

学 位 論 文 題 名

Interaction of Amino Acids, Peptides and Proteins with Solvent Molecules in Aqueous Solution

（アミノ酸，ペプチド，蛋白質と溶媒分子種の相互作用）

学位論文内容の要旨

蛋白質は水溶性蛋白質と水に不溶性の膜蛋白質の二つに大きく分類される。その構造や機能発現にはそれ自身のみならず溶媒中の様々な分子種との相互作用が重要な役割を果たしている。本研究はこの蛋白質と媒体間の相互作用を物理化学的な変数によって一般化された形で記述し、また熱力学的手法によってその相互作用と安定性を評価する事を目的とする。

水溶性蛋白質の場合、その活性や安定性は溶液中に存在する様々な物質の影響を受ける。一方膜蛋白質は、その表面は脂質 2 重膜の中に埋もれて存在している疎水的部分と、環境に露出し、水和している親水的部分から成る。膜蛋白質の場合、親水的部分に作用する溶液中の物質に影響を受ける一方、その疎水的部分を取り囲んでいる両親媒性物質にも大きく影響される。

以上の観点から蛋白質と溶液中の様々な溶媒分子種との 3 つの相互作用に着目し、研究を行った。

第一点は蛋白質の構成要素であるアミノ酸の水との相互作用、水和である。蛋白質の水和の性質は表面に露出しているアミノ酸残基の水和の性質に大きく依存している。水溶液中の蛋白質の水和についての基礎的な知見を得るために、15 種類のアミノ酸と Hexamer までのグリシンペプチドの Dynamic Hydration Number (動的水和数、 n_{DHN}) をアミノ酸水溶液中の天然存在比での ^{17}O -NMR のスピン-格子緩和時間 (T_1) から算出した。

一連の疎水性アミノ酸と Monomer から Pentamer までのグリシンペプチドで得られた n_{DHN} の値は、これらのアミノ酸水溶液について得られている様々な物理化学的性質（部分モル体積・部分モル断熱圧縮率・部分モル比熱など）と非常によい一次相関関係を示した。 n_{DHN} は定義より水分子の回転の緩和時間という動的な因子と水分子の配位数という静的な因子の両方を含んでいる。そのため、アミノ酸のような両親媒性の物質の水和の性質をよく示すことができるといえる。

さらに、魚の精巢から得られる 30 残基程度の DNA 結合蛋白質 protamine の 1 種 clupeine について n_{DHN} の測定を行った。グリシンペプチドの測定より、溶液

中でランダムな構造を取っている場合、ペプチドの n_{DHN} は個々の構成アミノ酸の n_{DHN} の和に等しいことがわかった。clupeineは分光学的な研究の結果、DNAが存在しない場合には水溶液中でランダムな構造を取っていることが報告されている。clupeineに対して得られた n_{DHN} は構成アミノ酸の n_{DHN} の総和にほぼ等しかった。これは溶液中でclupeineがランダム構造を取っていることを示しており、分光学的な研究結果を裏付けるものであった。

次に水溶性蛋白質について水以外の溶媒分子種との相互作用、溶媒和の蛋白質の物理化学的性質に与える影響を検討した。 α -キモトリプシン(α -CT)はNaCl等の塩の存在下では2量体を形成することが報告されている。NaClのみを含む溶液中と α -CTが2量体を形成しない磷酸緩衝溶液中で、 α -CT水溶液の音速、密度、 -30°C での ^1H -NMRのスペクトルの測定並びに ^{31}P -NMRの T_1 測定を行った。これらの測定から得られる部分比容、部分比断熱圧縮率、不凍水の量(水和量)が溶媒のイオン強度の変化に対してどの様に変化するかを検討した。

NaCl溶液中で、 α -CTの部分比容と部分比断熱圧縮率は溶媒のイオン強度の増加と共に高濃度側で大きく増加したが、リン酸緩衝溶液中では高濃度側で増加量が減少し、一定値に近づくという挙動を示した。不凍水量も同様の变化を示した。 ^{31}P -NMRの T_1 の測定結果をLangmuirタイプの吸着式で解析し、得られた磷酸イオンの吸着サイト数は α -CT分子表面に存在する正の荷電残基の数とほぼ一致した。その結合定数は100程度と小さかった。

これらの結果から、 α -CT分子はNaCl溶液中では2量体を形成する為に水和量と分子容が増し、圧縮率などの大きな増加を生じる一方、磷酸緩衝溶液中では磷酸イオンの吸着が水分子との置換で起きる弱い結合であるために圧縮率などの増加がともに頭打ちになるといえる。これは溶媒分子の違いが大きく蛋白質分子の性質を左右する一例である。

最後に膜蛋白質を可溶化している界面活性剤がその膜蛋白質の性質にどのような影響を与えるかを調べた。光合成細菌由来の光合成反応中心膜蛋白質(RC)を用いて、熱安定性を指標として検討した。使用した界面活性剤はイオン性のLDAO、中性で糖残基が親水基の β -OD、両性で嵩高い疎水性基を持つCHAPSの3種類である。

これらのRC水溶液についてDSC測定、CD並びにUVの温度スキャン測定で得た蛋白質の熱変性温度は $\text{LDAO} < \beta\text{-OD} < \text{CHAPS}$ の順で高くその差は 10°C にもなった。また、熱変性に対する可逆性も同じ順で高くなった。この膜蛋白質の熱安定性は用いる界面活性剤の種類で大きく異なったが、それは界面活性剤自身の構造と水和の性質に密接に結びついていると考えられる。

以上述べた結果から蛋白質の性質と相互作用の解明には構成要素のアミノ酸の性質の解明が重要であること、また、溶媒との相互作用に依存して蛋白質の性質が大きく変化する事を見いだした。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 引 地 邦 男

副 査 教 授 新 田 勝 利

副 査 教 授 長 田 義 仁

副 査 教 授 堤 耀 廣 (大学院工学研究科)

学 位 論 文 題 名

Interaction of Amino Acids, Peptides and Proteins with Solvent Molecules in Aqueous Solution

(アミノ酸、ペプチド、蛋白質と溶媒分子種の相互作用)

近年、蛋白質と水あるいはそこに溶解している様々なイオン、脂質との相互作用の重要が指摘されている。しかし、その相互作用の詳細はいまだ明確ではない。本論文はこれらの相互作用と蛋白質の安定性に及ぼす効果を、 ^{17}O -NMR のスピン-格子緩和時間 (T1)、 ^1H -NMR のスペクトル強度、 ^{31}P -NMR の T1、円二色性、紫外吸収の温度依存性等の分子レベルの測定と、音速、密度、示差熱等のマクロな測定を併用して研究した結果をまとめたものである。構成アミノ酸、30 残基のペプチド、蛋白質について研究を行い、コンホメーションとの関連について述べている。

水溶液中の蛋白質の水和についての基礎的な知見を得るために、15 種類のアミノ酸と Hexamer までのグリシンペプチドについて、水溶液の ^{17}O -NMR の T1 を測定し、その結果を、申請者が初めて導入した Dynamic Hydration Number (動的水和数、nDHN) というパラメータで整理した。一連の疎水性アミノ酸と Monomer から Pentamer までのグリシンペプチドで得られた nDHN の値は、これらのアミノ酸水溶液についてすでに報告されている部分モル体積、部分モル断熱圧縮率、部分モル比熱などと非常によい相関関係があることを見出した。nDHN は、水分子の回転緩和時間と水分子の配位数が関与し、動的因子と静的因子の両方を含んでおり、アミノ酸のような両親媒性物質の水和の性質をよく表すと結論している。さらに、30 残基のペプチドについて調べ、溶液中でランダムな構造を取っている場合、ペプチドの nDHN は個々の構成アミノ酸の nDHN の和に等しいことを示した。これは蛋白質のコンホメーションを調べる 1 つの方法を提供するものである。

従来、蛋白質の物理化学的性質を調べるのに燐酸緩衝溶液を用いている場合が多いが、蛋白質と燐酸イオンの相互作用についてはいまだ明確ではない。申請者は、 α -キモトリプシン (α -CT) の NaCl 溶液と燐酸緩衝溶液について、音速、密度、 -30°C での ^1H -NMR スペクトルおよび ^{31}P -NMR T1 測定を行い、両者の比較

から α -CT と磷酸イオンとの相互作用について研究した。NaCl 溶液中で、 α -CT の部分比容と部分比断熱圧縮率は溶媒のイオン強度の増加と共に高濃度側で増加したが、リン酸緩衝溶液中では一定値に近づくことを見出した。不凍水量も同様の变化を示した。31P-NMR の T1 の結果から得られた磷酸イオンの吸着サイト数は α -CT 分子表面に存在する正の荷電残基の数とほぼ一致した。その結合定数は 100 程度と小さい。これらの結果から、 α -CT 分子は NaCl 溶液中では 2 量体を形成するが、磷酸イオンは吸着水分子と置換して吸着していると結論した。

最後に、界面活性剤と光合成細菌由来の光合成反応中心膜蛋白質 (RC) との相互作用について述べている。界面活性剤はイオン性の LDAO、中性で糖残基が親水基の β -OD、両性で嵩高い疎水性基を持つ CHAPS の 3 種類を用いている。これらの RC 水溶液について DSC 測定、CD および UV の温度スキャン測定で得た蛋白質の熱変性温度は LDAO < β -OD < CHAPS の順で高いことを見出し、膜蛋白質の安定性は界面活性剤自身の構造と水和の状態に深くか関係していると述べている。

本論文で述べられた結果は蛋白質の物理化学的性質の基礎的知見として高く評価される。審査員一同は申請者が博士（理学）の学位を得る十分な資格があると認めた。