The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Study on Correlation of Protein Stability and Dynamics with Function
Author(s)	李, 映昊
Citation	大阪大学, 2008, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/48782
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【67】

氏　　名	李（リー）　映昊（ヨンホ）
博士の専攻分野の名称	博　士（理　学）
学　位　記　番　号	第　２１７８２　号
学位授与年月日	平成 20 年３月 25 日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当 理学研究科高分子科学専攻
学　位　論　文　名	Study on Correlation of Protein Stability and Dynamics with Function （蛋白質の安定性やダイナミクスと機能との相関に関する研究）
論文審査委員	（主査） 教　授　後藤　祐児 （副査） 教　授　山本　　仁　　准教授　高橋　　聡　　准教授　池上　貴久

論　文　内　容　の　要　旨

蛋白質は DNA にコードされた遺伝子情報から転写を介してそれぞれのアミノ酸残基配列をもつ鎖に翻訳される。紐状の一次構造は“フォールディング”反応を通じて天然の特異的な三次構造に変換され、固有の機能を発揮する。天然構造はエネルギー的に同じ程度の安定性を持つ様々な構造の集団で構成されている。これらの間を行き来する蛋白質の“ダイナミクス”は酵素の機能と密接な関係があると報告されている。また蛋白質の安定性の低下や“間違ったフォールディング”は蛋白質の固有の機能の損失や“アミロイド線維”と呼ばれる病気と関係がある凝集体の形成を引き起す。本研究ではこれまで安定性の評価が困難であった大きな蛋白質の構造安定性や、蛋白質のダイナミクスと機能の相関を調べた。加えて、様々な形状のアミロイド線維の体積に対する研究を行った。

最初に、35 kDa のフェレドキシン（Fd)-$NADP^+$ 還元酵素（FNR）の構造安定性を核磁気共鳴（NMR）分光法とアミド水素-重水素（H/D）交換法を用いて調べた。FNR は 20 kDa 以下の小さな球状蛋白質に比べて非常に安定な蛋白質であった。また二つの pH で実験を行うことにより、pH に依存した FNR のダイナミクスが活性に関与していることを示唆した。NMR を組み合わせた H/D 交換法は、変性が不可逆である蛋白質の構造安定性の評価に有用であることが分かった。同時に、蛋白質のダイナミクスと機能の関係を調べるにも良い方法であることが分かった。

そして FNR のダイナミクスが機能にどのように働くかを等温滴定熱量測定（ITC）と、NMR による ^{15}N 緩和速度及び H/D 交換速度法を用いて調べた。ITC の結果から Fd-FNR 複合体の形成はエントロピー駆動であることが分かった。^{15}N 緩和速度法から Fd が結合することで FNR の小さな揺らぎの増大が分子全体に渡って検出された。このことから揺らぎの増大によるコンフォメーションエントロピーの増加が結合のエントロピー増加に寄与することが分かった。しかし ^{15}N 緩和速度及び H/D 交換速度法からは、Fd の結合に伴う FNR の C 末端側の大きな揺らぎの減少が検出された。この減少は生産物の放出を加速化させ、活性の増加を引き起すと考えられる。

最後に、β2 ミクログロブリン（β2m）とそのフラグメントの一つである K3 が形成する様々なアミロイド線維の体積を振動式密度計を用いて調べた。K3 のアミロイド線維形成には大きな体積の低下が伴った。この結果から K3 が重合した線維は線維内部の充填密度が非常に高いことが分かった。加えてβ2m が形成する二つの異なる形状のアミロイド線維の密度測定を行った。一つは剛直な線維で、体積の増大を示したが、他方の柔軟な線維は体積の減少を示した。剛直な線維の体積の増加は線維内部の空隙形成による充填密度の低下によると解釈された。一方柔軟な線維

の体積の低下は、水和と比較的に高い充填密度のためと結論づけられた。一般的に天然構造への構造形成は体積の増大を伴うのに対し、線維の構造形成は線維の異なる形状によって体積変化の多様性を持つことが分かった。

論文審査の結果の要旨

蛋白質の天然構造のダイナミクスは蛋白質の機能と密接な関係がある。また構造安定性の低下やミスフォールディングは、機能の損失や、アミロイド線維と呼ばれる凝集体の形成をもたらす。本論文ではこれまで安定性の評価が困難であった大きな蛋白質の構造安定性や、ダイナミクスと機能の相関を調べた。加えて、様々な形状のアミロイド線維の体積に対する研究を行った。

まず、フェレドキシン（Fd)-$NADP^+$ 還元酵素（FNR）の構造安定性を、NMR 分光法とアミド水素-重水素（H/D）交換法を用いて調べた。FNR はこれまで溶液 NMR によって研究された中では大きな蛋白質であるが、その構造安定性を残基レベルで評価すると共に、pH に依存したダイナミクスの変化が活性に関与していることを示した。つぎに Fd-FNR 複合体の形成反応を、等温滴定熱量測定と NMR による ^{15}N 緩和速度及び H/D 交換法を用いて調べた。そして、コンフォメーションエントロピーの増加が複合体の安定化に大きな寄与をすること、局所的なダイナミクスの減少が活性に重要であることを明らかにした。また、β2 ミクログロブリンとそのフラグメントが形成する様々なアミロイド線維の体積を振動式密度計によって調べ、線維の形状の違いによって体積変化は多様であることを明らかにした。

本論文は、蛋白質の構造安定性やダイナミクスと機能との相関を、NMR の各種手法と熱測定を駆使して明らかにした優れた論文である。よって、本論文は博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。