H1 at pH 3.0. The lines represent the fit of Eq. (4).

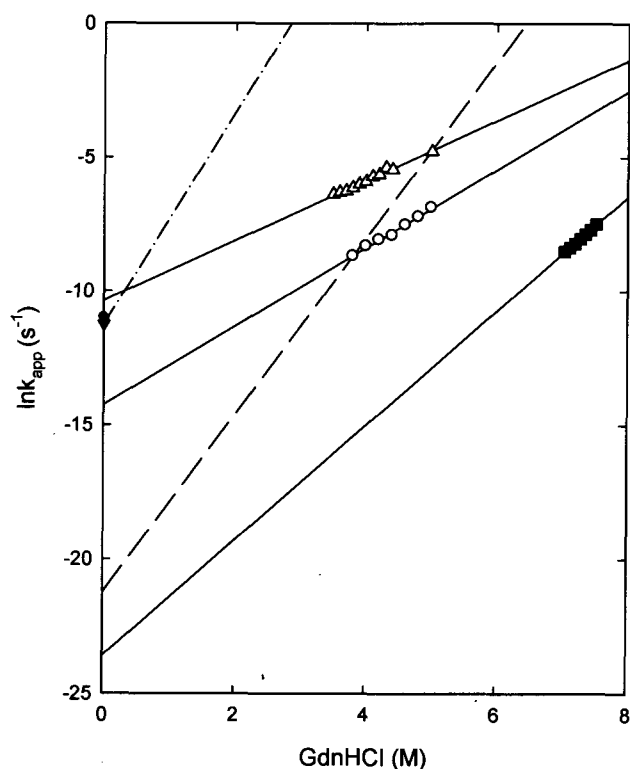


Figure 1-6 GdnHCl concentration dependence of the apparent rate constant ( $\ln k_{app}$ ) of the unfolding of RNase H at 25°C. Open circles represent the data of Tm-RNase H2 at pH 7.5; open triangles, that of Aa-RNase H2 at pH 5.0; and closed squares, that of Sto-RNase H1 at pH 3.0. The lines represent the fit of Eq. (5). Long dashed line represent the data of Tk-RNase H2 and one-point dashed line represent Ec-RNase H1 [21, 38]. The red circle and blue triangles represents the  $k_u(H_2O)$  value obtained from urea-induced unfolding experiments with Ec-RNase H1 [40] and Tt-RNase H1 [37], respectively.

Table 1-3. Comparison of the kinetic parameters of Tm-, Aa-, Tk-RNase H2 and Sto-, Tt-, Ec-RNase H1 at 25°C.

	RNase H2			RNase H1		
	Tm	Aa	Tk <sup>a</sup>	Sto	Tt	Ec <sup>b</sup>
$k_u(H_2O)$ (s <sup>-1</sup> )	$6.5 \times 10^{-7}$	$3.7 \times 10^{-5}$	$6.0 \times 10^{-10}$	$5.7 \times 10^{-11}$	- ( $1.3 \times 10^{-5}$ ) <sup>c</sup>	$1.1 \times 10^{-5}$ ( $1.7 \times 10^{-5}$ ) <sup>d</sup>
$m_u$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	1.46	1.08	3.29	2.14	-	3.66

<sup>a</sup> Data from ref. 21.

<sup>b</sup> Data from ref. 38.

<sup>c</sup> Data from ref. 37. The  $k_u(H_2O)$  value was obtained from the urea-induced unfolding experiments.

<sup>d</sup> Data from ref. 40. The  $k_u(H_2O)$  value was obtained from the urea-induced unfolding experiments.

#### 1-4. 考察

Tk-RNase H2のように高い平衡論的安定性と速度論的安定性を有する超好熱菌由来タンパク質がいくつか報告されている [21, 49-55]。一方、Tt-RNase H1のように高い平衡論的安定性を有するにも関わらず、高い速度論的安定性を示さない超好熱菌由来タンパク質も確認されている [36, 37]。この超好熱菌由来タンパク質の高い速度論的安定性の原因や機構はわかっていない。本章ではTk-RNase H2は古細菌由来、Tt-RNase H1は細菌由来のタンパク質であることに注目した。Tk-RNase H2の有する高い速度論的安定性は古細菌由来のタンパク質の特徴なのかもしれない。しかし、Tk-RNase H2とTt-RNase H1は同じRNase Hでもtype 2とtype 1に分類され一次配列には相同性がない [29, 30]。そこで、高い速度論的安定性の原因を確かめるために、超好熱細菌由来のRNase H2として、Tm-RNase H2とAa-RNase H2、超好熱古細菌由来のRNase H1として、Sto-RNase H1の平衡論、速度論的安定性解析を行うことで高い速度論的安定性の原因や機構を考察した。

##### 1-4-1. 超好熱菌由来RNase Hの平衡論的安定性解析

現在までに多くの高い安定性を示すタンパク質の平衡論的安定性が調べられている。それらの $\Delta G(H_2O)$ の温度依存性には大きく三つの安定化の特徴が表れる [23]。一つ目は、全温度領域で $\Delta G(H_2O)$ が増加する (method 1)。二つ目は、 $\Delta G(H_2O)$ の温度依存性曲線の曲率が下がる (method 2)。三つ目は、全体的に高温側へ水平移動する (method 3)。このうち一つが支配的なものもあれば、二つや三つを合わせもつ場合もある。タンパク質の安定化戦略はこれらの特徴によって区別することができると考えられている。

そこで、Sto-RNase H1、Tt-RNase H1、Ec-RNase H1、Tm-RNase H2、Aa-RNase H2、Tk-RNase H2の $\Delta G(H_2O)$ の温度依存性を比較した (Figure 1-4)。まず、RNase H1に分類されるTt-RNase H1とSto-RNase H1は、中温生物由来Ec-RNase H1よりも全温度領域において高い $\Delta G(H_2O)$ を示した。これはmethod 1の安定化戦略である。さらに、 $\Delta C_p$ の値からもわかるようにTt-RNase H1の $\Delta G(H_2O)$ の温度依存性曲線は曲率を失っており、Sto-RNase H1では曲率はそのまま $T_s$ が約 $10^\circ\text{C}$ 上がっている (Table 1-2)。これより、同じRNase H1でも細菌由来のTt-RNase H1はmethod 1、2、古細菌由来のSto-RNase H1はmethod 1、3の安定化戦略をとっていることがわかった。RNase H2に分類されるTm-RNase H2、Aa-RNase H2、Tk-RNase H2については中温生物由来のRNase H2のデータはない。しかし、三つのタンパク質はすべて全温度領域においてEc-RNase H1よりも高い $\Delta G(H_2O)$ を示した。このことから、三つのタンパク質はすべてmethod 1の安定化戦略を示すことが推測できる。さらに、 $\Delta G(H_2O)$ の温度依存性曲線の曲率はTm-RNase H2、Aa-RNase H2、Tk-RNase H2の順で小さく、 $T_s$ もTm-RNase H2、Aa-RNase H2、Tk-RNase H2の順番で小さい。これは、Tm-RNase H2がTk-RNase H2よりもmethod 2、Tk-RNase H2がTm-RNase H2よりもmethod 3の安定化戦略の傾向をもつことを示している。したがって、安定化戦略はTt-RNase H1とTm-RNase H2はmethod 1、2、Sto-RNase H1とTk-RNase H2はmethod 1、3に区別され、細菌

由来RNase Hと古細菌由来RNase Hは平衡論的に異なる安定化戦略を有すること示唆している。

#### 1-4-2. 超好熱菌由来 RNase H の変性剤存在下での変性反応

一般的にタンパク質は GdnHCl 存在下で速い変性反応を示す (< 1 min)。Ec-RNase H1 も 3.0 M GdnHCl 存在下では 10 秒以内に変性反応を完了する [38]。しかし、多くの超好熱菌由来タンパク質で変性反応が数時間から数週間かかることが知られている。例えば、超好熱古細菌 *pyrococcus furiosus* 由来の pyrrolidone carboxyl peptidase (Pf-PCP) では 7.7 M GdnHCl 存在下で変性反応に 1 日以上かかる [18]。Tk-RNase H2 も 3.9 M GdnHCl 存在下で変性反応には 2 時間必要とする [21]。

この傾向は本章で測定した超好熱菌由来 RNase H でも確認することができた (Figure 1-5)。Tm-RNase H2 は 4.8 M GdnHCl 存在下で変性反応は約 2 時間、Aa-RNase H2 は 3.5 M GdnHCl 存在下で変性反応は約 1 時間、さらに、Sto-RNase H1 は 7.0 M GdnHCl 存在下で変性反応は約 8 時間要している。超好熱菌由来 RNase H の変性剤存在下における非常に遅い変性反応は、古細菌、細菌由来、RNase H2、RNase H1 の区別に関係なく、超好熱菌由来タンパク質の共通した高温適応戦略なのかもしれない。

#### 1-4-3. 水中での超好熱菌由来 RNase H の変性速度

Tk-RNase H2 と Tt-RNase H1 は同じく高い平衡論的安定性を有する好熱菌由来 RNase H であるが、その速度論的安定性は大きく異なっていた。Tk-RNase H2 の  $k_u(\text{H}_2\text{O})$  は  $6.0 \times 10^{-10} \text{ s}^{-1}$  を示し、非常に高い速度論的安定性を示すのに対して、Tt-RNase H1 の  $k_u(\text{H}_2\text{O})$  は  $1.3 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$  を示し、中温生物由来 Ec-RNase H1 の  $k_u(\text{H}_2\text{O})$  ( $1.5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ ) と同等の速度論的安定性を示す [21, 38, 40]。速度論的安定性が大きく異なるのは、Tk-RNase H2 と Tt-RNase H1 が一次配列に相同性がないタンパク質 (RNase H2 と RNase H1) であるためか、Tk-RNase H2 と Tt-RNase H1 の宿主 (古細菌、細菌) が異なるためなのかわかっていない。

本章では細菌由来の RNase H2 として、Tm-RNase H2 と Aa-RNase H2、古細菌由来の RNase H1 として、Sto-RNase H1 の変性速度を測定した。その結果、Tm-RNase H2 と Aa-RNase H2 の  $k_u(\text{H}_2\text{O})$  ( $6.5 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ ,  $3.7 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ ) は Tt-RNase H1 や Ec-RNase H1 と同様に速く、Sto-RNase H1 の  $k_u(\text{H}_2\text{O})$  ( $5.7 \times 10^{-11} \text{ s}^{-1}$ ) は Tk-RNase H2 と同様に遅かった (Table 1-3)。このことより、超好熱菌由来の RNase H の速度論的安定性は、RNase H の type 1 (RNase H1) と type 2 (RNase H2) の違いではなく、宿主の進化的背景の違い (細菌、古細菌) に起因することがわかった。この結果は単量体で可逆的なタンパク質である細菌由来の Tm-Csp と Aa-S16 が超好熱菌由来の安定なタンパク質であるにも関わらず、早い変性反応を示す結果とも一致する [47]。Tk-RNase H2 と Sto-RNase H1 では、定量性を得るために変性に対して可逆的な条件で測定したため、双方の測定条件は pH 9.0、pH 3.0 である [21]。ここで、中性 pH での変性速度の測定も行った。変性に対する可逆性は失われるが、pH 7.5 の条件下で Tk-RNase H2 の  $k_u(\text{H}_2\text{O})$  は  $9.3 \times 10^{-10} \text{ s}^{-1}$  であり、pH 5.5 の条件下で Sto-RNase H1 の  $k_u(\text{H}_2\text{O})$  は  $3.3 \times 10^{-11} \text{ s}^{-1}$  を示した。これは、古細菌由来の Tk-RNase H2 と Sto-RNase



H1 は pH に関係なく細菌由来 RNase H よりも遅い変性反応を示すことを示唆している。

#### 1-4-4. 非常に遅い変性速度の原因

超好熱菌由来タンパク質の変性反応は宿主の進化的背景に依存することがわかった。では、超好熱古細菌と超好熱細菌由来タンパク質のどのような違いが変性反応に影響するのか。Berezovsky と Shakhnovich [27]は超好熱古細菌由来タンパク質は、中温環境に生息する古細菌由来のホモログタンパク質よりも、疎水性に富んでかつコンパクトな形状を取っていると報告している。一方、超好熱細菌由来タンパク質は、一度、中温環境へ適応した宿主が高温環境へ再適応したこと付随して、塩橋等の特異的相互作用によって一次配列をベースに高温環境へ再適応していると指摘した。さらに、Mizuguchi [28]らは古細菌と細菌由来タンパク質の間に立体構造に基づいたアミノ酸組成の違いがあることを報告した。これらの主張は古細菌と細菌の間には異なった耐熱化戦略が存在することを示唆している。

そこで、超好熱細菌由来 RNase H と超好熱古細菌由来 RNase H のアミノ酸組成を、立体構造に基づいて比較し、遅い変性に関わる特徴を探した。この際、Tm-RNase H2 と Aa-RNase H2 は立体構造がまだ決定されていないので除外した。その結果、古細菌由来である Sto-RNase H1、Tk-RNase H2 は、共にタンパク質内部に埋もれた疎水性アミノ酸残基の割合が細菌由来である Tt-RNase H1 よりも高い (Figure 1-7)。細菌由来 Tt-RNase H1 においては埋もれた疎水性残基の割合は42%であるのに対して、古細菌由来Sto-RNase H1、Tk-RNase H2においてはそれぞれ54%、55%と約 10%も高い割合を示した。これは、古細菌由来 RNase H の遅い変性反応は内部に埋もれた疎水性残基の割合と相関があることを示している。さらに、疎水性残基が Tk-RNase H2 の遅い変性反応に寄与することは以前 Dong [35]らの実験によっても示されており本章とも矛盾しない。

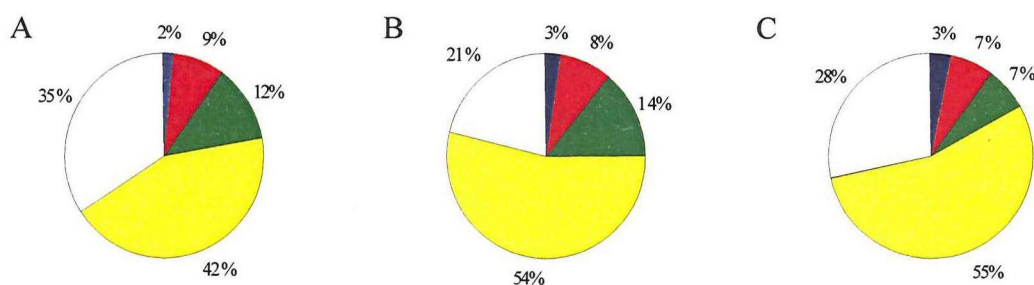


Figure 1-7 Characteristics of RNase H. (A-C) Pie diagrams representing the fraction of hydrophobic, polar, and charged residues in the interior of the tertiary structure of hyperstable RNase H. (A) Tt-RNase H1. (B) Sto-RNase H1. (C) Tk-RNase H2. Blue denotes positively charged residues (Arg and Lys). Red denotes negatively charged residues (Asp and Glu). Green denotes polar residues (Asn, Gln, Ser, and Thr). Yellow denotes hydrophobic residues (Ile, Leu, Met, Phe, Trp, Tyr, and Val). White denotes other residues (Ala, Cys, Gly, His, and Pro). Amino-acid residues with relative solvent accessibility greater than 25% were regarded as residues exposed to solvent.

ここで、結晶構造が決定されている他の超好熱菌由来RNase Hのアミノ酸組成も比較した(Figure 1-8)。 *Pyrococcus furiosus* 由来 RNase H2 (Pf-RNase H2) (1UAX) と *Archaeoglobus fulgidus* 由来 RNase H2 (Af-RNase H2) (1I39) は、どちらも古細菌由来の RNase H であり単量体での活性を示すことが報告されている。その結果、古細菌由来 Pf-RNase H2 と Af-RNase H2 の埋もれた疎水性アミノ酸残基の割合は古細菌由来 Sto-RNase H1、Tk-RNase H2 と同様に細菌由来 Tt-RNase H1 よりも約 10%高かった。したがって、Tk-RNase H2 や Sto-RNase H1 だけでなく超好熱古細菌由来 RNase H は、全般的に超好熱細菌由来 RNase H よりも埋もれた疎水性残基の割合が高い傾向があった。さらに、超好熱菌由来の RNase H1 と RNase H2 のアミノ酸配列から進化系統樹を作製し、超好熱古細菌由来 RNase H と、超好熱細菌由来 RNase H の関係を調べた (Figure 1-9)。その結果、古細菌由来 RNase H と細菌由来 RNase H は type1、type2 でそれぞれ大きな進化的距離によって隔たれた分類群に位置していた。以上より、遅い変性反応による安定化は、進化的背景に基づいて、古細菌由来 RNase H のみが有する一次配列に依存した戦略であることが示唆できる。

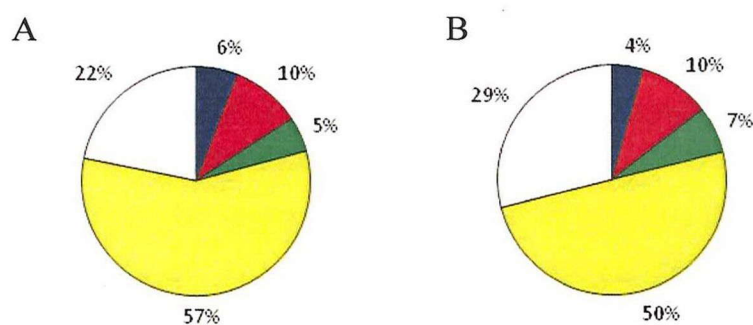


Figure 1-8. Pie diagrams representing the fraction of hydrophobic, polar, and charged residues in the interior of the tertiary structure of hyperstable RNase H. (A) RNase H2 from *Pyrococcus furiosus*. (B) RNase H2 from *Archaeoglobus fulgidus*.



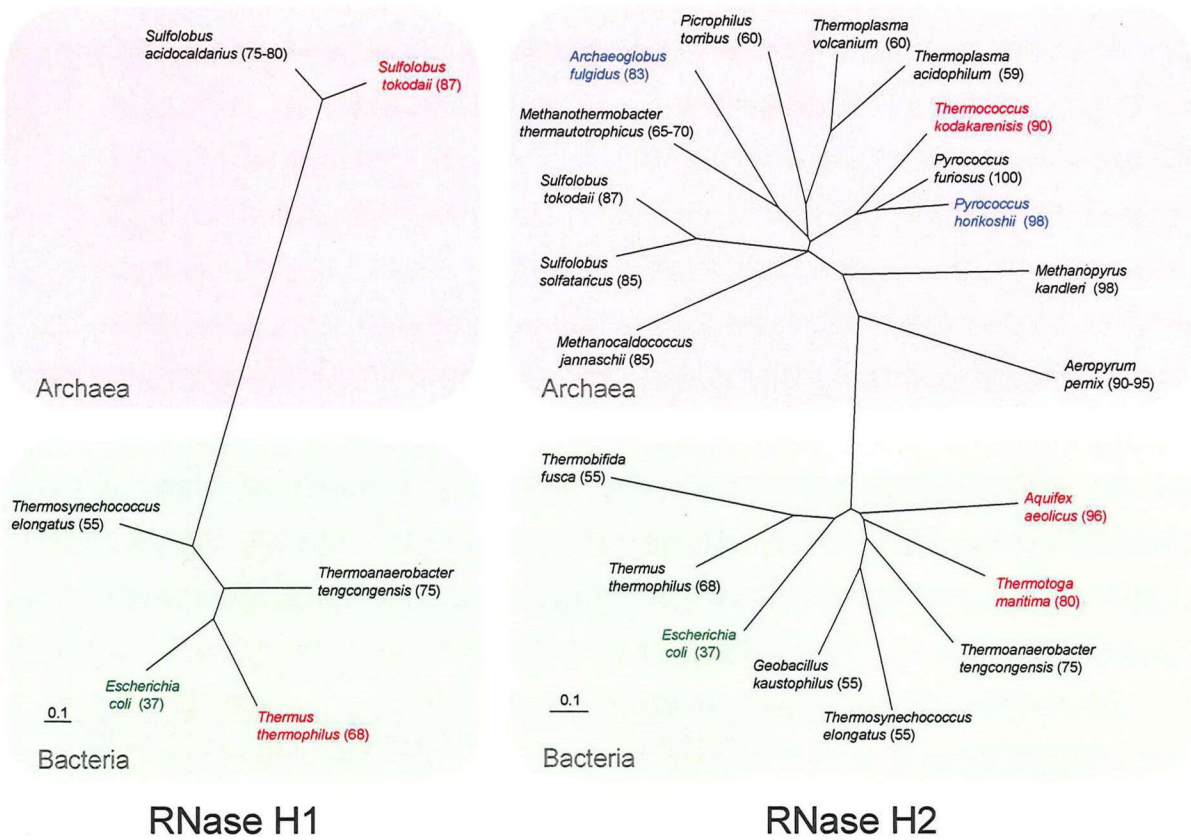


Figure 1-9. Phylogenetic tree of thermostable RNase H on the basis of the amino acid sequences. Alignments and trees were calculated using the alignment programs ClustalW with the default parameters [87]. The resulting trees were plotted using Treeview [89]. Optimal growth temperature of each organism is shown in parenthesis. RNase H2 (accession number) are *Aeropyrum pernix* (NP\_147280), *Archaeoglobus fulgidus* (O29634), *Methanocaldococcus jannaschii* (NP\_247101), *Methanopyrus kandleri* (NP\_613473), *Methanothermobacter thermautotrophicus* (NP\_276158), *Picrophilus torribus* (YP\_024041), *Pyrococcus furiosus* (NP\_579510), *Pyrococcus horikoshii* (NP\_143500), *Sulfolobus solfataricus* (NP\_343742), *Sulfolobus tokodaii* (NP\_376405), *Thermococcus kodakarensis* (YP\_183218), *Thermoplasma acidophilum* (NP\_394911), *Thermoplasma volcanium* (NP\_110652), *Aquifex aeolicus* (NP\_214337), *Escherichia coli* (YP\_001729139), *Geobacillus kaustophilus* (YP\_147058), *Thermoanaerobacter tengcongensis* (NP\_623069), *Thermobifida fusca* (YP\_290201), *Thermosynechococcus elongatus* (NP\_681452), *Thermotoga maritima* (NP\_228723), *Thermus thermophilus* (YP\_143464). RNase H1 (accession number) are *Sulfolobus acidocaldarius* (YP\_256320), *Sulfolobus tokodaii* (NP\_376653), *Escherichia coli* (YP\_001729165), *Thermosynechococcus elongates* (NP\_681090), *Thermoanaerobacter tengcongensis* (NP\_622980), *Thermus thermophilus* (YP\_144822).

#### 1-4-5. 埋もれた疎水性残基の役割

上述の通り超好熱古細菌由来 RNase H には超好熱細菌由来 RNase H よりも埋もれた疎水性アミノ酸残基の割合が高いことがわかった。疎水性アミノ酸の安定性に及ぼす影響はタンパク質工学的な手法を利用した多くの研究によって検証されている。Funahashi ら [64]は、埋もれた疎水性面積の増加が安定性の増加と正の相関を有することを報告している。

そこで、埋もれた非極性原子 (C and S) の面積と埋もれた極性原子 (O and N) の面積を算出し、Tt-RNase H1、Sto-RNase H1、Tk-RNase H2 の埋もれた疎水性面積と安定性との相関性を調べた。その結果、埋もれた疎水性面積の割合は、Tt-RNase H1、Sto-RNase H1、Tk-RNase H2 でそれぞれ 62.6%、67.3%、64.5%であった (Table 1-4)。この割合の大きさの順は、それぞれのタンパク質の平衡論的安定性の大きさの順に一致した (Figure 1-4)。超好熱菌由来 RNase H でも埋もれた疎水性面積の割合が平衡論的安定性と相関するのかもしれない。しかし、驚くべきことに、古細菌由来 RNase H の埋もれた疎水性残基の割合は細菌由来 RNase H の割合よりも約 10%も高いにも関わらず、埋もれた疎水性面積の割合は、古細菌由来 RNase H と細菌由来 RNase H の間で顕著な差ではなかった。これは、遅い変性反応と埋もれた疎水性残基の割合は相関するにも関わらず、埋もれた疎水性面積の割合には相関性がないことを示す。このことから、古細菌由来 RNase H の埋もれた疎水性残基の増加は疎水性面積を増やすことではなく、表面近傍の部分的に露出しているが残基全体としては埋もれている疎水性残基による疎水性相互作用の増加に寄与していると考えられる。

Table 1-4. Accessible surface and buried area of RNase H

	Tt-RNase H1	Sto-RNase H1	Tk-RNase H2
Accessible surface area of native state ( $\text{\AA}^2$ ) <sup>a</sup>			
All	8172	8384	10829
Non-polar	4545	4642	5912
Polar	3627	3742	4917
Accessible surface area of denatured state ( $\text{\AA}^2$ ) <sup>ab</sup>			
All	23441	23061	32937
Non-polar	14102	14524	20169
Polar	9339	8537	12768
Buried area in the interior of a protein ( $\text{\AA}^2$ )			
All	15269	14677	22108
Non-polar	9559	9882	14258
Polar	5712	4795	7851
Fraction of the buried area of non-polar atoms (%)	62.6	67.3	64.5

<sup>a</sup> Accessible surface area is calculated by POPS [88].

<sup>b</sup> The denatured structure is created by PyMOL [87] as a completely extended conformation.

これを確認するために、古細菌由来 Sto-RNase H1 と細菌由来 Tt-RNase H1 のアライメントを作成し、双方に共通して存在する埋もれた疎水性残基と片方にしかない埋もれた疎水性残基を検出した (Figure 1-9A)。その結果、Sto-RNase H1 にしかない埋もれた疎水性な残基は 24 残基存在するが、Tt-RNase H1 には 11 残基しか存在しない。超好熱性細菌由来 Tm-RNase H2 と Aa-RNase H2 と超好熱性古細菌由来 Tk-RNase H2 のアライメントも同じく比較したが、Tm-RNase H2 と Aa-RNase H2 に関してはその立体構造が得られていないので、埋もれている残基についての情報はない (Figure 1-9B)。しかし、Tk-RNase H2 にしかない埋もれた疎水性残基が 10 残基ある。そこで、この超好熱古細菌由来の Sto-RNase H1 と Tk-RNase H2 に観られた埋もれた疎水性残基がタンパク質の表面近傍に極在する傾向があるのか、その立体構造を比較した (Figure 1-10A、B、C)。RNase H1 では Sto-RNase H1 は Tt-RNase H1 よりも埋まっている疎水性残基が多いことがみてとれる。さらに、上述の Sto-RNase H1 にしかない埋もれた疎水性残基がタンパク質表面近傍に極在している傾向が観測できた。Tk-RNase H2 でも同じ傾向がみることができた。したがって、これらのタンパク質が示す遅い変性反応はタンパク質表面近傍に極在している埋もれた疎水性アミノ酸残基と深く関係していることが示唆できる。これは、好熱古細菌は高温環境で発生したが好熱細菌は一度低温環境に適応してから高温環境に再適応したといった宿主の進化的背景にそれらの生産するタンパク質が影響を受けているからなのかもしれない。しかし、タンパク質表面近傍の疎水性アミノ酸が変性反応を遅くしている機構はわからない。この機構は今後アミノ酸置換変異体の構築を行うことによって確かめることができるだろう。

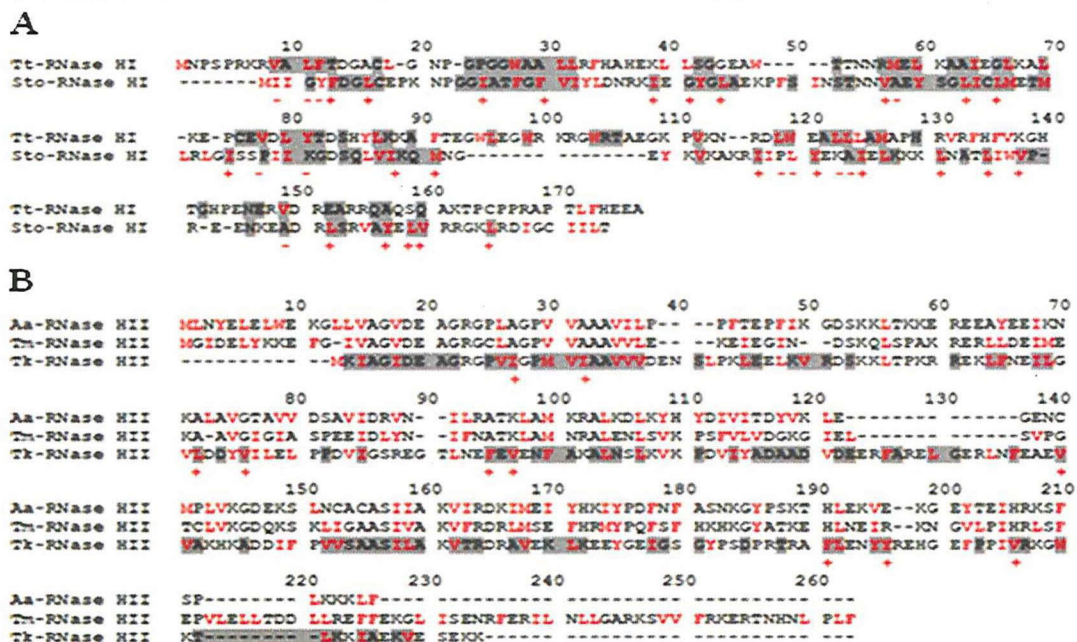


Figure 1-9. Amino acid sequence alignments of hyperstable RNase H. (A) RNase HI. (B) RNase H2. Buried residues (Tt, Sto and Tk) and hydrophobic residues are shown in gray and red, respectively. Crosses indicate buried hydrophobic residues in Sto-RNase HI and Tk-RNase H2 with non-buried or non-hydrophobic counterpart in Tt-RNase HI and Aa/Tm-RNase H2, respectively. Minuses indicate buried hydrophobic residues in Tt-RNase HI with non-buried or non-hydrophobic counterpart in Sto-RNase HI.



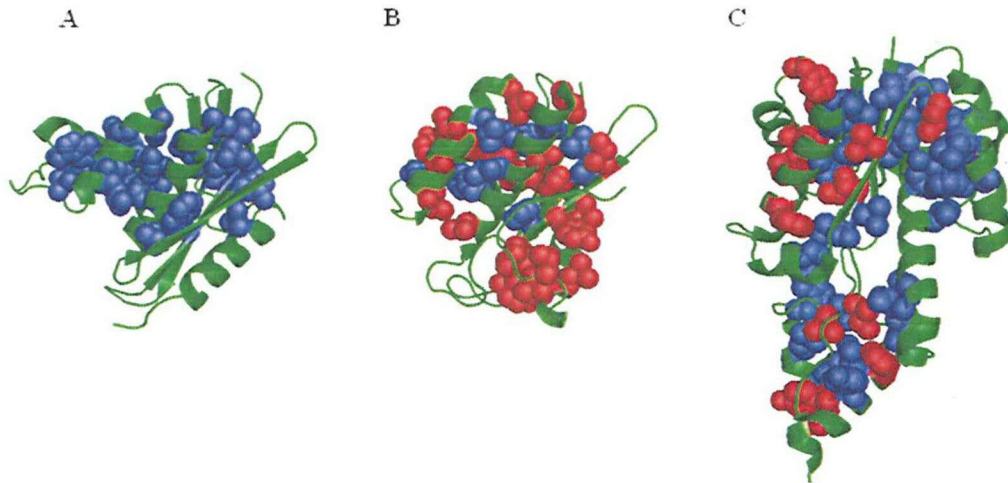


Figure 1-10. Crystal structures of hyperstable RNase H. (A) Tt-RNase HI. (B) Sto-RNase HI. (C) Tk-RNase H2. Buried hydrophobic side-chains (relative solvent accessibility less than 25%) are represented by sphere (red and blue). Red: The buried hydrophobic residues in Sto-RNase HI and Tk-RNase H2 with nonburied or nonhydrophobic counterpart in Tt-RNase HI and Aa/Tm-RNase H2. Blue: The other buried hydrophobic residues.

#### 1-5. 結論

本章では超好熱性 RNase H の平衡論的安定性と速度論的安定性の測定を行った。本章で測定されたタンパク質は進化的背景とその耐熱化機構の関係を調べるにあたって、単量体であり、可逆的な変性を示すことから優れたモデルタンパク質であることがわかった。さらに、超好熱性 RNase H の変性反応速度は宿主の進化的背景に強く依存している。これは超好熱古細菌と超好熱細菌由来タンパク質が異なった耐熱化戦略によって高温環境に適応していることを示唆する。



## 第二章 超好熱細菌由来タンパク質の構造安定性及びフォールディングに果たすプロリン残基の役割

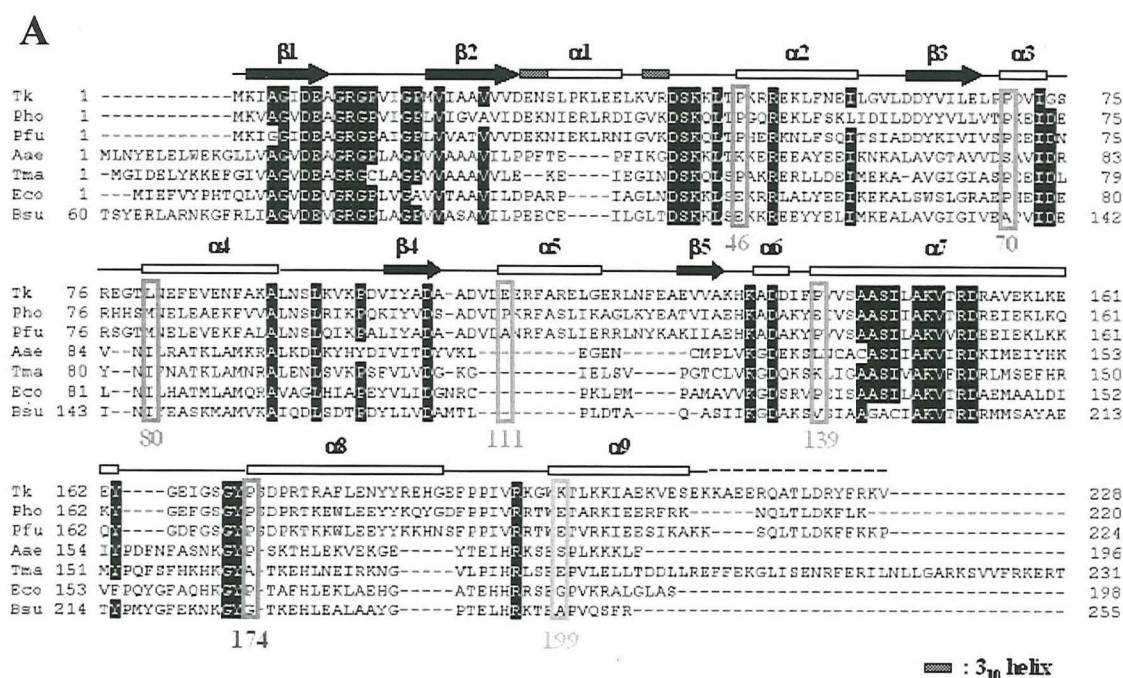
### 2-1. はじめに

タンパク質の安定化因子として、分子内のイオン結合、疎水性相互作用、S-S結合やプロリン残基による変性状態のエントロピーの減少等が挙げられている [14-17]。これらの因子は主に中温生物由来のタンパク質によって解析されており、もともと高い安定性を有する超好熱菌由来タンパク質における報告例はまだ少ない。近年、超好熱菌由来タンパク質でのイオン結合、S-S結合、疎水性相互作用の安定化因子としての役割が示唆された [35, 50, 58]。しかし、超好熱菌由来タンパク質でプロリン残基が安定化因子として働いているかはまだわかっていない。プロリン残基はその内部にあるピロリジン環が主鎖のコンフォメーションの自由度を制限するため、変性状態のタンパク質のコンフォメーションエントロピーを減少させ、天然状態との間の  $\Delta G$  を増加させることでタンパク質を安定化すると考えられている [17, 65-66]。しかし、プロリン残基は主鎖のコンフォメーションを制限することで、天然状態の立体構造にゆがみを起こすことがある。特にピロリジン環により制限された N-C $\alpha$  回転の二面角 ( $\phi, \psi$ ) の幅は  $\alpha$ -ヘリックスや  $\beta$ -シートにみられる角度と大きく違っている。そのため、 $\alpha$ -ヘリックスや  $\beta$ -シートの内部にプロリン残基が存在すると、二次構造が破壊されタンパク質が不安定化することがしばしば見受けられる [65-66]。タンパク質の安定性を向上するには天然状態でコンフォメーションにゆがみを起こさない領域にプロリン残基が配置されている必要がある。そして、 $\alpha$ -ヘリックスの N 末端領域はこの条件を満たしていることが報告されている [67-69]。

一方、第一章の結果、超好熱古細菌由来 RNase H は超好熱細菌由来 RNase H よりも遅い変性反応によって速度論的に安定化していることがわかった。その遅い変性反応は、部分的に露出した疎水性残基によって維持されていることを提案した。実際に遅い変性反応に疎水性残基が関与していることは報告されているが、この遅い変性反応が疎水性相互作用のみで維持されているかどうか明らかでない。ここで、超好熱古細菌由来 Tk-RNase H2 には、 $\alpha$ -ヘリックス N 末端領域にプロリン残基が配置されている箇所が 5 つあることが結晶構造からわかっている。しかし、超好熱細菌由来 Tm-RNase H2 では Tk-RNase H2 のもつ 5 つの箇所うちの 2 つの箇所しかプロリン残基は配置されていない (Figure 2-1A)。したがって、古細菌由来 Tk-RNase H2 の遅い変性反応はこのプロリン残基による影響も受けているのかもしれない。

そこで本章では、Tk-RNase H2 の  $\alpha$ -ヘリックス N 末端領域にプロリン残基を導入した変異体 (L80P, E111P, K199P)、 $\alpha$ -ヘリックス N 末端領域に存在するプロリン残基のうち Tm-RNase H2 にも保存されているプロリン残基をアラニン残基に置換した変異体 (P46A, P70A)、保存されていないプロリン残基をアラニン残基に置換した変異体 (P139A, P170A)、および、それらを組み合わせた二重変異体 (E111P/K199P, P46A/P70A) を構築し (Figure 2-1B)、これら

の変異体の安定性を解析することにより、 $\alpha$ ヘリックス N 末端領域のプロリン残基が、高い安定性を有する超好熱古細菌由来 Tk-RNase H2においても中温生物由来タンパク質における場合と同様に安定化因子として機能するか、速度論的安定性にどのような影響を及ぼすか調べた。



Tk: *Thermococcus kodakaraensis*, Pho: *Pyrococcus horikoshii*, Pfu: *Pyrococcus furiosus*, Aae: *Aquifex aeolicus*, Tma: *Thermotoga maritima*, Eco: *Escherichia coli*, Bsu: *Bacillus subtilis*

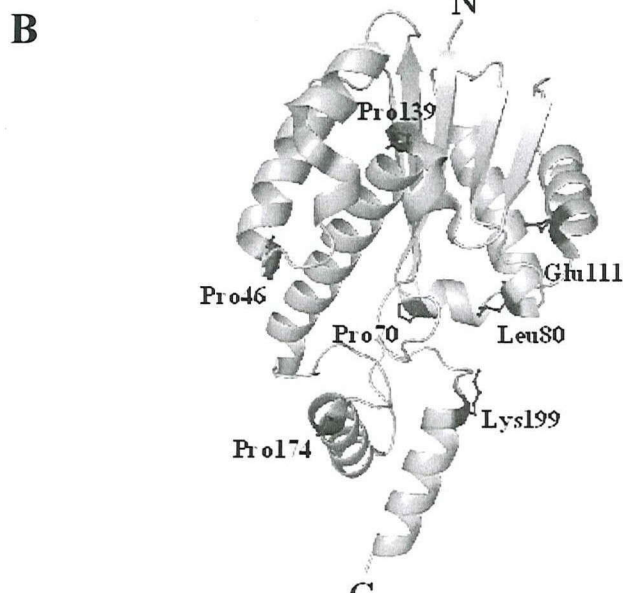


Figure 2-1. (A) Alignment of the amino acid sequences of RNase H2 [87]. Secondary structures of Tk-RNase H2 are depicted above the sequences. The amino acid residues that are conserved in at least six different proteins are highlighted in black. The positions that are replaced in this work are indicated by boxes. Tk, Pho, Pf, Aa and Tm are hyperthermophiles; Ec and Bsu are mesophiles. (B): Crystal structure of Tk-RNase H2 depicting the side-chains of the residues that has been substituted.

## 2-2. 実験材料及び方法

### 2-2-1. 大量発現および精製

それぞれの変異体の大量発現および精製は野生型と同様の手順で行った [21]。タンパク質の純度は 15%SDS-PAGE に供し、Coomassie Brilliant BlueR250 で染色することで判定した。

### 2-2-2. タンパク質濃度

それぞれの変異体のタンパク質濃度は野生型と同様に、波長 280 nm における Tyr と Trp の値 1,576、5,225 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> を用いて算出した吸光係数  $A_{280}^{0.1\%}=0.63$  を用いて決定した [61]。

### 2-2-3. CD スペクトル測定

CD スペクトルは第一章と同様の方法で測定した。バッファーには 20 mM Tris-HCl (pH 9.0) を用いた。CD スペクトル測定は光路長 2 mm のセルを用いてタンパク質濃度 0.16 mg mL<sup>-1</sup> で行った。

### 2-2-4. 熱変性測定

CD スペクトルによる熱変性測定は第一章で述べた方法で行った。バッファーには 20 mM Tris-HCl (pH 9.0) を用いた。CD スペクトル測定は光路長 2 mm のセルを用いてタンパク質濃度 0.16 mg mL<sup>-1</sup> で行った。

### 2-2-5. GdnHCl 変性による平衡論的安定性測定

GdnHCl 変性による平衡論的安定性は第一章で述べた方法で行った。バッファーには 20 mM Tris-HCl (pH 9.0) を用いた。CD スペクトル測定は光路長 2 mm のセルを用いてタンパク質濃度 0.16 mg mL<sup>-1</sup> で行った。

### 2-2-6. GdnHCl 変性による速度論的安定性測定

GdnHCl 変性による速度論的安定性は基本的には第一章で述べた方法で行った。バッファーには 20 mM Tris-HCl (pH 9.0) を用いた。CD スペクトル測定は光路長 10 mm のセルを用いてタンパク質濃度 0.03 mg mL<sup>-1</sup> で行った。ただし、復元反応は 4 M GdnHCl であらかじめ変性させておいたタンパク質溶液を GdnHCl を含む溶液で 10 倍希釈することで行った。得られた見かけの反応速度定数 ( $k_{app}$ ) の GdnHCl 濃度依存性を以下に示す式 (6) で近似した。

$$\ln k_{app} = \ln \{k_r(\text{H}_2\text{O}) \exp(-m_r[\text{D}]) + k_u(\text{H}_2\text{O}) \exp(m_u[\text{D}])\} \quad (6)$$

ここで、[D]は GdnHCl 濃度であり、 $k_r(\text{H}_2\text{O})$ そして  $k_u(\text{H}_2\text{O})$ はそれぞれ水中での変性反応、復元反

応の速度定数である。 $m_r$ と $m_u$ はそれぞれ $\ln k_r$ と $\ln k_u$ をGdnHCl濃度に対して直線近似したときの傾きを示している。

### 2-3. 実験結果

#### 2-3-1. CD スペクトル測定

変異体のFar-UV CD スペクトルの測定を行った (Figure 2-2A)。得られた変異体タンパク質の波形はすべて野生型と同様であった。これらの結果はTk-RNase H2の全体構造は変異により大きな影響を受けていないことを示した。

#### 2-3-2. 熱変性測定

変異体の熱変性を波長 220 nm の CD 値の変化を追跡することで調べた (Figure 2-2B)。いずれの変異体も野生型タンパク質と同様に高い可逆性を示し、二状態転移であった。変異体の $T_m$ 値はTable 2-1にまとめた。 $\alpha$ ヘリックスN末端にプロリン残基を導入した変異体のうちE111P、K199Pの $T_m$ 値は野生型(84.7°C)と比較して1.8、1.9°C上昇した。しかし、L80Pは0.4°C低下した。 $\alpha$ ヘリックスN末端のプロリン残基をアラニン残基に置換した変異体のうちP46A、P70A、P174Aの $T_m$ 値は野生型と比較して0.8、0.5、1.7°C低下した。しかし、P139Aはほぼ変わらなかった。 $\alpha$ ヘリックスN末端にプロリン残基を導入した変異体E111PとK199Pを組み合わせた二重変異体E111P/K199Pは野生型に比べて3.0°C安定化した。一方、 $\alpha$ ヘリックスN末端のプロリン残基をアラニン残基に置換した変異体P46A、P70Aを組み合わせた二重変異体P46A/P70Aは野生型に比べて1.8°C不安定化した。これらの結果より、 $\alpha$ ヘリックスN末端のプロリン残基はTk-RNase H2を安定化していることがわかった。

#### 2-3-3. 速度論的安定性測定

変異体の速度論的安定性を調べるために変性、復元反応の速度実験を行った。すべての変性、復元反応は一次の指数関数に近似できた。変異体タンパク質のGdnHCl変性による変性、復元反応の見かけの反応速度定数( $k_{app}$ )の対数値のGdnHCl濃度依存性をFigure 2-2Cに示した。さらに、式(6)を用いてGdnHCl変性による変性、復元反応の速度論的パラメータを算出しTable 2-2にまとめた。全ての変異体タンパク質において、その変性、復元反応に大きな変化はなく、 $\alpha$ ヘリックスN末端領域のプロリン残基はTk-RNase H2のフォールディングにはあまり寄与していなかった。

#### 2-3-4. 平衡論的安定性測定

熱変性測定の結果より、E111P/K199P、P46A/P70Aの $T_m$ 値には他の一塩基変異体よりも大きな変化が確認された。そこで、GdnHCl変性を波長 220 nm の CD 値を追跡することで二重変異

体 E111P/K199P、P46A/P70A の平衡論的安定性を調べた (Figure 2-2D)。双方とも反応が平衡に達するまで3週間かかり、その変性反応は可逆的であった。野生型タンパク質に対してE111P/K199Pの  $\Delta G(H_2O)$ は  $5.5 \text{ kJ mol}^{-1}$  増加しており、P46A/P70Aの  $\Delta G(H_2O)$ は  $3.7 \text{ kJ mol}^{-1}$  減少していた。この結果は熱変性測定の結果と一致している。

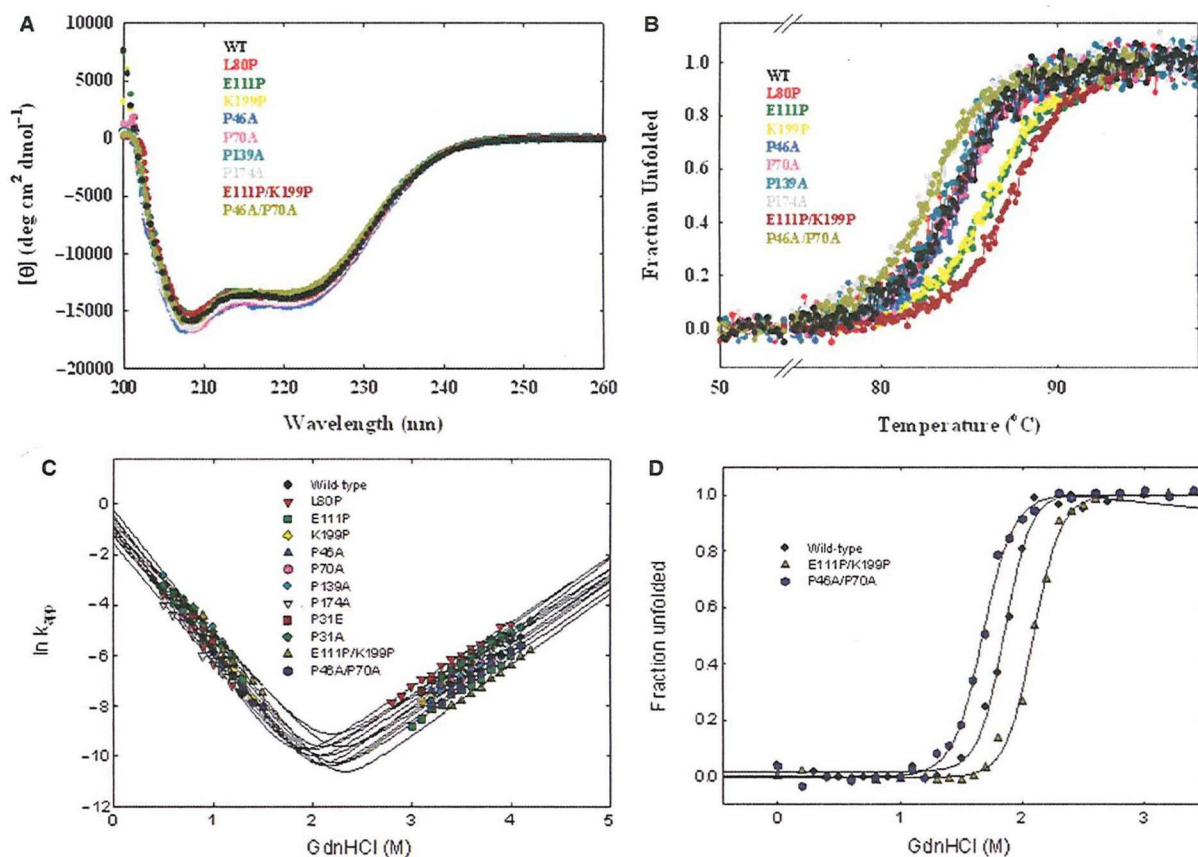


Figure 2-2. (A) CD spectra of the wild-type (WT) and mutant proteins of Tk-RNase H2 at pH 9.0 and 25 °C. (B) Heat-induced unfolding curves of the wild-type (WT) and mutant proteins of Tk-RNase H2 at pH 9.0. (C) GdnHCl concentration dependence of the logarithms of the apparent rate constant ( $k_{app}$ ) of unfolding and refolding kinetics of the wild-type and mutant proteins of Tk-RNase H2 at pH 9.0 and 50 °C. The lines are best fits to Eq. (6). (D) GdnHCl-induced unfolding curves of the wild-type and mutant proteins of Tk-RNase H2 at pH 9.0 and 50 °C. The lines represent the fit of Eq. (1).

Table 2-1.  $T_m$  value of the wild-type and mutant proteins of Tk-RNase H2 at the scan rate of  $1\text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$  at pH 9.0.

	$T_m^a$ ( $^\circ\text{C}$ )	$\Delta T_m^b$ ( $^\circ\text{C}$ )
Wild-type	84.5	-
L80P	84.1	-0.4
E111P	86.4	1.9
K199P	86.3	1.8
P46A	83.7	-0.8
P70A	84	-0.5
P139A	84.6	0.1
P174A	82.8	-1.7
E111P/K199P	87.5	3
P46A/P70A	82.7	-1.8

<sup>a</sup> The error is  $\pm 0.2\text{ }^\circ\text{C}$ .

<sup>b</sup>  $\Delta T_m = T_m(\text{mutant}) - T_m(\text{wild-type})$ .

Table 2-2. Kinetic parameters for GdnHCl-induced unfolding and refolding of the wild-type and mutant proteins of Tk-RNase H2 at  $50^\circ\text{C}$  and pH 9.0.

	$k_u(\text{H}_2\text{O})$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$m_u^a$ ( $\text{M}^{-1}\text{ s}^{-1}$ )	$k_r(\text{H}_2\text{O})$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$m_r^a$ ( $\text{M}^{-1}\text{ s}^{-1}$ )
Wild-type	$5.0 \times 10^{-8}$	2.8	0.78	5.5
L80P	$3.0 \times 10^{-7}$	2.6	0.37	5.2
E111P	$5.4 \times 10^{-8}$	2.7	0.8	4.5
K199P	$4.7 \times 10^{-8}$	2.9	0.61	5.2
P46A	$1.5 \times 10^{-7}$	2.6	0.46	4.5
P70A	$6.2 \times 10^{-8}$	2.7	0.65	4.4
P139A	$6.3 \times 10^{-8}$	2.8	0.72	4.3
P174A	$3.3 \times 10^{-7}$	2.4	0.21	3.3
E111P/K199P	$2.3 \times 10^{-8}$	2.8	0.77	4.9
P46A/P70A	$5.1 \times 10^{-8}$	2.7	0.32	4.7

<sup>a</sup> The error is  $\pm 0.1\text{ M}^{-1}\text{ s}^{-1}$ .

Table 2-3. Thermodynamic parameters for GdnHCl-induced unfolding of the wild-type and mutant proteins of Tk-RNase H2 at 50 °C and pH 9.0.

	$C_m^a$ (M)	$m$ (kJ mol <sup>-1</sup> M <sup>-1</sup> )	$\Delta G(H_2O)$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$\Delta\Delta G(H_2O)^b$ (kJ mol <sup>-1</sup> )
Wild-type	1.85	23.6 ± 2.8	43.6 ± 5.1	
E111P/K119P	2.09	23.7 ± 1.1	49.6 ± 2.4	5.5
P46A/P70A	1.68	21.5 ± 1.2	36.1 ± 2.8	-3.9

<sup>a</sup> The error is ± 0.10 M.

<sup>b</sup>  $\Delta\Delta G(H_2O) = m_{av} (C_m[\text{mutant}] - C_m[\text{wild-type}])$ .  $m_{av} = 22.9 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ M}^{-1}$ .

## 2-4. 考察

超好熱古細菌由来 Tk-RNase H2 は高い平衡論的安定性と速度論的安定性を有することが報告されている [21]。一方、第一章により、超好熱細菌由来 Tm-RNase H2 は宿主の進化的背景から高い平衡論的安定性を有するにも関わらず、速度論的安定性を示さない。また、Tk-RNase H2 には  $\alpha$  ヘリックス N 末端領域にプロリン残基が配置されている箇所が 5 つあるにも関わらず、Tm-RNase H2 には 2 つしかない。したがって、 $\alpha$  ヘリックス N 末端領域のプロリン残基が高い安定性を有するタンパク質においても中温生物由来タンパク質と同じく安定化因子として働くならば、Tk-RNase H2 の高い速度論的安定性の原因の一つであるのかもしれない。そこで Tk-RNase H2 の  $\alpha$  ヘリックス N 末端領域にプロリン残基を導入した変異体 (L80P、E111P、K199P)、プロリン残基に置換した変異体 (P46A、P70A、P139A、P170A)、および、それらを組み合わせた二重変異体 (E111P/K199P、P46A/P70A) を解析し、Tk-RNase H2 におけるプロリン残基の熱安定性や速度論的安定性に与える影響を考察した。

### 2-4-1. プロリン残基が超好熱菌由来タンパク質の熱力学的安定性におよぼす影響

中温生物由来タンパク質において、 $\alpha$  ヘリックス N 末端領域に配置されるプロリン残基がタンパク質の安定性に重要な役割を果たしていることが知られている。例えば、*Bacillus cereus* 由来 oligo-1,6-glucosidase にプロリン残基を導入した実験では、残基あたり 0.4~1.4°C の  $T_m$  値の上昇が報告された [68]。これは、プロリン残基のピロリジン環が主鎖のコンフォメーションの自由度を制限するためと考えられている。プロリン残基は変性状態のタンパク質のコンフォメーションエントロピーを減少させ、結果的に天然状態と変性状態の間の  $\Delta G$  を増加させることでタンパク質を安定化する [65-66]。しかし、タンパク質が天然状態のとき、プロリン残基は主鎖のコンフォメーションを制限することで、タンパク質の立体構造にひずみを起こしタンパク質を不安定化する場合もある。このため、タンパク質の安定性を向上させるには天然状態でコンフォメー



ジョンにひずみをおこさない部位にプロリン残基を配置する必要がある。 $\alpha$ ヘリックスの N 末端領域はこの条件を満たしていると考えられている [67-69]。しかし、プロリン残基の  $\alpha$ ヘリックス N 末端領域への導入によって超好熱菌由来タンパク質も同様に安定化するかはまだわかっていない。

超好熱古細菌由来 Tk-RNase H2 の  $\alpha$ ヘリックスの N 末端領域にプロリン残基を導入した変異体は、L80P を除いて  $T_m$  値が 1.8~2.0°C 増加した。一方、プロリン残基を置換した変異体は P139A を除いて  $T_m$  値が 0.5~1.8°C 減少した。さらに二重変異体 E111P/K199P と P46A/P70A の安定性は加算的な変化を示した。この結果から  $\alpha$ ヘリックス N 末端領域のプロリン残基は高い安定性を示す超好古細菌由来タンパク質でも安定化に寄与することがわかった。さらに、Tk-RNase H2 におけるプロリン残基導入による安定性の増加 (1.8~2.0°C) は *Bacillus cereus* 由来 oligo-1,6-glucosidase (0.4~1.4°C) と比較して大きかった [68]。これはプロリン残基による安定性への影響はエントロピーに起因する効果であり、そのエントロピーの効果が温度に強く依存するためなのかもしれない。しかし、本章で測定したプロリン変異体の安定性への効果は超好熱古細菌由来 Tk-RNase H2 の高い安定性と比較するとそれほど大きな効果ではなかった。 $\alpha$ ヘリックス N 末端領域のプロリン残基による安定化は、超好熱古細菌由来タンパク質の非常に高い安定性に部分的に貢献しているのかもしれない。

ここで、各プロリン残基変異体による安定性への影響に注目した。以前よりプロリン残基の安定性への効果は、そのプロリン残基が配置された環境によって大きく影響されることが報告されている [70-71]。その中で、プロリン残基の配置された部位における二面角の影響、溶媒露出表面積 (ASA)、主鎖の柔軟性 (B-factor) に注目した。本章で構築した各変異体の野生型の変異部位にあたる位置の二面角、ASA、B-factor を Table 2-4 にまとめた。その結果、すべての変異体はプロリン残基の許容できる二面角の範囲 ( $\phi = -63 \pm 15^\circ$ ,  $\psi = -30 \pm 20^\circ$ ) に収まっていた。しかし、プロリン残基を導入した変異体のうち E111P と K199P の安定性は上昇したが、L80P は不安定化していた。そこで、L80P 変異体のプロリンの導入領域の ASA と B-factor を E111P、K199P と比較すると、L80P 変異体のプロリンの導入領域は E111P、K199P と比較して小さい ASA と高い B-factor を示した。これは、導入したプロリン残基の影響が、その導入した領域の柔軟性が低かったために全体構造を歪めてしまい安定化効果を打ち消されてしまったか、80 番目のロイシン残基によって形成されている疎水性コアを壊してしまい安定化効果を打ち消してしまったかのどちらかであると考えられる。さらに、プロリン残基を置換した変異体のうち P46A、P70A、P174A は不安定化したが P139A は不安定化しなかった。したがって、139 番目のプロリン残基は、もともと立体構造全体に歪みを与えていたのかもしれない。一方、P174A はもともと安定化し、その B-factor と ASA は大きかった。そのため、この部位はプロリン残基の配置されている中でも最も全体構造に歪みを与えずにプロリン残基によって安定化している部位であると考えられる。



Table 2-4. Structural characteristics at the N-terminal mutation sites of  $\alpha$ -helices in Tk-RNase H2

	Secondary structure <sup>a</sup>	$\phi^b$ (°)	$\psi^b$ (°)	ASA <sup>c</sup> (%)	B / Bav <sup>d</sup>
Leu80	H(80-94)	-64.3	-36.7	30.7	0.9
Glu111	H(111-120)	-58.1	-45.3	39.1	1.37
Lys199	H(199-121)	-57.7	-25.3	82.6	1.46
Pro46	H(46-57)	-54.1	-36.3	60.3	1.03
Pro70	H(70-74)	-54	-23.2	19.5	0.83
Pro139	H(139-163)	-53.1	-34.8	46.4	0.79
Pro174	H(174-187)	-48.9	-45	73.8	1.26

<sup>a</sup> Abbreviation of secondary structure: H, helix. Numbers in parentheses represent the range of the particular element of the secondary structure.

<sup>b</sup> Dihedral angle values for the residues in the wild-type protein.

<sup>c</sup> Accessible surface area.  $ASA(\%) = (ASA_{fold} / ASA_{extend}) \times 100$ .  $ASA_{extend}$  is the ASA value of the extended conformation as the reference value for the dependent state, assuming that these atoms in the denatured state should be fully exposed to solvent. The ASA values are calculated using the procedure described by Connolly [90] with probes of 1.4 Å<sup>2</sup> [91].

#### 2-4-2. プロリン残基が超好熱古細菌由来タンパク質の遅い変性反応に与える影響

超好熱菌由来タンパク質がその中温生物由来ホモログタンパク質に比べて、一般に非常に遅い変性反応を示すことが報告されている [47,56]。この遅い変性反応の機構についてはまだ解明されていない。近年、この遅い変性反応に疎水性相互作用が強く関係していることが報告されたが [35]、疎水性相互作用のみの影響で遅い変性反応が維持されているかどうか明らかでない。そこで、プロリン残基が遅い変性反応にどのように影響しているかを調べた。その結果、超好熱古細菌の  $\alpha$ -ヘリックスN末端領域のプロリン残基は遅い変性に与える影響が小さいことがわかった。さらに、 $\alpha$ -ヘリックスN末端領域のプロリン残基は古細菌由来Tk-RNase H2と細菌由来Tm-RNase H2の変性反応の速度が大きく異なる原因ではなかった。これは、プロリン残基による安定化は主に変性状態のタンパク質に寄与する影響であって、天然構造にあまり影響しないためと考えられる。これにより、天然状態の疎水性相互作用や水素結合などのエンタルピックな影響は遅い変性反応に強い影響を与えるが、変性状態におけるプロリン残基やジスルフィド結合等のエントロピックな影響は遅い変性反応にあまり影響を及ぼさないことが示唆された。

#### 2-4-3. 超好熱タンパク質の安定化

プロリン残基変異体 E111P、K199P、E111P/K199P は野生型 Tk-RNase H2 よりも高い安定性を示した。つまり、アミノ酸残基 111 番目と 199 番目に配置されたグルタミン酸とリシンはどちらも構造安定性の観点からみれば至適でないことが示された。このことから、超好熱タンパク質は安定性を宿主の生存環境に合わせて調節していると考えられる。E111P の変異は Tk-RNase H2 を安定化する。このアミノ酸残基 111 番目の部位には、Tk-RNase H2 の宿主よりも生育温度が高

い *Pyrococcus holikoshii* 由来 RNase H2 (Pho-RNase H2) ではプロリン残基が配置されている [72, 73]。したがって、このアミノ酸残基 111 番目のプロリン残基は Pho-RNase H2 でも Tk-RNase H2 と同様にタンパク質を安定化していると思われる。一方、Tk-RNase H2 のアミノ酸残基 139 番目のプロリンは Pho-RNase H2 ではグルタミン酸である。しかし、この部位のアミノ酸を Tk-RNase H2 でプロリン残基に変えても安定性に大きな影響はなかった。これは、Pho-RNase H2 でも安定性にはあまり影響していないことを示唆している。ここで、Tk-RNase H2 でプロリンに置換したアミノ酸残基 199 番目の部位には、他の超好熱性 RNase H2 でプロリンは配置されていなかった。この部位へのプロリン導入による安定化は、本章で新たに発見されたのである。これらのように、様々な RNase H2 のプロリン残基の比較により、他の RNase H2 もプロリン置換によって安定化することができるであろう。

## 2-5. 結論

本章では、 $\alpha$ ヘリックス N 末端領域のプロリン残基が、超好熱古細菌由来タンパク質の熱安定性や変性、復元機構にどのような影響をおよぼすか調べた。その結果、 $\alpha$ ヘリックス N 末端領域のプロリン残基は、非常に高い安定性を有する Tk-RNase H2 においても中温生物由来タンパク質における場合と同様に加算的な安定性への寄与を示した。特に、柔軟性の高い領域に存在するプロリン残基はそのタンパク質の安定性を効果的に上げることがわかった。しかし、これらのプロリン残基は Tk-RNase H2 の遅い変性反応には疎水性相互作用のような大きな影響を与えなかった。

#### 3-1. はじめに

タンパク質は変性状態と天然状態の間で様々な中間体構造を形成する [74-77]。そして、それらの構造を観測することでタンパク質のフォールディング、アンフォールディング機構の理解は大きく前進すると考えられている。今日までに、中間体構造が円偏光二色性、蛍光分光、X 線小角散乱および NMR といった物理化学的手法によって観測された [3-9]。しかし、タンパク質のフォールディングやアンフォールディングの過程は一般的に非常に速い反応過程であり、また、多くの中間体は構造上非常に不安定であることから、十分なデータを取ることは非常に難しい。ここで、第一章で示したように、いくつかの超好熱古細菌由来タンパク質は遅い変性反応によって高い安定性を示すことがわかっている。この遅い変性反応は、変性過程が非常に速い反応であるために観測しにくかった中間体の構造を観測するうえで役立つかもしれない。実際に近年の報告では、遅い変性速度を示す超好熱古細菌由来の Pf-PCP の変性過程をリアルタイム NMR 法によって観測し、いくつかの中間体構造の高い協同性を確認している [53]。

そこで本章では、4 M GdnHCl 存在下でも遅い変性反応を示す Tk-RNase H2 と Tm-RNase H2 を変性させ、その遅い変性反応の過程を pulse proteolysis 法を応用した新しい手法を用いて解析した。Pulse proteolysis 法とは、変性剤変性によって天然状態と変性状態タンパク質の混在した溶液中の変性状態タンパク質のみをプロテアーゼにより分解し、溶液中の天然状態タンパク質との存在比を検出する解析法である [78-81]。新しい手法では、目的タンパク質の全体的に高度な安定性を有した構造が、その遅い変性過程で形成した中間体構造の部分的に変性、あるいは、不安定化した領域のみをプロテアーゼにより分解することで、中間体構造の観測を行った。しかし、一般に遅い変性反応を示すタンパク質は高い安定性を有しており、変性させるには高い変性剤濃度が必要となる。このため、既存の pulse proteolysis 法で用いる中温菌由来のプロテアーゼでは変性剤により活性が失われてしまう。そこで、本手法では高い変性剤濃度でも活性を維持する超好熱古細菌由来 Tk-subtilisin [48] を使用し、高い変性剤濃度中の Tk-RNase H2 と Tm-RNase H2 の遅い変性過程を観察する。Tk-subtilisin は高い濃度の GdnHCl 存在下でも活性を保持することができる超安定なプロテアーゼであり、本手法の実験条件に耐えうる貴重なプロテアーゼである。

## 3-2. 実験材料及び方法

### 3-2-1. プラスミド構築

Fragment 22 (1-197 残基)、20 (1-176 残基)、17 (1-144 残基)、9 (145-228) を大量発現するために使用したプラスミドは pJAL700K [21] を用いて標準的な遺伝子組み換え技術に従って構築した。

### 3-2-2. 大量発現と精製

Tk-RNase H2、Tk-subtilisin の大量発現および精製は既報に従って行った [21, 48]。Tm-RNase H2 の大量発現および精製は第一章の方法に従って行った。Fragment 22、20、17、9 の大量発現および精製は Tk-RNase H2 と同じ方法で行った。タンパク質の純度は 15%SDS-PAGE に供し、Coomassie Brilliant BlueR250 で染色することで判定した。

### 3-2-3. タンパク質濃度

Tk-RNase H2、Tm-RNase H2、Tk-subtilisin、fragment 20、17、9 のタンパク質濃度は、波長 280 nm における Tyr と Trp の値 1,576、5,225  $M^{-1} cm^{-1}$  を用いて算出した吸光係数  $A_{280}^{0.1\%} = 1.6$ 、0.2、1.2、0.3、0.2、1.3 を用いて計算した [61]。

### 3-2-4. CD スペクトル測定

CD スペクトルは第一章で述べた方法で行った。バッファーには 20 mM Tris-HCl (pH 9.0) を用いた。測定は光路長 2 mm のセルを用いてタンパク質濃度 0.16  $mg mL^{-1}$  で行った。

### 3-2-5. GdnHCl 変性による速度論的安定性測定

GdnHCl 変性による速度論的安定性は基本的には第一章で述べた方法で行った。バッファーには 20 mM Tris-HCl (pH 9.0) を用いた。CD スペクトル測定は光路長 10 mm のセルを用いてタンパク質濃度 0.03  $mg mL^{-1}$  で行った。

### 3-2-6. Tk-subtilisin による天然状態、変性状態タンパク質に対する pulse proteolysis 法

天然状態、変性状態タンパク質に対する pulse proteolysis 実験の基本操作については Figure 3-1A にまとめている。20 mM Tris-HCl buffer (pH 9.0) に溶解した天然状態タンパク質と、4 M GdnHCl 含む 20 mM Tris-HCl buffer (pH 9.0) に溶解し一晩静置した変性状態タンパク質をそれぞれ 50  $\mu l$  ずつ反応容器に取り分け、それぞれの反応容器に 2  $\mu l$  の 10 mM acetate buffer (pH 5.0) に溶解した各濃度の Tk-subtilisin を加えた。45 s 反応した後、各反応容器に 10% (w/v) TCA を 1 ml 加えた。10% (w/v) TCA により沈殿したタンパク質を 70% アセトンによって洗い、15% tricine-SDS-PAGE [82] によって観測した。反応は 25°C で行った。

### 3-2-7. Tk-subtilisin による遅い変性反応に対する pulse proteolysis 法

遅い変性反応に対する pulse proteolysis 実験の基本操作については Figure 3-1B にまとめている。変性反応は、タンパク質を 4 M GdnHCl 含む 20 mM Tris-HCl buffer (pH 9.0) に溶解することで行った。変性反応溶液を 50  $\mu$ l ずつ酵素反応容器に取り分けた。各反応時間の変性反応溶液に 2  $\mu$ l の 10 mM acetate buffer (pH 5.0) に溶解した各濃度の Tk-subtilisin を加えた。45 s 反応した後、各反応容器に 10% (w/v) TCA を 1 ml 加えた。10% (w/v) TCA により沈殿したタンパク質を 70% アセトンによって洗い、15% tricine-SDS-PAGE [82] によって観測した。反応は 25°C で行った。

### 3-2-8. N 末端配列決定及び質量分析

タンパク質の N 末端配列決定は model 491 Procise automated sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA) により行った。タンパク質の質量分析は matrix-assisted laser desorption ionization reflection-type time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometers, Autoflex and Ultraflex (Bruker Daltonik) によって行った。

### 3-2-9. 熱変性測定

CD スペクトルによる熱変性測定は第一章で述べた方法で行った。バッファーには 20 mM Tris-HCl (pH 9.0) を用いた。CD スペクトル測定は光路長 2 mm のセルを用いてタンパク質濃度 0.16 mg mL<sup>-1</sup> で行った。

### 3-2-10. Anilino-8-naphthalenesulfonic acid (ANS) 蛍光スペクトル測定

ANS 蛍光スペクトル測定は RF-5300PC spectrofluorophotometer (Shimadzu) により行った。タンパク質と ANS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) の結合は異なる温度での ANS 蛍光スペクトルを測定することで解析した。測定溶液は 20 mM Tris-HCl buffer (pH 9.0) にタンパク質 (10  $\mu$ M) と ANS (500  $\mu$ M) を溶解することで作製した。各測定溶液は測定温度で 3 h おいた後、ANS 蛍光スペクトルを測定した。測定は励起光 380 nm、測定範囲 400-600 nm で行った。

### 3-2-11. $\Delta G(H_2O)$ の温度依存性曲線

$\Delta G(H_2O)$  の温度依存性曲線は第一章と同様に近似した。

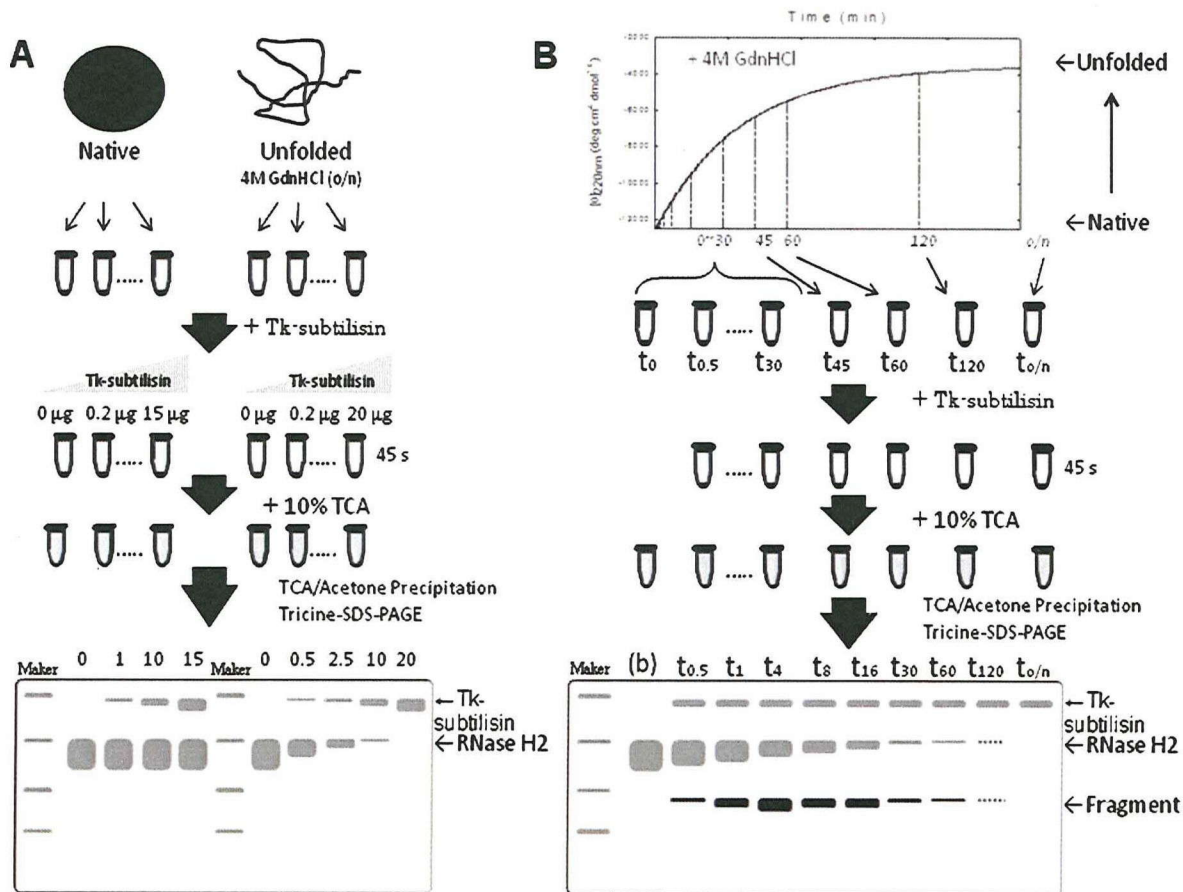


Figure 3-1. Schematic diagram of pulse proteolysis. (A) Pulse proteolysis of native and unfolded proteins by Tk-subtilisin. Native protein and unfolded protein were dispensed into tubes. Proteolysis was performed via addition of Tk-subtilisin (0–20  $\mu\text{g}$ ) and incubation for 45 s. The reaction was quenched by 10% TCA, and the products were quantified by tricine–SDS–PAGE. (B) Pulse proteolysis of kinetic unfolding by Tk-subtilisin. The native protein was unfolded by 4 M GdnHCl. At each time point, the sample was dispensed into a tube, and proteolysis was performed and analyzed as described for panel A.

### 3-3. 実験結果

Tk-RNase H2の変性速度は、その非常に遅い変性反応のために主に50°Cで測定されていた [21]。しかし、本章ではTm-RNase H2の変性過程と比較するため、25°CでのTk-RNase H2の変性過程を詳細に観測した。その結果、Tk-RNase H2の変性反応の過程に50°Cでの測定では観測できなかった中間体構造が存在することがわかった。

#### 3-3-1. Tk-RNase H2のfar-UV CDスペクトルとCDによる遅い変性反応の測定

Tk-RNase H2のGdnHCl存在下、非存在下でのFar-UV CDスペクトルを25°Cで測定した (Figure 3-2A)。スペクトルはそれぞれのタンパク質の天然状態、GdnHCl存在下での変性状態を示している。さらに、Tk-RNase H2の変性速度を求めるために変性反応の速度実験を行った。反応はタンパク質溶液に終濃度が任意のGdnHCl濃度になるようにあらかじめ計算された量のGdnHCl溶液を瞬時に加え攪拌することによって行った。その変性過程は波長220 nmのCD値の変化を追跡することで調べた (Figure 3-2B)。その結果、Tk-RNase H2の変性過程で測定したdead time (~2 s) にバースト相が観測された。このバースト相は天然状態と変性状態のCD値の総変化のうちの約30%をしめていた。しかし、バースト相以降の遅い変性反応は一次の指数関数に近似でき、その変性速度は $4.2 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  (Table 3-1) であり、変性反応は約4 hで完了した。

#### 3-3-2. Tk-RNase H2のTk-subtilisin耐性

Tk-subtilisinによるTk-RNase H2の遅い変性過程の観測をするために、天然状態のTk-RNase H2は全く切断されないが、変性状態のTk-RNase H2 (4 M GdnHClにより変性) は完全に切断、分解されるTk-subtilisinの濃度を検索した。まず、天然状態と変性状態のTk-RNase H2 (112 µg) を、0.2-15 µgと0.2-20 µgのTk-subtilisinと混合し45 s反応した後、tricine-SDS-PAGEによって観測した (Figure 3-2C)。その結果、天然状態のTk-RNase H2と各濃度のTk-subtilisinを反応させたサンプルでは、tricine-SDS-PAGE上でTk-RNase H2の分解物 (fragment) を示すバンドの観測はできなかった。したがって、本条件では天然状態のTk-RNase H2は、いずれの濃度のTk-subtilisinに対しても完全な耐性を示した。一方、変性状態のTk-RNase H2と各濃度のTk-subtilisinを反応させたサンプルでは、tricine-SDS-PAGE上でいくつかのバンドが観測できた。バンドはTk-subtilisinが0.2 µgの条件で約17 kDa (fragment A)、15 kDa (fragment B)の位置に観測でき、さらに、Tk-subtilisinが2.5 µgの条件になると、約14 kDa (fragment C)、9 kDa (fragment D)の位置にも観測できた。これらのバンドは、Tk-RNase H2が4 M GdnHClによる変性では完全に変性せず部分的に構造が残っていたためにTk-subtilisinによって分解されなかったのかもしれない。しかし、Tk-subtilisinが20 µgの条件では、これらの4つバンドとTk-RNase H2のバンドはほとんど確認できなかった。特に、Tk-RNase H2のバンドはTk-subtilisinが10 µgのときではすでに確認できなくなっていた。

以上の結果より、4 M GdnHCl 存在下で Tk-subtilisin が十分な活性を示すこと、Tk-RNase H2 (112  $\mu\text{g}$ ) は変性状態では 10  $\mu\text{g}$  の Tk-subtilisin によって完全に分解されるが、天然状態では分解されないことがわかった。これは、本手法において Tk-RNase H2 と Tk-subtilisin は有効なタンパク質であることを示している。

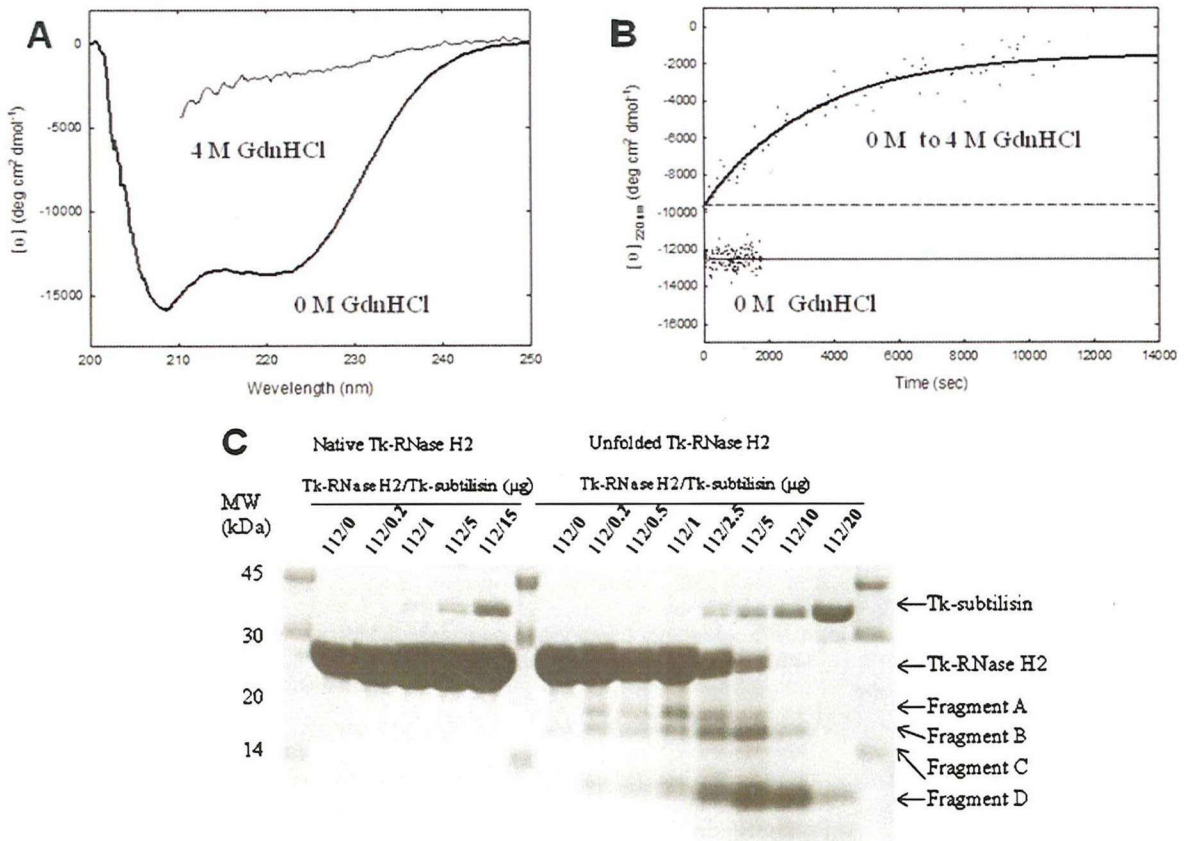


Figure 3-2. CD analysis and pulse proteolysis of native and unfolded states of Tk-RNase H2 at 25 °C. (A) Far-UV CD spectra of Tk-RNase H2 in the absence and presence of 4 M GdnHCl. (B) Native Tk-RNase H2 (0 M GdnHCl) was monitored by CD at 220 nm. Unfolding was initiated by rapid dilution of native Tk-RNase H2 under unfolding conditions (0–4 M GdnHCl) and monitored by CD at 220 nm. The thick line is a fit of the data to eq (4). The thin line shows the average signals in 0 M GdnHCl. The dashed line is the CD signal starting the slow phase. (C) Pulse proteolysis of the native and unfolded states of Tk-RNase H2 with Tk-subtilisin. Native Tk-RNase H2 (112  $\mu\text{g}$ ) and unfolded Tk-RNase H2 (112  $\mu\text{g}$ ) were dispensed into tubes. Proteolysis was performed via addition of Tk-subtilisin (0–20  $\mu\text{g}$ ) and incubation for 45 s. Proteolysis was quenched by 10% TCA, and products were quantified by tricine-SDS-PAGE. Bands corresponding to Tk-subtilisin, Tk-RNase H2, and cleavage products are indicated.



Table 3-1. Unfolding rate constants of Tk-RNase H2 and fragment 20 in 4 M GdnHCl.

Temperature (°C)	10	25	50	70
Tk-RNase H2	$5.7 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$	$4.2 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$	$4.2 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$	$5.3 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$
Fragment 20	$5.9 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$	$6.4 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$	$3.7 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$	$5.4 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$

### 3-3-3. Pulse proteolysis 法による Tk-RNase H2 の変性過程の観測

Pulse proteolysis法とは、変性剤変性によって天然状態と変性状態のタンパク質の混在した溶液中の、変性状態のタンパク質のみをプロテアーゼにより分解し、溶液中の天然状態のタンパク質との存在比を検出する解析法である。この方法では、現在までに中温菌由来目的タンパク質と中温菌由来のプロテアーゼのみが使用されており、観測された変性反応は明瞭な二状態反応を示している。これにより、今までの光学的な手法では測定できなかった目的タンパク質のcell lysate等の共雑タンパク質存在下や、複合体形成下での測定が可能となった [79-81]。

本手法では、Tk-RNase H2の天然構造が変性する過程で、部分的に変性した領域のみをTk-subtilisinにより分解することで、中間体構造の検出を行った。そこで、Tk-RNase H2に終濃度4 MになるようにGdnHClを加え変性反応を開始し、各経過時間でのTk-RNase H2に対して、Tk-subtilisinによる切断実験を行い、その切断の様子をtricine-SDS-PAGEで観測した。しかし、Tk-RNase H2の中間体構造の安定性やTk-subtilisin耐性はわからないので、3-3-2において検索したTk-RNase H2とTk-subtilisinの反応比 (112  $\mu\text{g}$  : 10  $\mu\text{g}$ : condition 1) に加えて、Tk-RNase H2の量を減らした条件 (56  $\mu\text{g}$  : 10  $\mu\text{g}$ : condition 2)、Tk-subtilisinの量を減らした条件(112  $\mu\text{g}$  : 1  $\mu\text{g}$ : condition 3) でも実験を行った (Figure 3-3)。

その結果、すでに報告されている精製タンパク質を対象にした既存のpulse proteolysis法では目的タンパク質のバンドのみが観測される [79-81]ことに対して、condition 1、2では、Tk-RNase H2のバンドに加えて、3つのバンド (fragment 22、20、9) を確認することができた (Figure 3-3A、B)。したがって、このバンドはTk-RNase H2の変性の中間体を示していると推測できる。さらに、天然状態のTk-RNase H2は完全なTk-subtilisin耐性を有する (Figure 3-2C) にも関わらず、変性開始後0.5 minにおいて、Tk-RNase H2のバンドの量は半分以下に減少し、変性開始後2-16 minにかけて再度増加した (Figure 3-3A、B)。これは、Tk-RNase H2、は変性過程の初期にTk-subtilisinによって分解されやすい中間状態に移行し、中期で再度Tk-subtilisin耐性を有する中間状態に移行していると推測できる。変性開始後120 minでは、Tk-RNase H2のバンドは消失していることが確認できた。これは、Tk-RNase H2が4 M GdnHClによって立体構造をほどかれTk-subtilisin耐性を失い分解されたためと考えられる。しかし、22kDa、20kDaに確認できたバンド (fragment 22、20) は、condition 1、2でTk-RNase H2のバンドの量に対してほぼ同等の量で確認できているにも関わらず、9kDaに確認できたバンド (fragment 9) はcondition 1に比べてcondition 2では明らかに減少している。したがって、fragment 9のTk-subtilisin耐性はfragment 22、20に比べて非常に弱い

と考えられる。

Tk-subtilisinの量を減らしたcondition 3ではより多くのバンド(fragment 17, 15, 14, 9)とTk-RNase H2のバンドが確認できた (Figure 3-3C)。これらのfragmentは変性時間に応じて徐々に増加する傾向を示した。さらに、これらのバンドの分子量はfragment A、B、C、D (Figure 3-2C) にそれぞれ対応することがtricine-SDS-PAGEにより確認できる。これらのfragmentはTk-RNase H2が4 M GdnHClによる変性では完全に変性せずに、部分的に構造が残っていたためにTk-subtilisinによって分解されなかったのかもしれない。

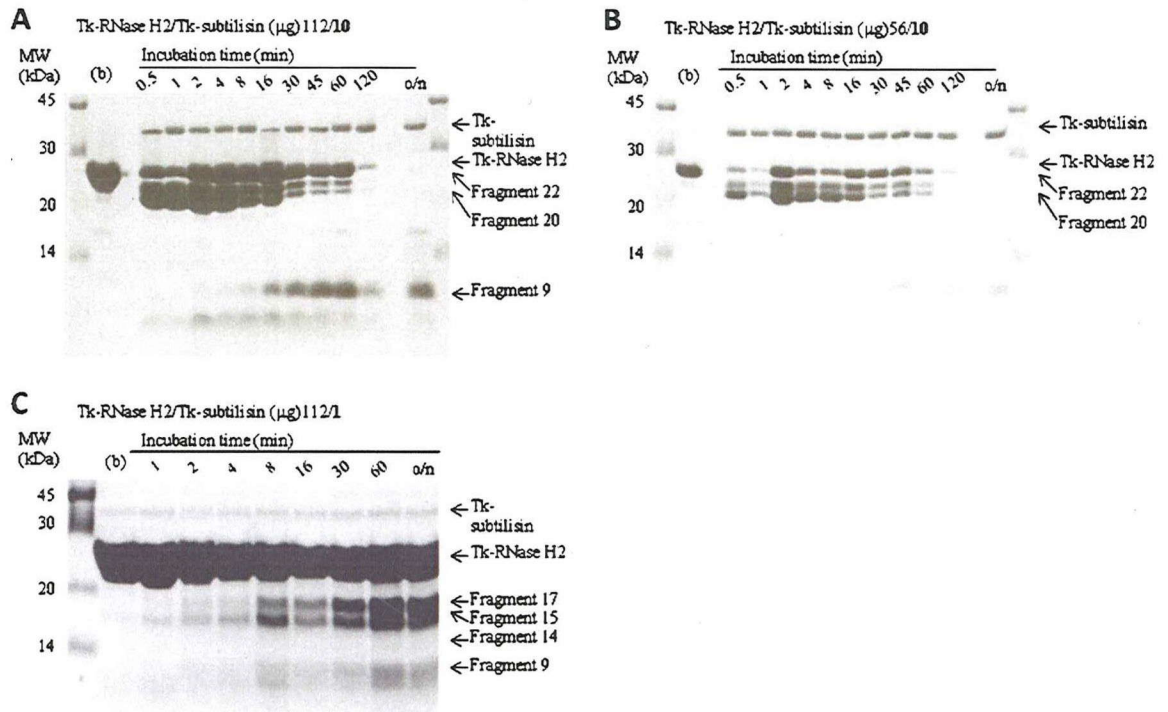


Figure 3-3. Pulse proteolysis of kinetic unfolding of Tk-RNase H2 by Tk-subtilisin under (A) condition 1, (B) condition 2, and (C) condition 3. Lanes (b) contained Tk-RNase H2 (112, 56, and 112  $\mu$ g in panels A-C, respectively). Tk-RNase H2 was unfolded by adding 4 M GdnHCl. At each time point (0.5-120 min and overnight), the sample was dispensed into tubes, and proteolysis was performed via addition of Tk-subtilisin (10, 10, and 1  $\mu$ g for panels A-C, respectively) and incubation for 45 s. Proteolysis was quenched by 10% TCA, and products were quantified by tricine-SDS-PAGE. Bands corresponding to Tk-subtilisin, Tk-RNase H2, and cleavage products are indicated.

### 3-3-4. Tk-RNase H2 の fragment の同定

Pulse proteolysis により 6 つの Tk-RNase H2 の fragment が確認できた (Figure 3-3A-C)。これらの fragment が Tk-RNase H2 全長のどの領域に対応しているか確認するために、N 末端配列決定、質量分析を行った。各 fragment を tricine-SDS-PAGE によって単離して PVDF 膜にブロッティングし、エドマン分解により N 末端の 4 アミノ酸を決定した。得られた N 末端のアミノ酸配列から Tk-subtilisin による切断領域を同定し Table 3-1 にまとめた。さらに、各 fragment の質量を MALDI-TOF mass spectrometry (MS) によって測定し、その結果を Table 3-1 にまとめた。その結

果、fragment 22、20、17、15 はそれぞれ Tk-RNase H2 のアミノ酸残基の 1-197、1-176、1-144、21-144 残基に相当していた (Table 3-1、Figure 3-4A)。Fragment 14、9 に関しては MALDI-TOF MS による測定の際に結晶化しなかったため、tricine-SDS-PAGE の結果より、Tk-RNase H2 のアミノ酸残基の 108-228、145-228 残基に相当していると推定した (Table 3-1、Figure 3-4A)。

以上の結果より、fragment 22、20、17 は Tk-RNase H2 の C 末端領域が欠損し、fragment 14 は N、C 末端領域の双方が欠損し、fragment 9 は N 末端領域が欠損していた。Figure 3-4B に Tk-RNase H2 の構造を元にしたそれぞれの立体構造モデルを示した。

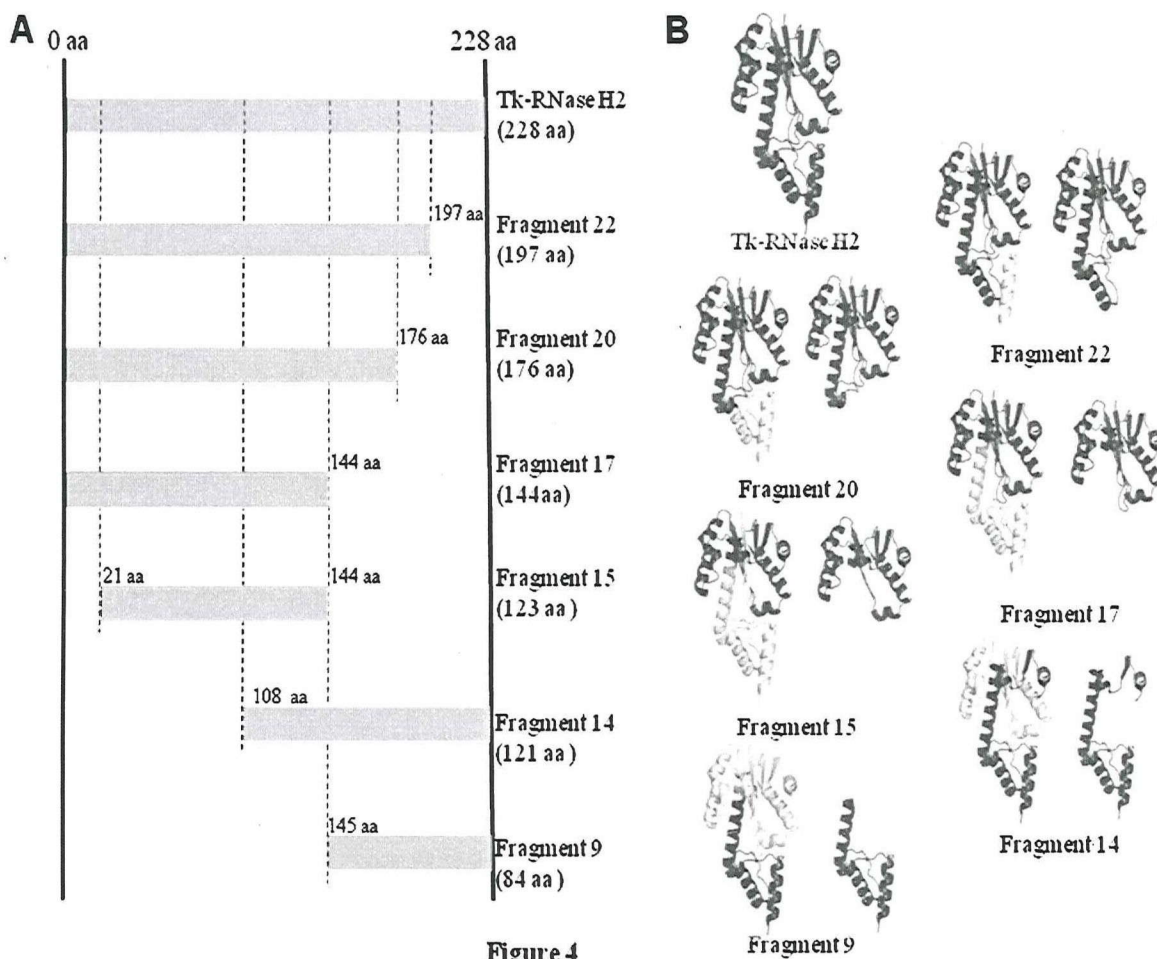


Figure 3-4. Schematic illustration of cleavage products from pulse proteolysis. (A) Schematic diagrams of Tk-RNase H2, fragment 22, fragment 20, fragment 17, fragment 15, fragment 14, and fragment 9. (B) Structures of Tk-RNase H2 (PDB entry 1I02) and models of fragments. In fragment structures, the left structure represents the whole structure with the deleted region (gray) and the right structure represents the corresponding region.

Table 3-2. Fragments of Tk-RNase H2 produced by Tk-subtilisin digestion.

Fragments	Tricin-SDS-PAGE (kDa)	N-terminal analysis		MASS Measured (Da)	Possible region in Tk-RNase H2	
		N-terminal sequences	Sequences in Tk-RNase H2		Theoretical (Da)	Residue number
Tk-RNase H2	26	-	-	25780	25799	1-228
Fragment 22	22	MKIA	M <sub>1</sub> K <sub>2</sub> I <sub>3</sub> A <sub>4</sub>	21969	22007	1-197
Fragment 20	20	MKIA	M <sub>1</sub> K <sub>2</sub> I <sub>3</sub> A <sub>4</sub>	19596	19603	1-177
Fragment 17	17	MKIA	M <sub>1</sub> K <sub>2</sub> I <sub>3</sub> A <sub>4</sub>	15885	15899	1-144
Fragment 15	15	AVVV	A <sub>21</sub> V <sub>22</sub> V <sub>23</sub> V <sub>24</sub>	13800	13784	21-144
Fragment 14	14	DVDE	D <sub>108</sub> V <sub>109</sub> D <sub>110</sub> E <sub>111</sub>	-	14073	108-228
Fragment 9	9	SLIA	S <sub>145</sub> L <sub>146</sub> I <sub>147</sub> A <sub>148</sub>	-	9917	145-228

### 3-3-5. Tk-RNase H2 の変性の中間体様変異体の構築と CD スペクトル測定

タンパク質工学的手法によって Tk-RNase H2 の中間体様変異体の構築を行った。その結果、fragment 20、17、9 の構築に成功した。しかし、fragment 22、15、14 は大腸菌による大量発現が確認できず、構築できなかった。

そこで、fragment 20、17、9 の GdnHCl 存在下、非存在下での Far-UV CD スペクトルを 25°C で測定した (Figure 3-5)。スペクトルはそれぞれのタンパク質の天然状態、GdnHCl 存在下での変性状態、さらに一度 GdnHCl 存在下で変性した状態から GdnHCl の希釈によって自発的に巻きもどった天然状態を示している。その結果、fragment 17 の far-UV CD スペクトルは GdnHCl 存在下、非存在下でのスペクトルが一致した (Figure 3-5C)。よって fragment 17 は二次構造を有していないと考えられる。しかし、fragment 20、9 の far-UV CD スペクトルは GdnHCl 存在下、非存在下で異なるスペクトルを示し、一度 GdnHCl 存在下で変性した状態から GdnHCl の希釈によって自発的に巻きもどったスペクトルは天然状態のスペクトルと一致することから、fragment 20、9 は二次構造を形成しており、GdnHCl 変性に対して可逆性があることが示された (Figure 3-5A、B)。さらに、fragment 20 と Tk-RNase H2 の天然状態のスペクトルは類似した波形を示した。この結果は、双方の二次構造の組成が類似していることを示す (Figure 3-5A、3-1A)。

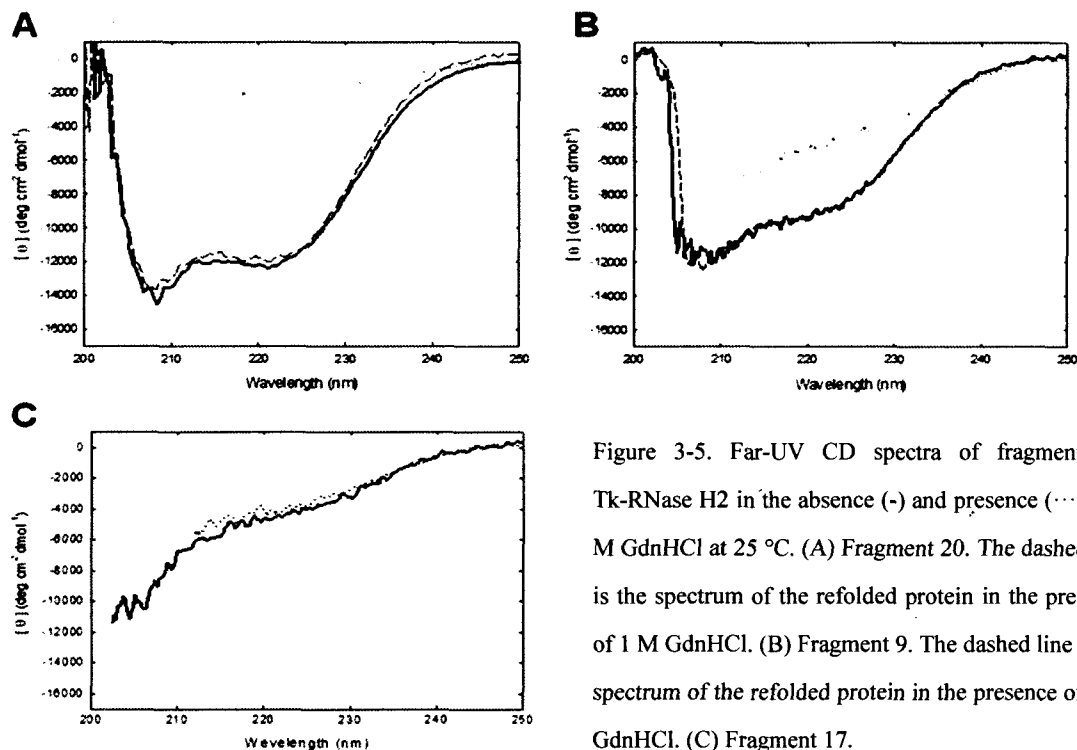


Figure 3-5. Far-UV CD spectra of fragments of Tk-RNase H2 in the absence (-) and presence (---) of 4 M GdnHCl at 25 °C. (A) Fragment 20. The dashed line is the spectrum of the refolded protein in the presence of 1 M GdnHCl. (B) Fragment 9. The dashed line is the spectrum of the refolded protein in the presence of 1 M GdnHCl. (C) Fragment 17.

### 3-3-6. Fragment 9 の変性実験

Fragment 9 が Tk-RNase H2 の変性の安定な中間体様タンパク質であるか調べるために、その物性を測定した。まず、変性速度を測定するため、25°Cでタンパク質溶液に終濃度が 4 M になるようにあらかじめ計算された量の GdnHCl 溶液を瞬時に加え攪拌し、その変性過程を波長 220 nm の CD 値の変化を追跡することで測定した。その結果、fragment 9 の変性は、CD 測定の dead time (~2 s) で完了した (date not shown)。このことより、fragment 9 の変性反応は速く、その構造は非常に不安定性であることが示唆された。

### 3-3-7. Fragment 20 の速度実験と pulse proteolysis 法による解析

Fragment 20 が Tk-RNase H2 の変性の中間体様タンパク質であるか調べるために、25°Cでの変性反応を測定した。タンパク質溶液に終濃度が 4 M になるようにあらかじめ計算された量の GdnHCl 溶液を瞬時に加え攪拌し、その変性過程を波長 220 nm の CD 値の変化を追跡することで測定した (Figure 3-6A)。その結果、fragment 20 の変性過程では Tk-RNase H2 の変性過程で観測されたバースト相は確認できなかった。さらに fragment 20 の変性反応は一次の指数関数に近似でき、その速度定数は  $6.4 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  を示した (Table 2)。これは Tk-RNase H2 のバースト相以降の遅い変性の速度定数 ( $4.2 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ) と変わらなかった。

次に、fragment 20 の遅い変性過程の解析を Tk-RNase H2 と同様に行った。天然状態の fragment 20 (213 μg) は 10 μg の Tk-subtilisin に対して完全に耐性を示したが、4 M GdnHCl 存在下で 120 min 放置した変性状態の fragment 20 (213 μg) は 10 μg の Tk-subtilisin によって完全に分解され



た。そこで、fragment 20 に終濃度 4 M になるように GdnHCl を加え変性反応を開始し、各経過時間での fragment 20 に対して、Tk-subtilisin による切断実験を行い、その様子を tricine-SDS-PAGE で観測した (Figure 3-6B)。その結果、fragment 20 のバンドが変性時間に応じて徐々に減少する様子が観察できた。これは、既存の中温生物由来タンパク質の pulse proteolysis 法による結果 [79-81] と同様の挙動であり、fragment 20 の変性過程は二状態反応であり変性の中間状態は存在しないことを示している。

ここで、fragment 20 の変性反応はバースト相の存在しない遅い変性を示し、その速度定数は Tk-RNase H2 のバースト相以降の遅い変性反応の速度定数と一致した。これは、fragment 20 は Tk-RNase H2 の遅い変性の中間体様タンパク質であり、fragment 20 の変性反応が Tk-RNase H2 の遅い変性反応の律側段階を担っていることを示唆している。この場合、fragment 20 は Tk-RNase H2 の C 末端領域の欠損した変異体 (Figure 3-4B) であるので、Tk-RNase H2 の変性の律速になる領域は N 末領域である。

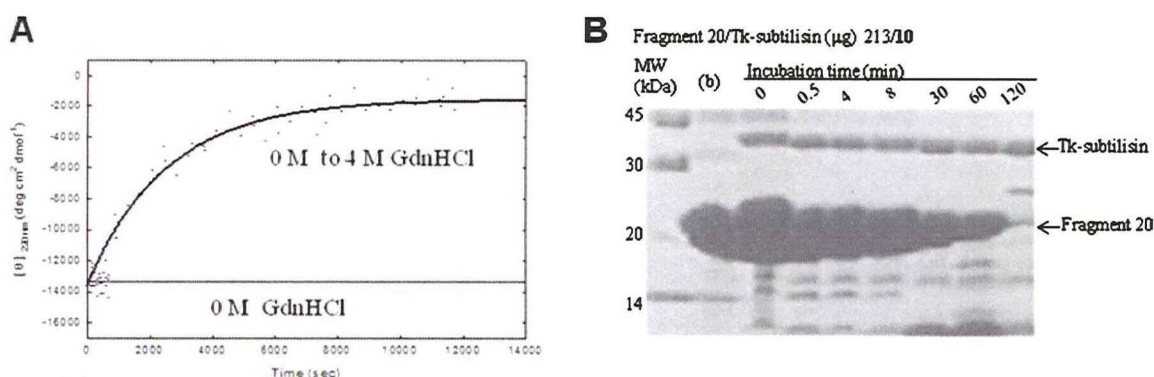


Figure 3-6. Kinetic unfolding curve and pulse proteolysis of fragment 20 at 25 °C. (A) The native state of fragment 20 (0 M GdnHCl) was monitored by CD at 220 nm. Unfolding was initiated by rapid dilution of native fragment 20 into unfolding conditions (0–4 M GdnHCl) and monitored by CD at 220 nm: (thin line) average signals in 0 M GdnHCl and (thick line) a fit of the data to eq (4). (B) Pulse proteolysis in kinetic unfolding of fragment 20 by Tk-subtilisin. Lane (b) represents native fragment 20 (218 µg). Fragment 20 (218 µg) was unfolded by addition of 4 M GdnHCl. At each time point (0–120 min), the sample was dispensed into a tube, and proteolysis was performed via addition of Tk-subtilisin (10 µg) and incubation for 45 s. Bands corresponding to Tk-subtilisin and fragment 20 are indicated.

### 3-3-8. 変性過程と温度の関係

25°Cの温度条件下において、Tk-RNase H2 の変性過程にはバースト相に対応した中間状態が存在することが示唆された。しかし、Tk-RNase H2 の変性反応で確認されたバースト相は、25°Cの測定条件ではCD値の総変化の30%を占めたが、50°Cの測定条件下では確認できないほど小さかった [21]。もし、fragment 20 が Tk-RNase H2 の変性の律速を担う中間体様タンパク質であれば、この測定温度によるバースト相の違いは天然状態と中間状態の Tk-RNase H2 の存在比が温度依存的に変化しているために起こっているのかもしれない。

これを確かめるために、fragment 20 と Tk-RNase H2 の変性剤変性と温度の関係を調べた。10、25、50、70°Cで各タンパク質溶液に終濃度が4 Mになるようにあらかじめ計算された量のGdnHCl溶液を瞬時に加え攪拌し、その変性過程を波長 220 nm の CD 値の変化を追跡することで測定した (Figure 3-7)。Tk-RNase H2 の変性過程はすべての測定温度で dead time (~2 s) に CD 値の変化が観測でき、バースト相が存在した。バースト相の大きさは 10、25、50、70°Cの各条件下で、天然状態と変性状態の CD 値の総変化のうちそれぞれ約 40、30、20、5%を占めた。しかしながら、fragment 20 の変性過程には全ての測定温度でバースト相は確認できなかった。さらに、Tk-RNase H2 のバースト相以降の遅い変性反応の変性速度定数はすべての測定温度で fragment 20 の速度定数と一致した (Table 3-1)。この結果から、fragment 20 は全測定温度で Tk-RNase H2 の変性の律速を担う中間体様タンパク質にあたるのがわかった。したがって、Tk-RNase H2 の変性には中間状態が存在し、天然状態と中間状態の Tk-RNase H2 の存在比は温度依存的である。

さらに、天然状態の Tk-RNase H2 の CD 値が、バースト相以降の遅い変性の開始点の CD 値と天然状態の fragment 20 の CD 値よりも温度に強く依存して変化している (Figure 3-7)。ここで、fragment 20 は Tk-RNase H2 の中間体様タンパク質であるので、中間状態の Tk-RNase H2 の存在比は温度上昇に伴って高くなるのがわかった。

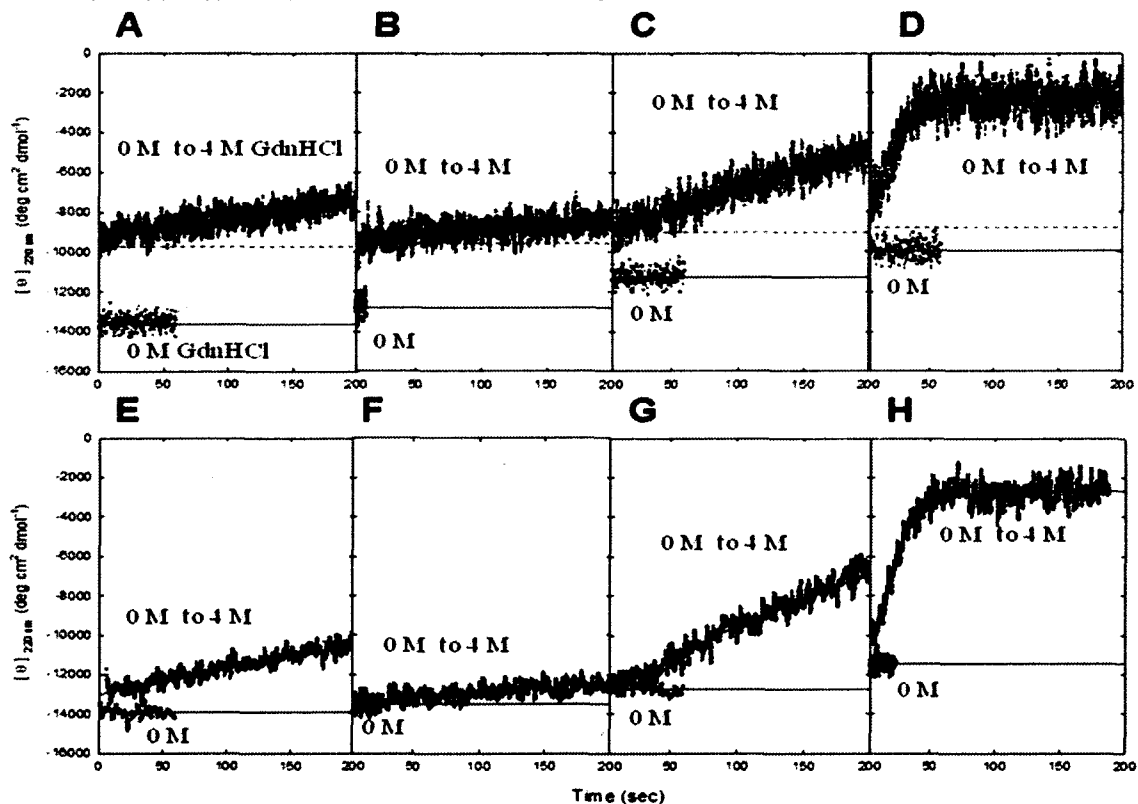


Figure 3-7. Kinetic unfolding curves of Tk-RNase H2 and fragment 20 at several temperatures. Native states of Tk-RNase H2 (A-D) and fragment 20 (E-H) (0 M GdnHCl) were monitored by CD at 220 nm. Unfolding was initiated by rapid dilution of native Tk-RNase H2 (A-D) and fragment 20 (E-H) into unfolding conditions (0-4 M GdnHCl) and monitored by CD at 220 nm at 10 (A and E), 25 (B and F), 50 (C and G), and 70 °C (D and H). Thin lines show average signals in 0 M GdnHCl. Thick lines show fits of the data to eq (4). Dashed lines show CD signals starting the slow phase.

### 3-3-9. Tk-RNase H2 と fragment 20 の温度による変性過程の比較

Tk-RNase H2 は温度依存的に中間状態の存在比を変えている。それを確かめるために Tk-RNase H2 と fragment 20 の温度による変性過程を調べた。Tk-RNase H2 と fragment 20 の熱変性を波長 220 nm の CD 値の変化を追跡することで測定した (Figure 3-8)。Fragment 20 の温度による変性は二状態反応で近似でき、高い可逆性を示した。Tk-RNase H2 の転移温度前のベースラインの傾きは fragment 20 よりも大きく、fragment 20 の変性温度は 86.8°C であり、Tk-RNase H2 (85.7°C) と一致した。これにより、天然状態の Tk-RNase H2 は温度依存的に中間状態に移行することが確認できた。さらに、相転移温度が一致したことから天然状態の Tk-RNase H2 は変性の相転移前で中間状態に移行すると考えられる。

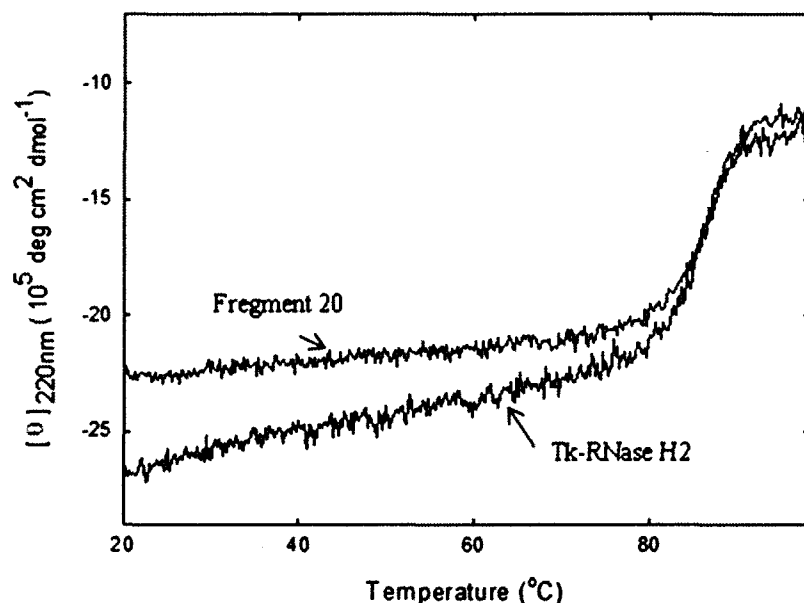


Figure 3-8. Heat-induced unfolding curve of Tk-RNase H2 and fragment 20, monitored by CD at 220 nm.

### 3-3-10. Tk-RNase H2 と fragment 20 の anilino-8-naphthalenesulfonic acid (ANS) 結合能の比較

Tk-RNase H2 の中間体構造の温度依存的な構造変化の詳細な情報を得るために、Tk-RNase H2 と fragment 20 の各温度での ANS 結合能の測定を行った (Figure 3-9)。ANS はタンパク質表面の疎水性残基に結合することが知られている [83, 84]。その結果、Tk-RNase H2 は 10°C で ANS 結合能が最大で温度が上がるにつれて結合能は下がった。しかし、fragment 20 は各温度とも非常に低い結合能を示した。したがって、Tk-RNase H2 の疎水性表面は温度依存的に変化し、fragment 20 の疎水性表面は温度に依存しなかった。

上述の結果により、Tk-RNase H2 は温度が上昇するに従って、天然状態から中間状態へ構造移行する。さらに、疎水性表面は温度が上昇するに従って減少した。この結果より、Tk-RNase H2 の中間状態は天然状態よりも小さい疎水性表面を持っていることが示唆できる。

ここで、fragment 20 は Tk-RNase H2 の C 末端領域の欠損した変異体 (Figure 3-4B) であることから、この疎水性表面の変化は主に Tk-RNase H2 の C 末端領域による影響であると考えられ



る。このことは、Tk-RNase H2 の C 末端領域は温度の上昇に従って疎水性表面が小さい構造に移行することで中間状態に移行することを示している。

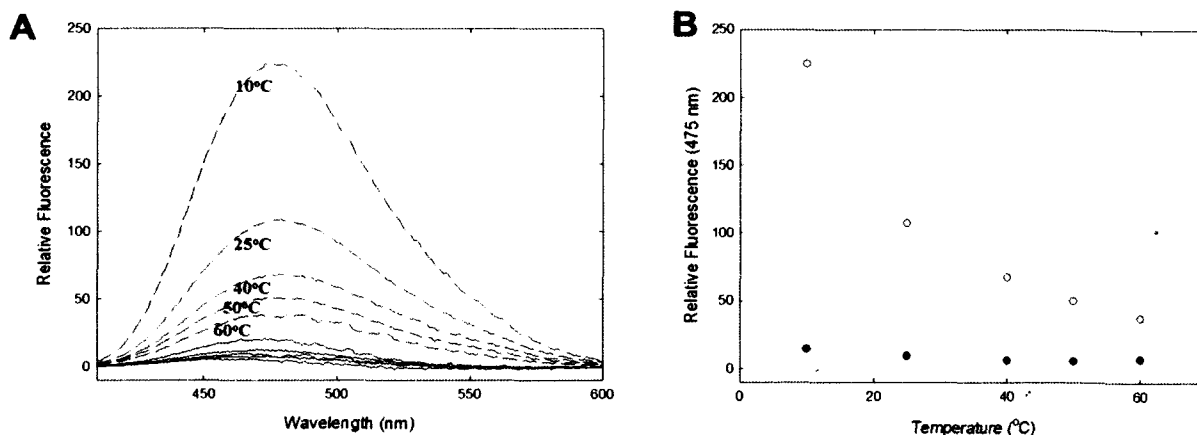


Figure 3-9. ANS fluorescence spectra of Tk-RNase H2 and fragment 20. (A) ANS fluorescence spectra of Tk-RNase H2 (dashed lines), and fragment 20 (thin lines). (B) Temperature dependencies of ANS fluorescence spectra at 475 nm for Tk-RNase H2 (open circles), and fragment 20 (closed circles).

### 3-3-11. Fragment 20 の速度論的安定性解析

Tk-RNase H2 と fragment 20 の変性反応と復元反応を測定した。まず、Tk-RNase H2 と fragment 20 の変性速度と復元速度を 15°C で測定した。Tk-RNase H2 のバースト相以降の遅い変性反応と復元反応、fragment 20 の遅い変性反応と復元反応はすべて一次の指数関数に近似できた (Figure 3-10)。GdnHCl の濃度を変えて測定を行い、見かけの反応速度定数 ( $k_{app}$ ) の対数値を GdnHCl 終濃度に対してプロットしたのが Figure 3-11A である。さらに、25、40、50°C での温度条件で測定した結果を Figure 3-11B、C、D に示した。得られた  $k_{app}$  の対数値と GdnHCl の濃度の関係を式 (5) によって近似し、水中での変性、復元速度定数 ( $k_u(\text{H}_2\text{O})$ 、 $k_f(\text{H}_2\text{O})$ ) を算出した。得られた速度論的パラメータは Table 3-3 にまとめた。各温度の  $\Delta G(\text{H}_2\text{O})$  は  $k_u(\text{H}_2\text{O})/k_f(\text{H}_2\text{O})$  により算出した。その結果、各温度での fragment 20 の変性速度定数は Tk-RNase H2 のバースト相以降の遅い変性の速度定数と一致した。したがって、fragment 20 の変性反応はすべての測定温度で Tk-RNase H2 の遅い変性反応の律側段階に相当した。しかし、全ての測定温度で fragment 20 の復元速度定数と Tk-RNase H2 の復元速度定数は異なっており、fragment 20 の復元反応速度は Tk-RNase H2 よりも遅い。さらに、 $\Delta G(\text{H}_2\text{O})$  の温度依存性を式 (2) で近似することにより求めた (Figure 3-12)。その結果、全ての温度域で fragment 20 の  $\Delta G(\text{H}_2\text{O})$  は Tk-RNase H2 よりも低かった。したがって、Tk-RNase H2 の C 末端領域はタンパク質の復元反応に関与し高い安定性を維持するが、遅い変性反応には関与していないことが示唆できる。

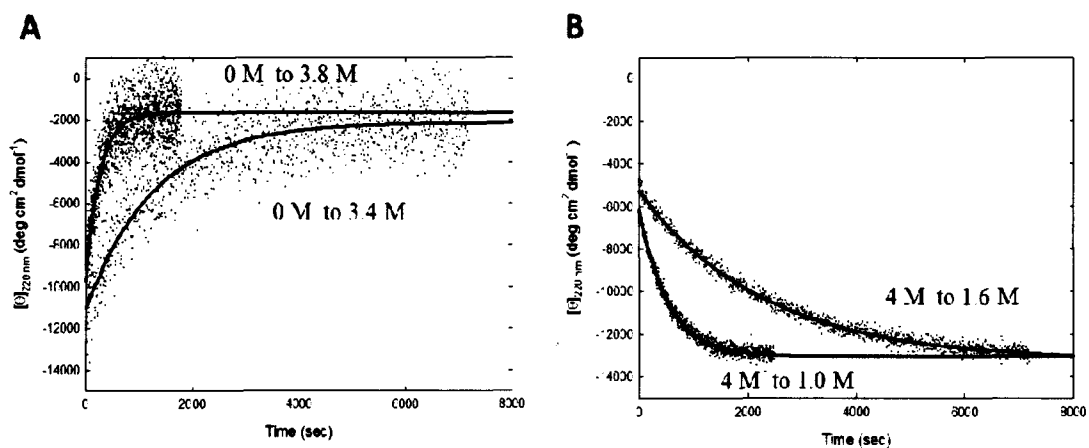


Figure 3-10. Kinetic unfolding and refolding curves of fragment 20 at 25°C. (A) Unfolding was initiated by rapid dilution of native fragment 20 into unfolding conditions, and monitored by CD at 220 nm. (B) Refolding was initiated by rapid dilution of unfolded fragment 20 into refolding conditions, and monitored by CD at 220 nm. Lines are the fit of data to Eq. (4).

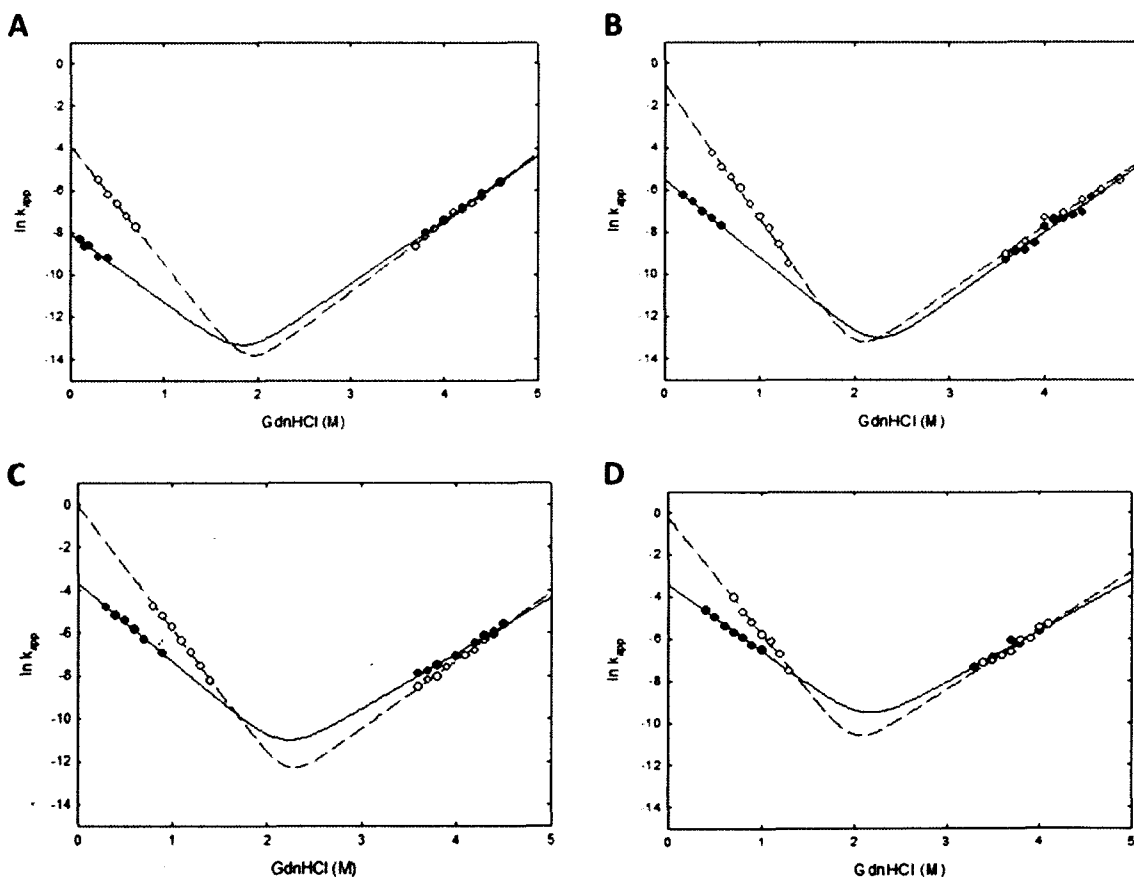


Figure 3-11. Kinetics of unfolding and refolding of Tk-RNase H2 and fragment 20 at several temperatures. GdnHCl concentration dependence of the logarithm of the apparent rate constant ( $k_{app}$ ) of unfolding and refolding kinetics of Tk-RNase H2 ( $\circ$ ) and fragment 20 ( $\bullet$ ) at 15 (A), 25 (B), 40 (C), and 50 °C (D). Dashed (Tk-RNase H2) and solid (fragment 20) lines are the best fits to eq (6).

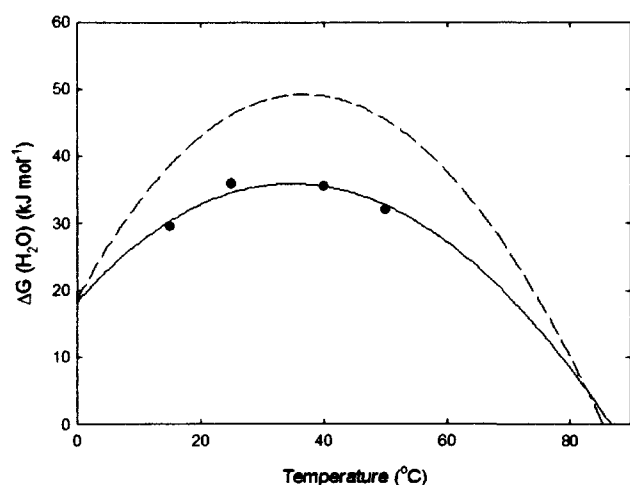


Figure 3-12. Thermodynamic stability profiles of Tk-RNase H2 and fragment 20. Circles, temperature dependence of  $\Delta G(\text{H}_2\text{O})$  of fragment 20 at pH 9.0. The  $T_m$  at which  $\Delta G(\text{H}_2\text{O})$  becomes zero was estimated from the heat-induced unfolding experiments. Thin line, fit to Eq. (2). Dashed line, stability profile of Tk-RNase H2.

Table 3-3. Kinetic parameters of unfolding and refolding of Tk-RNase H2 and fragment 20.

Temperature (°C)	Tk-RNase H2					Fragment 20				
	$k_u(\text{H}_2\text{O})$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$m_u$ ( $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ )	$k_r(\text{H}_2\text{O})$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$m_r$ ( $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ )	$\Delta G(\text{H}_2\text{O})$ ( $\text{kJ mol}^{-1}$ )	$k_u(\text{H}_2\text{O})$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$m_u$ ( $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ )	$k_r(\text{H}_2\text{O})$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$m_r$ ( $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ )	$\Delta G(\text{H}_2\text{O})$ ( $\text{kJ mol}^{-1}$ )
15	$4.12 \times 10^{-9}$	3.2	0.0205	-5.5	36.5	$3.31 \times 10^{-9}$	3.0	0.0003	-3.1	30.0
25	$6.02 \times 10^{-10}$	3.3	0.38	-6.2	50.2	$1.74 \times 10^{-9}$	3.0	0.003	-4.2	35.2
40	$2.00 \times 10^{-9}$	3.1	1.01	-5.8	51.0	$2.96 \times 10^{-8}$	2.6	0.0257	-3.6	35.0
50	$5.0 \times 10^{-8}$	2.8	0.78	-5.0	44.5	$2.04 \times 10^{-7}$	2.5	0.0323	-3.2	32.0

### 3-3-12. Pulse proteolysis 法による $T_m$ -RNase H2 の変性過程の観測

第一章より、 $T_m$ -RNase H2 の水中での変性速度は Tk-RNase H2 に比べて速い反応を示すにも関わらず、4 M GdnHCl 存在下では双方とも同様の遅い変性反応を示す。この変性過程の違いを明らかにするために pulse proteolysis 法により  $T_m$ -RNase H2 の変性過程の解析を行った。

まず、 $T_m$ -RNase H2 の変性反応を測定するため、タンパク質溶液に終濃度が 4 M になるようにあらかじめ計算された量の GdnHCl 溶液を瞬時に加え攪拌し、その変性過程を波長 220 nm の CD 値の変化を追跡することで測定した (Figure 3-13A)。その結果、 $T_m$ -RNase H2 は 4 M GdnHCl 存在下で遅い変性反応を示した。さらに、Tk-RNase H2 の変性反応に観測されたバースト相は確認できなかった。次に、 $T_m$ -RNase H2 の遅い変性過程の解析を行った。天然状態の  $T_m$ -RNase H2

(112  $\mu\text{g}$ ) は 10  $\mu\text{g}$  の Tk-subtilisin に対して完全に耐性を示したが、4 M GdnHCl 存在下で 120 min 放置した変性状態の  $T_m$ -RNase H2 (112  $\mu\text{g}$ ) は 10  $\mu\text{g}$  の Tk-subtilisin によって完全に分解された。

そこで、 $T_m$ -RNase H2 の遅い変性過程の各反応時間での  $T_m$ -RNase H2 に対して、Tk-subtilisin による切断実験を行い、その切断の様子を tricine-SDS-PAGE で観測した (Figure 3-13B)。その結果、 $T_m$ -RNase H2 を示すバンドが変性時間に応じて徐々に減少することが確認できた。この結果は、中温生物由来のタンパク質の pulse proteolysis 法による結果 [78-81] と同じ挙動を示しており、 $T_m$ -RNase H2 は変性が進むにつれて徐々に Tk-subtilisin に対する耐性を失っていくことを示して

いる。Tm-RNase H2 の変性過程は Tk-RNase H2 と異なり明瞭な二状態反応であり、その変性過程には中間体は検出できなかった。この結果より、Tm-RNase H2 と Tk-RNase H2 の変性過程は異なる機構を有していることがわかった。

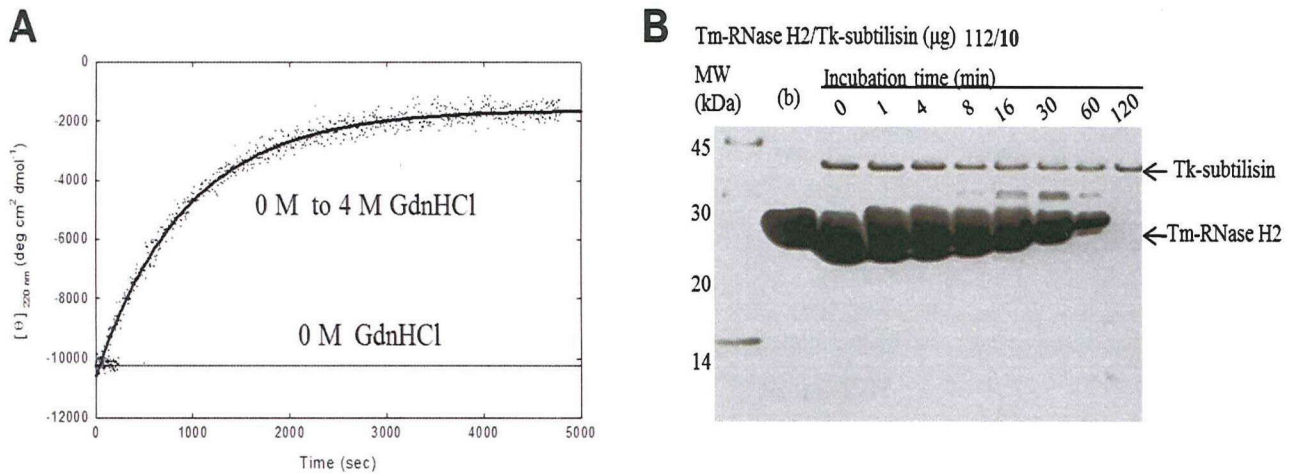


Figure 3-13. Kinetic unfolding curve and pulse proteolysis of Tm-RNase H2 at 25°C. (A) Native state of Tm-RNase H2 (0 M GdnHCl) was monitored by CD at 220 nm. Unfolding was initiated by rapid dilution of native Tm-RNase H2 into unfolding condition (0 M to 4 M GdnHCl), and monitored by CD at 220 nm. Thin line, average signals in 0 M GdnHCl. Thick line, fit of data to Eq. (4). (B) Pulse proteolysis in kinetic unfolding of Tm-RNase H2 by Tk-subtilisin. Lane (b) represents native Tm-RNase H2 (218 μg). Tm-RNase H2 (218 μg) was unfolded by adding 4 M GdnHCl. At each time point (0-120 min), sample was dispensed into tube, and proteolysis was performed by adding Tk-subtilisin (10 μg) and incubating for 45 seconds. Bands corresponding to Tk-subtilisin and Tm-RNase H2 are indicated.

### 3-4. 考察

#### 3-4-1. Tk-RNase H2 の変性の速度論的中間体構造

従来の中温生物由来タンパク質の pulse proteolysis 法による結果は単純な二状態変性であった。したがって、SDS-PAGE 上には目的タンパク質を示すバンドの量が変性反応の時間経過に従って徐々に減少する傾向が示される [78-81]。本章で観測した fragment 20 (Figure 3-6B)、Tm-RNase H2 (Figure 3-13B) でも同様に目的タンパク質が明瞭に二状態変性によって変性する過程が観測できた。しかし、Tk-RNase H2 の遅い変性の過程を観測した結果は、それらと以下の三つの点で大きく異なっていた (Figure 3-3A, B)。

一つ目は、天然状態の Tk-RNase H2 は Tk-subtilisin に対して完全に耐性を示すにも関わらず、変性開始直後の 0.5 min で Tk-RNase H2 を示すバンドの量は半分以下にまで減少し、代わりに fragment 22、20 が大量に出現した。二つ目は、Tk-RNase H2 を示すバンドの量が、変性開始直後の 0.5 min から変性開始後 16 min の変性中期にかけて増加した。三つ目は、変性開始直後の 0.5 min で出現した fragment 22、20 が、変性開始後 2 min で増加した。

そこで、これらの結果を踏まえて Tk-RNase H2 の変性過程を次のように考察した。天然状態の Tk-RNase H2 (N-state) は変性過程の初期段階で、Tk-subtilisin による切断を受けやすい中間状態 (I<sub>A</sub>-state) に移行する。次に、部分的に Tk-subtilisin に切断される中間状態 (I<sub>B</sub>-state) に移行してから Tk-subtilisin 耐性を示す中間状態 (I<sub>C</sub>-state) に移行する。この変性過程は、以下に示す結果より説明できる。

まず、fragment 20 は Tk-RNase H2 全長の C 末端領域を Tk-subtilisin に切断された fragment である (Figure 3-4B) ことから、変性開始後 0.5 min で半分以上が、C 末端領域を切断された結果であると考えられる。ここで、Tk-RNase H2 の変性過程には CD 測定の dead time (~2 s) にバースト相がある (Figure 3-2B)。したがって、変性開始後 0.5 min では Tk-RNase H2 は天然状態から部分的に二次構造を失った中間状態へ移行していると考えられる。さらに、Tk-RNase H2 の変性は非常に遅い反応であり、変性開始後 0.5 min で完全な変性状態に移行している Tk-RNase H2 は CD による速度実験 (figure 3-2B) からも非常に少ない。そこで、残りの多くの Tk-RNase H2 は部分的に二次構造を失った中間体構造を形成しており、その構造変化は fragment 20 の速度実験 (Figure 3-6A) により、Tk-RNase H2 の C 末端領域でおきていることが予測できる。しかし、tricine-SDS-PAGE の結果は、変性開始後 0.5 min で半分以上の Tk-RNase H2 が Tk-subtilisin によって切断されているが、半以下の Tk-RNase H2 が切断されていないことを示している (Figure 3-3A、B)。これは、この時点で構造を有した Tk-RNase H2 の状態は、部分的に変性した中間状態の単一状態ではなく、二つ以上の状態が混在していることを示している。そして、その状態の中に、Tk-subtilisin によって部分的に切断される状態と切断されない状態が存在していると考えられる。

Tk-RNase H2 の二つの状態が混在している状態は、測定温度と変性過程の関係を CD 測定によって調べた結果 (Figure 3-7) と ANS 結合能を蛍光によって測定した結果 (Figure 3-9) からも確認している。これらの結果は、Tk-RNase H2 は測定温度が 25°C であるとき、すでに天然状態と 25°C の熱による部分的な変性によって到達した平衡論的な中間状態が混在した状態をとっており、その天然状態の構造は大きな疎水性表面を有し、中間状態の構造は小さい疎水性表面を有することを示した。さらに、Tk-subtilisin はタンパク質構造を非特異的に切断、分解するが、その中でも疎水性残基に対して積極的に反応することが報告されている。そして、一般に疎水性表面の大きい構造は不安定であることが知られている。このことより、前述の Tk-subtilisin によって部分的に切断される状態が Tk-RNase H2 の天然状態、切断されない状態が熱による平衡論的な中間状態に対応すると考えられる。しかし、これら Tk-RNase H2 の天然状態と熱による平衡論的な中間状態は、どちらも 4 M GdnHCl が存在しない反応条件では Tk-subtilisin によって分解されないことが tricine-SDS-PAGE で確認されている (Figure 3-2C)。

ここで、4 M GdnHCl が存在しない環境では Tk-RNase H2 は 25°C で、その変性速度と復元速度で拮抗された平衡状態にあるが、4 M GdnHCl を添加した後 0.5 min の時点では  $4.2 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  (Table 3-1) の速度で変性するのみで復元反応は起こらない。さらに、25°C での Tk-RNase H2 の変性過

程には CD 測定の dead time (~2 s) にバースト相が観測され、相の中では非常に速い部分的な変性が起こっていると考えられる (Figure 3-2B)。平衡状態にある場合と異なり、4 M GdnHCl を添加した後、変性に伴い構造変化した C 末端領域が復元することはない。さらに、Tk-RNase H2 の復元速度は fragment 20 の復元速度と比較して非常に速い (Table 3-3)。これは、切断された C 末端領域が復元反応の核になっていたことを示唆する。したがって、天然状態の Tk-RNase H2 は 4 M GdnHCl 非存在下では Tk-subtilisin によって切断されないが、4 M GdnHCl を添加した後 0.5 min の時点では C 末端領域を切断されると考えられる。そして、この時点での Tk-RNase H2 の状態が、上述した Tk-RNase H2 の変性過程の考察のうちの I<sub>B</sub>-state に対応し、先に述べた、Tk-subtilisin によって切断されない状態であり、熱による平衡論的な中間状態である状態が I<sub>C</sub>-state に対応すると考えた。

Tk-RNase H2 を示すバンドの量が、変性開始直後の 0.5 min から変性開始後 16 min の変性中期にかけて増加したのは、速度論的な中間状態である I<sub>B</sub>-state が平衡論的な中間状態である I<sub>C</sub>-state に移行した結果、I<sub>C</sub>-state の量が増加し、N-state の Tk-RNase H2 を示すバンドが増えたと考えられる。これは、CD 測定によって熱変性を観測した結果に支持される (Figure 3-8)。このとき、Tk-RNase H2 の変性温度が fragment 20 の変性温度と一致したことから、熱による変性の過程で N-state の Tk-RNase H2 はすべて I<sub>C</sub>-state に移行してから次の過程に進むと考えられる。この変性過程は、変性剤変性の変性過程でも同様であると考えた。

変性開始直後の 0.5 min で出現した fragment 22、20 が、変性開始後 2 min で増加したのは、N-state の Tk-RNase H2 が I<sub>B</sub>-state に移行する前に I<sub>A</sub>-state を経由しているためと考えられる。これは、Tk-RNase H2 と fragment 20 の速度論的安定性解析の結果より考察した (Figure 3-11、12、Table 3-3)。Tk-RNase H2 は fragment 20 で欠損された C 末端領域の構造を復元反応の核として、さらに、構造全体の安定性を高く維持していると考えられる。このことから、N-state から I<sub>B</sub>-state に移行する過程で、まだ C 末端領域の構造の構築がされていない状態では、Tk-RNase H2 の N 末側領域も Tk-subtilisin による切断の対象になると考えた。同様の理由により、後述の I<sub>D</sub>-state も、高い安定性を示す I<sub>C</sub>-state の C 末端領域よりも N 末側領域が先に変性することで、Figure 3-3A で fragment 9 が観測されたと考えられる。

以上の考察により推測された Tk-RNase H2 の遅い変性過程を Figure 3-14 にまとめた。まず、天然状態の Tk-RNase H2 (N-state) は遅い変性反応の初期の段階で、完全に Tk-subtilisin によって分解される I<sub>A</sub>-state に変化し、そこから徐々に 2 つの中間状態である I<sub>B</sub>-state、I<sub>C</sub>-state に変化する。I<sub>B</sub>-state の C 末端ドメインは Tk-subtilisin による分解を受けることから、その部分構造はほどけているが、I<sub>C</sub>-state に移行すると Tk-subtilisin による分解はおこらない。つぎに I<sub>C</sub>-state の Tk-RNase H2 は徐々に N 末端ドメインの構造を失った I<sub>D</sub>-state に移行し完全な変性状態 (D-state) に移行する。



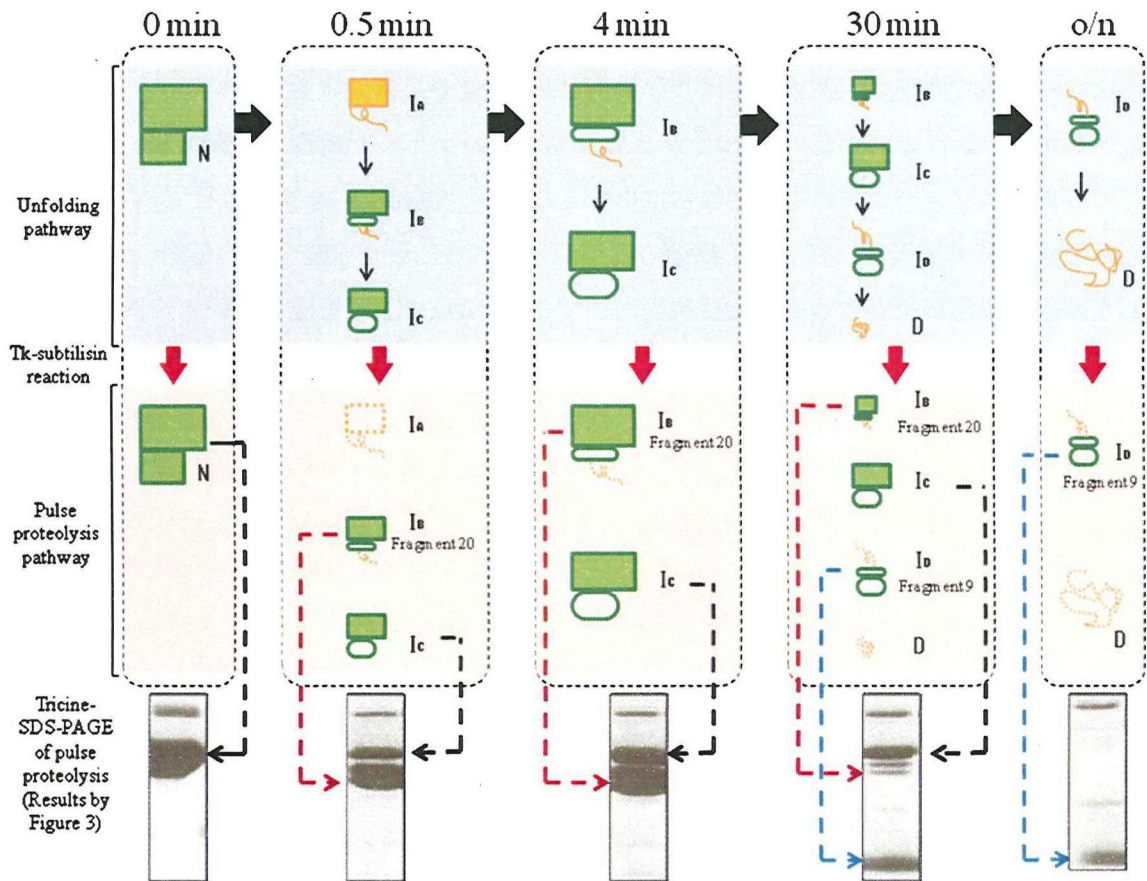


Figure 3-14. Unfolding pathway (blue background) and pulse proteolysis pathway (red background) illustrated on each time scale (a-e). Red arrows denote reactions by Tk-subtilisin. Black arrows denote shifts in the unfolding pathway. Results of tricine-SDS-PAGE for the pulse proteolysis pathway are connected by dashed arrows. In each state, the size represents their abundance ratio on each time scale (a-e). Rectangles are regions with secondary structures. Ellipses are regions with some structures but no secondary structures. Curves are regions without folded structures. The Tk-subtilisin resistant form is colored green and the digested form orange.

### 3-4-2. Tk-RNase H2 の遅い変性の原因

Fragment 20 の変性速度は Tk-RNase H2 のバースト相以降の遅い変性反応の速度と一致した。この結果より、fragment 20 の変性反応は Tk-RNase H2 の遅い変性反応の律速反応である。さらに、fragment 20 は Tk-RNase H2 の C 末端領域欠損変異体であることから、Tk-RNase H2 の遅い変性反応は N 末側領域に影響を受けていると考えられる。ここで、第一章より、Tk-RNase H2 の遅い変性反応は N 末側領域の疎水性残基や表面近傍の疎水性残基に影響されている。これらの結果から N 末側領域の表面近傍の埋もれた疎水性残基が遅い変性反応の原因であるかもしれない。

### 3-4-3. Tk-RNase H2 の C 末端領域の役割



本章より Tk-RNase H2 の C 末端領域は天然状態では、低温条件で二次構造を有しているが、変性剤変性の過程や温度の上昇に従って二次構造を失っていることが示唆された。しかし、この部位は変性過程で本来の天然構造ではない構造に移行し、その構造は強いプロテアーゼ耐性をもつことが示された。この構造の変化は N 末側領域のプロテアーゼ耐性にも影響している。さらに、この部位はタンパク質の遅い変性には影響しないが、復元反応を加速させている。これは、C 末端領域は N 末側領域よりも早く構造の構築が行われることを示唆する。Tk-RNase H2 の宿主である超好熱細菌が生育する高い温度環境の中で Tk-RNase H2 が形成している天然構造は、結晶構造解析により決定された構造ではなく、高温環境でその存在比を上昇させた、強力なプロテアーゼ耐性をもつ構造 (I<sub>C</sub>-state) なのかもしれない。Muroya [85]らは Tk-RNase H2 の C 末端領域の構造が変化することで、Tk-RNase H2 は基質との結合を果たしていると主張している。C 末端領域は二次構造をもたずに N 末側領域を安定化させ、さらに、基質と結合しているのかもしれない。

### 3-5. 結論

本章では、遅い変性反応を示すタンパク質である超好熱古細菌由来 Tk-RNase H2 の変性過程を、超安定なプロテアーゼである超好熱菌由来 Tk-subtilisin を用いて追跡するという新しい手法で解析した。その結果、Tk-RNase H2 の遅い変性反応には N 末端ドメインが重要な役割を担い、C 末端ドメインは復元反応と構造安定性に寄与していること、本実験手法がタンパク質の変性過程を解析する手段として有効であることがわかった。

タンパク質はこれほどまでにありふれ、生命活動の中樞を担っているにも関わらず、その成り立ちや行く末（フォールディング、アンフォールディング問題）については未だ解明されていない。この問題を紐解くには、タンパク質構造を『物性』として物理化学的及び生化学的な観点から理解していくことが必要不可欠である。本研究では、超好熱菌由来の非常に安定なタンパク質の物性を熱力学や速度論から解析し、さらに、そのタンパク質の進化的背景を踏まえて考察することで、超好熱菌由来のタンパク質の物性についての基本的な理解を得ることができた。

第一章では、超好熱性 RNase H の平衡論的安定性と速度論的安定性の測定を行い、タンパク質の進化的背景の観点から比較した。測定に用いたタンパク質は変性剤変性に対して可逆的な変性を示すことから、定量的な安定性の解析に優れたモデルタンパク質である。さらに超好熱性 RNase H は高い平衡論的安定性を示すが、変性反応速度は宿主の進化的背景に強く依存していた。これは超好熱古細菌と超好熱細菌由来タンパク質が異なった耐熱化の戦略によって高温環境に適応していることを示唆する。そこで、超好熱細菌由来 RNase H と超好熱古細菌由来 RNase H のアミノ酸組成を、立体構造に基づいて比較し、遅い変性に関わる特徴を探した。その結果、古細菌由来 RNase H の遅い変性反応は内部に埋もれた疎水性残基の割合と相関があった。さらに、この関係を立体構造で確認すると、遅い変性反応はタンパク質表面近傍に極在している埋もれた疎水性アミノ酸残基と深く関係していることが示唆された。

第二章では、 $\alpha$ ヘリックス N 末端領域のプロリン残基が、超好熱古細菌由来タンパク質の熱安定性や変性、復元機構にどのような影響をおよぼすか調べた。その結果、 $\alpha$ ヘリックス N 末端領域のプロリン残基は、非常に高い安定性を有する Tk-RNase H2 においても中温生物由来タンパク質における場合と同様に加算的な安定性への寄与を示した。特に、柔軟性の高い領域に存在することでそのタンパク質の安定性を効果的に上げていた。しかし、Tk-RNase H2 の遅い変性反応には疎水性相互作用のような大きな影響を与えなかった。これは、プロリン残基による安定化は主に変性状態のタンパク質に寄与する影響であって、天然構造にあまり影響しないためと考えられる。これにより、天然状態の疎水性相互作用や水素結合などのエンタルピックな影響は遅い変性反応に強い影響を与えるが、変性状態におけるプロリン残基やジスルフィド結合等のエントロピックな影響は遅い変性反応にあまり影響を及ぼさないことが示唆された。さらに、 $\alpha$ ヘリックス N 末端領域のプロリン残基は古細菌由来 Tk-RNase H2 と細菌由来 Tm-RNase H2 の変性速度が大きく異なる原因ではなかった。このことから、 $\alpha$ ヘリックス N 末端領域のプロリン残基はそのタンパク質の進化的背景に関係なく、普遍的にタンパク質の安定化に関与していることがわかった。

第三章では、遅い変性反応を示すタンパク質である超好熱古細菌由来 Tk-RNase H2 と超好熱細菌由来 Tm-RNase H2 の変性過程を、超安定なプロテアーゼである超好熱古細菌由来 Tk-subtilisin を用いて追跡するという新しい手法で解析した。その結果、Tk-RNase H2 の変性過程は、初期段

階で Tk-subtilisin による切断を受けやすい中間状態に移行し、次に部分的に Tk-subtilisin に切断される中間状態に移行してから Tk-subtilisin 耐性を示す中間状態に移行する、四つの中間状態を介した六状態反応であることが確認できた。そして、Tk-RNase H2 の遅い変性反応には N 末側領域が重要な役割を担い、C 末端領域は復元反応と構造安定性に寄与していることが示唆された。一方、超好熱細菌由来 Tm-RNase H2 の変性過程は中間体を介さない二状態反応を示した。このことは、古細菌由来 Tk-RNase H2 と細菌由来 Tm-RNase H2 は、その宿主の進化的背景に依存した異なる変性機構を有していることを示唆している。さらに、本実験手法がタンパク質の変性過程を解析する手段として有効であることを示した。

本研究は今までその関係性について議論されることの少なかった、生物の進化とタンパク質の安定性、変性機構に強い繋がりがあることをはじめ実験的に示した点で新しい。さらに、タンパク質の変性過程について既存の方法では観測できないより詳細な情報を得ることが可能な解析方法を提案した点で有益である。今後、RNase H だけでなくより網羅的な解析によって、タンパク質の物性と進化の関係性を調べることは、タンパク質の工学的な利用方法を確立することに貢献するだけでなく、生命の進化に関する多くの疑問を解き明かすことにも繋がる点で意義深い。さらに、本研究によって提案した新しいタンパク質の変性過程の解析法によって、Tk-RNase H2 の安定化変異体や不安定化変異体、あるいは他のタンパク質を解析することは、タンパク質の変性反応のより一層の理解に繋がると考えられる。また、本方法は、変性反応だけでなく、復元反応の観測にも有効である。変性反応から得られる情報と復元反応から得られた情報を結び合わせることでより深いタンパク質の物性の理解が得られると考えられる。さらに、ここで得られた中間体様変異体のさらなる物理化学的な解析や立体構造の決定から得られる情報は非常に興味深い。

本研究では、超好熱菌由来タンパク質の遅い変性反応の原因や機構についてその物性としての新しい知見を得ることができた。この知見は、超好熱菌由来タンパク質にとどまらず、タンパク質全般の変性反応機構、その逆反応であるタンパク質のフォールディング機構の解明に直接貢献すると考えている。タンパク質構造の『物性』を理解することは、タンパク質の示す機能を、その構造や進化の観点から理解することに繋がり、その包括的な理解が得られれば、タンパク質は医薬、産業分野で非常に大きな役割を果たすだろう。この綿密で、効率的で、多様な機能を有した分子機械によって我々の生活は一変するかもしれない。

## 参考文献

- 1 Anfinsen, C. B. (1973) Principles that govern the folding of protein chains. *Science* 181, 223-230.
- 2 Levinthal, C. (1968) Are there pathways for protein folding? *J. Chim. Phys. Phys.-Chim. Biol.* 65, 44-45.
- 3 Arai, M., and Kuwajima, K. (1996) Rapid formation of a molten globule intermediate in refolding of lactalbumin, *Fold. Des.* 1, 275-287.
- 4 Udgaonkar, J. B., and Baldwin, R. L. (1988) NMR evidence for an early framework intermediate on the folding pathway of ribonuclease A. *Nature* 335, 694-699.
- 5 Roder, H., Elove, G. A., and Englander, S. W. (1988) Structural characterization of folding intermediates in cytochrome c by H-exchange labelling and proton NMR. *Nature* 335, 700-704.
- 6 Balbach, J., Forge, V., van, Nuland. N. A., Winder, S. L., Hore, P.J., and Dobson, C. M. (1995) Following protein folding in real time using NMR spectroscopy. *Nature Struct. Biol.* 2, 865-870.
- 7 Eliezer, D., Jennings, P. A., Wright, P. E., Doniach, S., Hodgson, K. O., and Tsuruta, H. (1995) The radius of gyration of an apomyoglobin folding intermediate. *Science* 270, 487-488.
- 8 Arai, M., Ikura, T., Semisotnov, G. V., Kihara, H., Amemiya, Y., and Kuwajima, K. (1998) Kinetic refolding of beta-lactoglobulin. Studies by synchrotron X-ray scattering, and circular dichroism, absorption and fluorescence spectroscopy. *J. Mol. Biol.* 275,

149-162.

- 9 Serrano, L., Matouschek, A., and Fersht, A. R. (1992) The folding of an enzyme. III. Structure of the transition state for unfolding of barnase analysed by a protein engineering procedure. *J. Mol. Biol.* 224, 805-818.
- 10 Wolynes, P.G., Onuchic J. N., and Thirumalai, D. (1995) Navigating the folding routes. *Science* 267, 1619–1620.
- 11 Baker, D. (2000) A surprising simplicity to protein folding. *Nature* 405, 39–42.
- 12 Kamagata, K., Arai, M., and Kuwajima, K. (2004) Unification of the folding mechanisms of non-two-state and two-state proteins. *J. Mol. Biol.* 339, 951–965.
- 13 Nakamura, T., Makabe, K., Tomoyori, K., Maki, K., Mukaiyama, A., and Kuwajima, K. (2010) Different folding pathways taken by highly homologous proteins, goat alpha-lactalbumin and canine milk lysozyme. *J. Mol. Biol.* 396, 1361–1378.
- 14 Takano, K., Yamagata, Y., and Yutani, K. (1998) A general rule for the relationship between hydrophobic effect and conformational stability of a protein: stability and structure of a series of hydrophobic mutants of human lysozyme. *J. Mol. Biol.* 280, 749-61.
- 15 Matsumura, M., Bechtel, W.J., and Matthews, B.W. (1988) Hydrophobic stabilization in T4 lysozyme determined directly by multiple substitutions of Ile 3. *Nature* 334, 406-10.

- 16 Matsumura, M., Becktel, W.J., Levitt, M., and Matthews, B.W. (1989) Stabilization of phage T4 lysozyme by engineered disulfide bonds. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86, 6562-6.
- 17 Matthews, B.W., Nicholson, H., and Becktel, W. J. (1987) Enhanced protein thermostability from site-directed mutations that decrease the entropy of unfolding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84, 6663-7.
- 18 Ogasahara, K., Nakamura, M., Nakura, S., Tsunasawa, S., Kato, I., Yoshimoto, T., and Yutani, K. (1998) The unusually slow unfolding rate causes the high stability of pyrrolidone carboxyl peptidase from a hyperthermophilic *Pyrococcus furiosus*: Equilibrium and kinetic studies of guanidine hydrochloride-induced unfolding and refolding. *Biochemistry* 37, 17537-17544.
- 19 Dams, T., and Jaenicke, R. (1999) Stability and folding of dihydrofolate reductase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. *Biochemistry* 38, 9169-9178.
- 20 Kaushik, J. K., Ogasahara, K., and Yutani, K. (2002) The unusually slow relaxation kinetics of the folding-unfolding of pyrrolidone carboxyl peptidase from a hyperthermophile *Pyrococcus furiosus*. *J. Mol. Biol.* 316, 991-1003.
- 21 Mukaiyama, A., Takano, K., Haruki, M., Morikawa, M., and Kanaya, S. (2004) Kinetically robust monomeric protein from a hyperthermophile. *Biochemistry* 43, 13859-13866.
- 22 Perl, D., and Schmid, F.X. (2002) Some like it hot: The molecular determinants of

- protein thermostability. *ChemBioChem*. 3, 39-44.
- 23 Razvi, A., and Scholtz, J. M. (2006) Lessons in stability from thermophilic proteins. *Protein Sci*. 15, 1569-1578.
- 24 Jaenicke, R., and Bohm, G. (1998) The stability of proteins in extreme environments. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 8, 738-748.
- 25 Vieille, C., and Zeikus, G.J. (2001) Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65, 1-43.
- 26 Nelson, K. E., Clayton, R. A., Gill, S. R., Gwinn, M. L., Dodson, R. J., Haft, D. H., Hickey, E. K., Peterson, J. D., Nelson, W. C., Ketchum, K. A., et al. (1999) Evidence for lateral gene transfer between Archaea and Bacteria from genome sequence of *Thermotoga maritima*. *Nature* 399, 323–329.
- 27 Berezovsky, I. N., and Shakhnovich, E.I. (2005) Physics and evolution of thermophilic adaptation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 102, 12742-12747.
- 28 Mizuguchi, K., Sele, M., and Cubellis, M. V. (2007) Environment specific substitution tables for thermophilic proteins. *BMC Bioinformatics* 8, S15.
- 29 Ohtani, N., Haruki, M., Morikawa, M., Crouch, R. J., Itaya, M., and Kanaya, S. (1999) Identification of the genes encoding Mn<sup>2+</sup>-dependent RNase HII and Mg<sup>2+</sup>-dependent RNase HIII from *Bacillus subtilis*: Classification of RNase H into these families. *Biochemistry* 38, 605-618.
- 30 Ohtani, N., Haruki, M., Morikawa, M., and Kanaya, S. (1999) Molecular diversities of



- RNase H. *J Biosci. Bioeng.* 88, 12-19.
- 31 Katayanagi, K., Miyagawa, M., Matsushima, M., Ishikawa, M., Kanaya, S., Nakamura, H., Ikehara, M., Matsuzaki, T., and Morikawa, K. (1992) Structural details of ribonuclease H from *Escherichia coli* as refined to an atomic resolution. *J. Mol. Biol.* 223, 1029-1052.
- 32 Ishikawa, K., Okumura, M., Katayanagi, K., Kimura, S., Kanaya, S., Nakamura, H., and Morikawa, K. (1993) Crystal structure of ribonuclease H from *Thermus thermophilus* HB8 refined at 2.8 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 230, 529-542.
- 33 You, D. J., Chon, H., Koga, Y., Takano, K., and Kanaya, S. (2007) Crystal structure of type 1 ribonuclease H from hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus tokodaii*: role of arginine 118 and C-terminal anchoring. *Biochemistry* 461, 1494-1503.
- 34 Muroya, A., Tsuchiya, D., Ishikawa, M., Haruki, M., Morikawa, M., Kanaya, S., and Morikawa, K. (2001) Catalytic center of an archaeal type2 ribonuclease H as revealed by X-ray crystallographic and mutational analyses. *Protein Sci.* 10, 707-714.
- 35 Dong, H., Mukaiyama, A., Tadokoro, T., Koga, Y., Takano, K., and Kanaya, S. (2008) Hydrophobic effect on the stability and folding of a hyperthermophilic protein. *J. Mol. Biol.* 378, 264-272.
- 36 Hollien, J., and Marqusee, S. (1999) A thermodynamic comparison of mesophilic and thermophilic ribonucleases H. *Biochemistry* 38, 3831-3836.
- 37 Hollien, J., and Marqusee, S. (2002) Comparison of the folding processes of *T.*

- thermophilus* and *E. coli* ribonucleases H. *J. Mol. Biol.* 316, 327-340.
- 38 Yamasaki, K., Ogasahara, K., Yutani, K., Oobatake, M., and Kanaya, S. (1995) Folding pathway of *Escherichia coli* ribonuclease H: A circular dichroism, fluorescence and NMR study. *Biochemistry* 34, 16552-16562.
- 39 Haruki, M., Tanaka, M., Motegi, T., Tadokoro, T., Koga, Y., Takano, K., and Kanaya, S. (2007) Structural and thermodynamic analyses of *Escherichia coli* RNase HI variant with quintuple thermostabilizing mutations. *FEBS J.* 274, 5815-5825.
- 40 Raschke, T. M., and Marqusee, S. (1997) The kinetic folding intermediate of ribonuclease H resembles the acid molten globule and partially unfolded molecules detected under native conditions. *Nature Struct. Biol.* 4, 298-304.
- 41 Raschke, T. M., Kho, J., and Marqusee, S. (1999) Confirmation of the hierarchical folding of RNase H: A protein engineering study. *Nature Struct. Biol.* 6, 825-831.
- 42 Spudich, G. M., Miller, E. J., and Marqusee, S. (2004) Destabilization of the *Escherichia coli* RNase H kinetic intermediate: Switching between a two-state and three-state folding mechanism. *J. Mol. Biol.* 335, 609-618.
- 43 Zhou, Z., Feng, H., Ghirlando, R., and Bai, Y. (2008) The high-resolution NMR structure of the early folding intermediate of the *Thermus thermophilus* ribonuclease H. *J. Mol. Biol.* 384, 531-539.
- 44 Mukaiyama, A., Haruki, M., Ota, M., Koga, Y., Takano, K., and Kanaya, S. (2006) A hyperthermophilic protein acquires function at the cost of stability. *Biochemistry* 45,

12673-12679.

- 45 Mukaiyama, A., Koga, Y., Takano, K., and Kanaya, S. (2008) Osmolyte effect on the stability and folding of a hyperthermophilic protein. *Proteins: Struct. Funct. Bioinf.* 71, 110-118.
- 46 Takano, K., Higashi, R., Okada, J., Mukaiyama, A., Tadokoro, T., Koga, Y., and Kanaya, S. (2008) Proline effect on the thermostability and slow unfolding of a hyperthermophilic protein. *J. Biochem.* 145, 79-85.
- 47 Luke, K. A., Higgins, C. L., Wittung-Stafshede, P. (2007) Thermodynamic stability and folding of proteins from hyperthermophilic organisms. *FEBS J.* 274, 4023-4033.
- 48 Tanaka, S., Saito, K., Chon, H., Matsumura, H., Koga, Y., Takano, K., and Kanaya, S. (2007) Crystal structure of unautoprocessed precursor of subtilisin from a hyperthermophilic archaeon: evidence for  $\text{Ca}^{2+}$ -induced folding. *J. Biol. Chem.* 282, 8246–8255.
- 49 Cavagnero, S., Debe, D. A., Zhou, Z. H., Adams, M. W. W., and Chan, S. I. (1998) Kinetic role of electrostatic interactions in the unfolding of hyperthermophilic and mesophilic rubredoxins. *Biochemistry* 37, 3369-3376.
- 50 Dams, T., and Jaenicke, R. (1999) Stability and folding of dihydrofolate reductase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. *Biochemistry* 38, 9169-9178.
- 51 Kaushik, J. K., Ogasahara, K., and Yutani, K. (2002) The unusually slow relaxation kinetics of the folding-unfolding of pyrrolidone carboxyl peptidase from a

- hyperthermophile. *Pyrococcus furiosus*. *J. Mol. Biol.* 316, 991-1003.
- 52 Jaswal, S. S., Sohl, J. L., Dans, J. H., and Agard, D. A. (2002) Energetic landscape of alpha-lytic protease optimizes longevity through kinetic stability. *Nature* 415, 343-346.
- 53 Iimura, S., Yagi, H., Ogasahara, K., Akutsu, H., Noda, Y., Segawa, S., and Yutani, K. (2004) Unusually slow denaturation and refolding process of pyrrolidone carboxyl peptidase from a hyper-thermophile are highly cooperative: Real-time NMR studies. *Biochemistry* 43, 11906-11915.
- 54 Zeeb, M., Lipps, G., Lilie H., and Balbach, J. (2004) Folding and association of an extremely stable dimeric protein from *Sulfolobus islandicus*. *J. Mol. Biol.* 336, 227-240.
- 55 Forrer, P., Chang, C., Ott, D., Wlodawer, A., and Plückthun, A. (2004) Kinetic stability and crystal structure of the viral capsid protein SHP. *J. Mol. Biol.* 344, 179-193.
- 56 Wittung-Stafshede, P. (2004) Slow unfolding explains high stability of thermostable ferredoxins: common mechanism governing thermostability? *Biochim. Biophys. Acta* 1700, 1-4.
- 57 Duy, C., and Fitter, J. (2005) Thermostability of irreversible unfolding alpha-amylases analyzed by unfolding kinetics. *J. Biol. Chem.* 280, 37360-37365.
- 58 Kaushik, J. K., Iimura, S., Ogasahara, K., Yamagata, Y., Segawa, S., and Yutani, K. (2006) Completely buried, non-ion-paired glutamic acid contributes favorably to the conformational stability of pyrrolidone carboxyl peptidases from hyperthermophiles. *Biochemistry* 45, 7100-7112.

- 59 Mishra, R., Olofsson, L., Karlsson, M., Carlsson, U., Nicholls, I. A., and Hammarström, P. (2008) A conformationally isoformic thermophilic protein with high kinetic unfolding barriers. *Cell. Mol. Life Sci.* 65, 827-839.
- 60 Costas, M., Rodríguez-Larrea, D., De, Maria. L., Borchert, T. V., Gómez-Puyou, A., and Sanchez-Ruiz, J. M. (2009) Between-species variation in the kinetic stability of TIM proteins linked to solvation-barrier free energies. *J. Mol. Biol.* 385, 924-937.
- 61 Goodwin, T.W., and Morton, R.A. (1946) The spectrophotometric determination of tyrosine and tryptophan in proteins. *Biochem. J.* 40, 628-632.
- 62 Pace, C. N. (1990) Measuring and increasing protein stability. *Trends Biotechnol.* 8, 93-98.
- 63 Santoro, M. M., and Bolen, B. W. (1988) Unfolding free energy changes determined by the linear extrapolation method. 1. Unfolding of phenylmethanesulfonyl alpha-chymotrypsin using different denaturants. *Biochemistry* 27, 8063-8068.
- 64 Funahashi, J., Takano, K., and Yutani, K. (2001) Are the parameters of various stabilization factors estimated from mutant human lysozymes compatible with other proteins? *Protein Eng.* 14, 127-134.
- 65 Yutani, K., Hayashi, S., Sugisaki, Y., and Ogasahara, K. (1991) Role of conserved proline residues in stabilizing tryptophan synthase alpha subunit: analysis by mutants with alanine or glycine. *Proteins: Struct. Funct. Genet.* 9, 90-98.
- 66 Li, Y., Reilly, P. J., and Ford, C. (1997) Effect of introducing proline residues on the

- stability of *Aspergillus awamori*. *Protein Eng.* 10, 1199-1204.
- 67 Richardson, J. S., and Richardson, D. C. (1988) Amino acid preferences for specific locations at the ends of alpha helices. *Science* 240, 1648-1652.
- 68 Watanabe, K., Masuda, T., Ohashi, H., Mihara, H., and Suzuki, Y. (1994) Multiple proline substitutions cumulatively thermostabilize *Bacillus cereus* ATCC7064 oligo-1,6-glucosidase. Irrefragable proof supporting the proline rule. *Eur. J. Biochem.* 226, 277-283.
- 69 Watanabe, K., Kitamura, K., and Suzuki, Y. (1996) Analysis of the critical sites for protein thermostabilization by proline substitution in oligo-1,6-glucosidase from *Bacillus coagulans* ATCC 7050 and the evolutionary consideration of proline residues. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 2066-2073.
- 70 MacArthur, M. W., and Thornton, J. M. (1991) Influence of proline residues on protein conformation. *J. Mol. Biol.* 218, 397-412.
- 71 Hardy, F., Vriend, G., Veltman, O. R., van der Vinne, B., Venema, G., and Eijssink, V. G. (1993) Stabilization of *Bacillus stearothermophilus* neutral protease by introduction of prolines. *FEBS Lett.* 317, 89-92.
- 72 González, J. M., Masuchi, Y., Robb, F. T., Ammerman, J. W., Maeder, D. L., Yanagibayashi, M., Tamaoka, J., and Kato, C. (1998) *Pyrococcus horikoshii* sp. nov., a hyperthermophilic archaeon isolated from a hydrothermal vent at the Okinawa Trough. *Extremophiles* 2, 123-130.

- 73 Atomi, H., Fukui, T., Kanai, T., Morikawa, M., and Imanaka, T. (2002) Description of *Thermococcus kodakaraensis* sp. nov., a well studied hyperthermophilic archaeon previously reported as *Pyrococcus* sp. KOD1. *Archaea* 1, 263-267.
- 74 Kim, P. S., and Baldwin, R. L. (1990) Intermediates in the folding reactions of small proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 59, 631-660.
- 75 Kuwajima, K., Nitta, K., Yoneyama, M., and Sugai, S. (1976) Three-state denaturation of  $\alpha$ -lactalbumin by guanidine hydrochloride. *J. Mol. Biol.* 106, 359-373.
- 76 Ptitsyn, O. B. (1995) Molten globule and protein folding. *Adv. Protein Chem.* 47, 83-229.
- 77 Baldwin, R. L., Frieden, C., and Rose, G. D. (2010) Dry molten globule intermediates and the mechanism of protein unfolding. *Proteins: Struct. Funct. Genet.* 78, 2725-2737.
- 78 Park, C., and Marqusee, S. (2005) Pulse proteolysis: A simple method for quantitative determination of protein stability and ligand binding. *Nature Methods* 2, 207-212.
- 79 Na, Y. R., and Park, C. (2009) Investigating protein unfolding kinetics by pulse proteolysis. *Protein Sci.* 18, 268-276.
- 80 Chang, Y., and Park, C. (2009) Mapping transient partial unfolding by protein engineering and native-state proteolysis. *J. Mol. Biol.* 393, 543-556.
- 81 Kim, M. S., Song, J., and Park, C. (2009) Determining protein stability in cell lysates by pulse proteolysis and Western blotting. *Protein Sci.* 18, 1051-1059.
- 82 Schägger, H. (2006) Tricine-SDS-PAGE. *Nature Protoc.* 1, 16-22.



- 83 Semisotnov, G. V., Rodionova, N. A., Kutysenko, V. P., Ebert, B., Blanck, J., and Ptitsyn, O. B. (1987) Sequential mechanism of refolding of carbonic anhydrase B. *FEBS Lett.* 224, 9-13.
- 84 Kuwajima, K. (1989) The molten globule state as a clue for understanding the folding and cooperativity of globular-protein structure. *Proteins: Struct. Funct. Genet.* 6, 87-103.
- 85 Muroya, A., Tsuchiya, D., Ishikawa, M., Haruki, M., Morikawa, M., Kanaya, S., and Morikawa, K. (2001) Catalytic center of an archaeal type 2 ribonuclease H as revealed by X-ray crystallographic and mutational analyses. *Protein Sci.* 10, 707-714.
- 86 DeLano, W. L. (2004) PyMOL User's Guide. DeLano Scientific San Carlos, California.
- 87 Thompson, J. D., Higgins, D. G., and Gibson, T. J. (1994) Clustal W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids Res.* 22, 4673-4680.
- 88 Cavallo, L., Kleinjung, J., and Fraternali, F (2003) POPS: A fast algorithm for solvent accessible surface areas at atomic and residue level. *Nucl. Acids Res.* 31, 3364-3366.
- 89 Page, R. D. (1996) Treeview: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput. Appl. Biosci.* 12, 357-358.
- 90 Connolly, M. L. (1993) The molecular surface package. *J. Mol. Graph.* 11, 139-141.
- 91 Takano, K., Yamagata, Y., and Yutani, K. (2001) Role of non-glycine residues in left-handed helical conformation for the conformational stability of human lysozyme.

本研究に関する論文

Takano, K., Higashi, R., **Okada, J.**, Mukaiyama, A., Tadokoro, T., Koga, Y., and Kanaya, S. (2008) Proline effect on the thermostability and slow unfolding of a hyperthermophilic protein. *J. Biochem.* 145, 79-85.

**Okada, J.**, Okamoto, T., Mukaiyama, A., Tadokoro, T., You, D. J., Koga, Y., Takano, K., and Kanaya, S. (2010) Evolution and thermodynamics of slow unfolding of hyperstable monomeric proteins. *BMC Evol. Biol.* 10, 207.

**Okada, J.**, Koga, Y., Takano, K., and Kanaya, S. (2012) Slow unfolding pathway of hyperthermophilic Tk-RNase H2 examined by pulse proteolysis using the stable protease Tk-Subtilisin. *Biochemistry* 51, 9178-9191.

その他の論文

Takano, K., Okamoto, T., **Okada, J.**, Tanaka, S., Angkawidjaja, C., Koga, Y., and Kanaya, S. (2011) Stabilization by fusion to the C-terminus of hyperthermophile *sulfolobus tokodaii* RNase HI: a possibility of protein stabilization tag. *PLoS ONE* 6, e16226.

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、多大なる御指導ならびに御鞭撻を賜りました大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻 金谷茂則教授に謹んで感謝の意を表します。

本研究を進める上で、直接の御指導と適切な御助言を賜りました京都府立大学大学院生命環境科学研究科応用生命科学専攻 高野和文教授に心より感謝いたします。本研究に際し、暖かい激励と御指導を賜りました大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻 古賀雄一準教授に謹んで御礼申し上げます。

本論文をまとめるにあたり、有益な御助言を賜りました大阪大学大学院工学研究科生命先端科学専攻 宮田幹二教授、伊東忍教授に深く感謝いたします。最後に長い研究室生活においてお世話になった金谷研究室の皆様、高野研究室の皆様我心から感謝いたします。

