

学位論文題名

バルナーゼの遺伝子工学手法を用いた
改変による蛋白質の構造論的研究

学位論文内容の要旨

本論文は、蛋白質の立体構造をモジュールというサブ構造からなる構造として理解する実験科学的試みについて記述した。球状蛋白質は、構造的な特徴の「コンパクトさ」に基づき、いくつかのモジュールに分割できる。このモジュールの境界に、真核生物の遺伝子上のイントロンの挿入位置が対応していることが、いくつかの蛋白質とその遺伝子において見出されている。真核生物の遺伝子構造は、原始的生命体の遺伝子上ではエクソンとモジュールの一対一の対応が成り立っていたことを示しているのかもしれない。また、それはモジュールが初期生物進化の過程で原始酵素として機能した名残かもしれない。本研究では、リボヌクレアーゼの一種のバルナーゼのモジュール単位 (M1-M6) での構造形成と機能、およびモジュールを一次配列上で入れ換えた蛋白質の物理化学的性質について調べた。背景にある主たる関心は、蛋白質の分子進化を明らかにすること、および蛋白質の構造を合理的に理解する、という点にある。

本論文は、序章とそれに続く五つの章および結論からなる。

序章では、蛋白質のフォールディングと蛋白質の分子進化、および研究の目的について記述した。

個々のモジュールが何らかの機能的な役割をもつならば、モジュールが

生物進化の過程で原始的な酵素として働いていた可能性（モジュール仮説）を支持する証拠となる。このような考えから、第一章ではリボヌクレアーゼの一種であるバルナーゼのモジュールのもつ機能的な潜在力を調べた。酸性アミノ酸残基に対して塩基性アミノ酸残基を多くもつモジュール M2, M3, M6 は、RNA と結合し、RNase 活性をもっていた。バルナーゼ由来でない塩基性ペプチドも同様の活性をもっていた。モジュールによる RNA の切断部位が RNA の構造的に揺らぎが大きいところであるなど、基質に依存した活性ではあるが、活性が酵素蛋白質の汚染によるのではなく、ペプチド自身が RNA の切断活性をもつ証拠を示すことができた。この結果は、生物進化の初期過程において、モジュールに相当する程度の長さ（10-40 残基）のペプチド断片が、弱いながらも触媒機能として働いていたのではないかという「モジュール仮説」を支持するものである。

第二章では、蛋白質のモジュールは独立した構造形成単位か、について調べた結果を示した。モジュールに相当するペプチド断片は、いずれも単量体では水溶液中で安定な二次構造を形成できなかった。しかし、モジュール中の α -ヘリックスやターン構造がトリフルオロエタノールのような非極性溶媒中で安定化されることを見出した。これらの構造はいずれも天然蛋白質中での構造に相当している。また、モジュール M1 の場合には、水溶液中での会合化を通じて天然構造と同じ構造が形成されることが明らかになった。これらの結果は、蛋白質の構造安定性は配列上離れた部分との相互作用に決定的に依存しているが、どのような構造を形成し易いかという構造に対する特異性は、モジュールのアミノ酸配列の中に保持されていることを示している。

第三章では、蛋白質中のモジュールの構造的なふるまいを調べるために、二つのモジュール入れ換え変異体を作製し、その蛋白質の物理化学的性質

について調べた結果を示した。バルナーゼのモジュール入れ換え蛋白質の「ナバルーセ」と「バルセーナ」は、それぞれバルナーゼの一次配列上でモジュール M1 と M2、および、M2 と M3 の配列部分を入れ換えたものである。バルナーゼ遺伝子の一部を組み換えた変異体遺伝子を作製し、大腸菌での蛋白質の大量発現系を構築した。二つの入れ換え蛋白質の構造について調べた結果を以下にまとめる。

ナバルーセは二次構造を保持していたが、高次構造形成に由来する特異的な相互作用をもっていなかった。バルセーナはナバルーセとよく似た二次構造組成をもっており、加えて特異的な側鎖間の相互作用を形成していた。しかし、バルセーナの構造安定性は野生型バルナーゼと比べるとずっと低く、構造の揺らぎが大きかった。また、ナバルーセ、バルセーナ共に、疎水性残基の側鎖を蛋白質内部に埋め込み、溶媒に接触する部分に親水性の残基側鎖が位置する天然の球状蛋白質に特徴的な側鎖のパッキングは形成されなかった。本研究によって明らかになったことは、一次配列の構成、および三次構造の形成の度合いが異なるにもかかわらず、二つの入れ換え蛋白質でよく似た遠紫外 CD スペクトルが観測されたことである。このことは、特異的な高次構造の形成によらずに形成可能な部分構造が、部分配列にコードされていることを示している。

第四章では、野生型バルナーゼの N 末端に、モジュール M2 のペプチド配列を融合させた蛋白質「ナバルナーゼ」の構造について調べた結果を示した。ナバルナーゼは、バルナーゼと同じ触媒活性と遠紫外 CD スペクトルの特徴を保持していた。この結果は、N 末端につけた M2 部分以外のナバルナーゼの構造とバルナーゼの構造が、同じであることを示唆する。ナバルナーゼとバルナーゼの差スペクトルから、N 末端につけたペプチド部分は、主にランダムコイル構造として存在していることが示唆された。しかし、この差スペクトルを M2 のペプチド断片の CD スペクトルと比べてみると、

差スペクトル上において α -ヘリックス構造が相対的に安定化されていることが明らかになった。このことは、N末端のペプチド部分と蛋白質との相互作用が、ペプチド部分の天然蛋白質上での構造と同じ構造を安定化したことを示す。

第五章では、作り出した入れ換え蛋白質「バルセーナ」の安定化をいかに図るか、という関心から構造モデリングを行った結果について述べた。入れ換えを行った部分配列に対応する部分構造を野生型バルナーゼの構造から移植し、全体構造のモデルを作り上げる方法を示した。得られた蛋白質の構造評価を行い、構造上の弱点をアミノ酸変異の導入により改善することが、次の段階の課題である。

結論の章では、以上の結果についてのまとめを記述した。本研究において、モジュールに相当するペプチド断片に、RNAに対する結合性とRNase活性が見出された。このことは、モジュールに相当する程度の長さのペプチドが、原始酵素として弱いながらも機能していた可能性についての実験科学的な根拠を与えるものである。また、ペプチド断片それ自身だけでは天然蛋白質様の構造形成することは出来なかったが、種々の非天然の環境下において部分配列と蛋白質の局所的な構造との間に対応関係が見られたことは、蛋白質の構造を階層化構造として読み解くのできる証拠を示している。

学位論文審査の要旨

主査	教授	加茂直樹
副査	教授	横沢英良
副査	助教授	澤田均
副査	講師	宮内正二

学位論文題名

パルナーゼの遺伝子工学手法を用いた 改変による蛋白質の構造論的研究

序章として、本研究に至った背景が述べられている。Anfinsen の有名なリボヌクレアーゼの巻き戻り実験によって、「蛋白質の天然構造は自由エネルギーの巨視的な最小値にあたる構造である」ことが確立されている。このテーゼは、現在精力的に進められている蛋白質の構造研究の最も基本的な出発点である。そして、その具体的内容である「いかにアミノ酸配列が立体構造を規定しているか」という点を理解することが、蛋白質の構造研究の当面の目標である。しかしながら、多くのグループの精力的な研究にもかかわらず、蛋白質の立体構造形成の一般的な機構はまだ明らかになっていない。

一方、自然界にある蛋白質の立体構造を見てみると、階層性が見られることが分かってきた。水溶性の蛋白ではサブユニットからなっているが、そのサブユニットはドメインと呼ばれる球状のかたまりが1個または数個連なっている。そのドメインはモジュールと呼ばれるコンパクトにまとまったサブ構造から構成されている。すなわち、いわば、ドメインはモジュールの寄せ木細工である。X線結晶解析やNMRの測定が

らモジュールの構造を決めることができる。

真核生物の遺伝子は、エクソンの間にイントロンが割り込んだ配列を持っている。最近の研究では、エクソンとモジュールが対応するとの説が有力である。これは、蛋白の分子進化の「エクソンシャッフリング仮説」のもとになっている。すなわち、最も原始的な遺伝子は一つのエクソンを単位としていて、その翻訳産物が原始的な蛋白質であったとするものである。そして、現在、様々な生物に見られるような多様な遺伝子群は、原始的なエクソンが組みあわされ、一つながりになることにより出来上がってきた。そして、その際に、イントロンは遺伝子をつなぐ「のりしろ」の役割を果たした。モジュールという機能単位が集まって、1つの効率的な機能単位（蛋白質）が誕生したと考えるのである。これがこの仮説の要点である。

このような状況のもとに、学位申請者の吉田賢二は、立体構造が既知でありモジュール構造が計算でき、且つ、遺伝子操作によって人工的に改変可能な蛋白質として、バルナーゼを選んだ。バルナーゼは*Bacillus amyloliquefaciens* により菌体外に分泌される非特異的な基質特異性をもつリボヌクレアーゼである。

第1章では、バルナーゼの6個のモジュールを、ペプチド合成機で合成し、各々のモジュールのRNase活性を調べた。活性は弱い、ペプチド断片が活性を示した。従って、生物進化の初期過程において、モジュールに相当する程度の長さのペプチド断片が弱いながらも触媒として機能していたのではないかという仮説を支持した。

第2章では、合成されたモジュールの構造を、CD測定、超遠心分析、電子顕微鏡観察、走査トンネル顕微鏡（STM）観察の物理化学的な方法で調べた。モジュールに相当するペプチド断片は、単独では水溶液中で安定な二次構造を形成出来なかった。しかし、トリフルオロエタ

ノールのような非極性溶媒中に於て、 α -ヘリックスやターン構造が安定化されることが見いだされた。また、モジュールM1と名付けたものでは、水溶液中の会合によって天然構造中と同じ構造が形成されることが明らかになった。以上の結果は、構造安定性は配列上の離れた部分との相互作用に依存しているが、度のような構造を形成するかはモジュールのアミノ酸配列の中に保持されていることが示された。

第3章では、バルナーゼのモジュールの順序を入れ変えた変異蛋白質の性質を調べている。それは、第2章で、構造安定性が配列上離れた部分との相互作用に依存していることが分かったからである。まず、変異蛋白質の大腸菌での大量発現系を構築している。一次配列の構成、および三次構造の形成の度合いが異なるにもかかわらず、二つの入れ換え蛋白質で非常に良く似た遠紫外のCDスペクトルが観察された。その他の物理化学的な測定結果をあわせて、蛋白質に存在している構造は、非特異的な疎水相互作用により安定化されている事が示唆された。

第4章では、バルナーゼのN末端にモジュールM2を付けた融合蛋白質を作製している。M2モジュールとバルナーゼが単独に存在するときと融合蛋白質の構造を比較した。M2モジュールはより α -ヘリックスが安定化されていることが分かった。

第5章では、自身の研究を蛋白質のモデリングという立場で検討し直して、将来のこの方面の研究に興味ある示唆を与えている。

このように、吉田賢二の研究はモジュールという概念から蛋白質の高次構造を議論したもので、博士（薬学）を授与するに十分であると判定した。