

学位論文題名

分子動力学／自由エネルギー摂動法を用いた staphylococcal nuclease 変異体の熱安定性の解析

学位論文内容の要旨

序論

酵素の活性の最適温度は、37° C付近であり、より高温では、変性により失活してしまう。しかしながら、もし酵素が耐熱化されれば、より高温で反応を行う事ができ、アレニウスの式から推察される通り、酵素反応は促進されると期待される。従って、耐熱化した酵素をデザインする事は、酵素の工業的利用にとって重要な問題である。酵素などのタンパク質を耐熱化を行う方法として、(1)水素結合の導入と、(2)疎水性相互作用の増強の二つが考えられる。

水素結合の改変によってタンパク質の安定化に成功した例としては、subtilisin N218S変異体がある[Bryan et al. (1986)]。しかしながら、水素結合が、タンパク質の安定化に寄与しないとの意見もある。第一に、タンパク質が変性して天然構造が壊れるとこれまで形成していた水素結合は切断されるが、新たに水と水素結合するので、水素結合の出入りが変わらないためである。また、subtilisin N218S変異体の様な、水素結合の架け替えを除いて、新規に水素結合を導入する置換は、水素結合基の大きな水和の自由エネルギー差により変性状態が有利となるため、本質的にタンパク質を不安定化すると考えられるからである。

疎水性相互作用の増強によってタンパク質の安定化に成功した例としては、tryptophan synthaseの α -サブユニットのE49I変異体がある[Yutani et al. (1987)]。ところで、疎水性残基をタンパク質内部に導入する様なアミノ酸置換を行うためには、タンパク質内部に大きな空隙が存在しなければならない。しかし、一般に、空隙はタンパク質内部に分散しているため、大きな空隙は存在しないと考えられている。また、側鎖の回転の自由度にも限りがあるので、うまく空隙に入るとは限らない。実際、T4 LysozymeのA129V及びL133F変異体[Karpusas et al. (1989)]の場合では、天然状態において不利な構造変化をもたらしたため、タンパク質は不安定化していた。

この様に、タンパク質の耐熱化は非常に困難であり、タンパク質を耐熱化する試みは、成功する数より失敗する数の方が多い。

方法

タンパク質におけるアミノ酸置換によって引き起こされた性質の変化をコンピューター・シミュレーションで評価する方法として、分子動力学／自由エネルギー摂動法がある。そこで、この分子動力学／自由エネルギー摂動法を用いて、まず最初に、疎水性の定量的尺度であるアミノ酸間の水和の自由エネルギー差を検証した。次いで、Shortleらによって、数多くの変異体がつくられ、その熱安定性が測定されているstaphylococcal nucleaseの三つの変異体、A69T、G88V及びM32Aの熱安定性について解析を行い、タンパク質の熱安定性に対する水素結合と疎水性相互作用の役割を明らかにする事を試みた。

結果と考察

○水和の自由エネルギー差

アミノ酸側鎖の疎水性は、タンパク質の熱安定性において重要な役割を果たしていると考えられる。この疎水性の定量的尺度は、アミノ酸間の水和の自由エネルギー差から与えられる。これまで、分子動力学／自由エネルギー摂動法で計算されたアミノ酸間の自由エネルギー差は、実験値と一致すると信じられてきた。近年、Sharpら(1991)は、水和の自由エネルギー差の実験値[Wolfenden et al. (1979, 1981); Radzicka et al. (1988)]を、Flory-Huggins理論に基づき補正する必要性を指摘し、また、実験値と計算値の一致について再評価する必要性を示唆した。

そこで、分子動力学／自由エネルギー摂動法を使ってアミノ酸間の水和の自由エネルギー差を計算し、得られた計算値を実験値及びSharpらの補正值と比較した。その結果、計算値は、Sharpらの補正值と一致した。

○Staphylococcal nuclease A69T変異体の熱安定性

分子動力学／自由エネルギー摂動法によるA69T変異体の熱安定性は、計算値-2.8 kcal/molとなり、実験値-2.7 kcal/mol [Shortle and Meeker (1986)]と良く一致していた。Ala69→Thrの置換は、天然状態及び変性状態共に、自由エネルギー的に有利であるが、変性状態での自由エネルギー変化がより有利であるので、結果として、A69T変異体は野生型よりも不安定化していた。A69T変異体の天然状態において、Thr69の側鎖の水酸基がMet65の主鎖のカルボニル基との間に水素結合を新たに形成しているが、水酸基が完全に水に露出している変性状態の方がより自由エネルギー的に有利であるため、この水素結合は、熱安定性に対する安定化効果を発揮していなかった。

○Staphylococcal nuclease G88V変異体の熱安定性

分子動力学／自由エネルギー摂動法によるG88V変異体の熱安定性は、計算値-1.1 kcal/molとなり、実験値-1.0 kcal/mol [Shortle and Meeker (1986)]と良く一致していた。Gly88→Valの置換は、天然状態及び変性状態共に、自由エネルギー的に不利であるが、天然状態での自由エネルギー変化がより不利であるので、G88V変異体は野生型よりも不安定化していた。G88V変異体の天然状態において、Val88の側鎖の立体障害のため、Met32、Phe34及びPhe76が動いて、空隙が生じ、ファン・デル・ワールス相互作用が失われたため、自由エネルギー的に大きく不利になっていた。しかし、Gly→Valの置換は、本質的に変性状態の自由エネルギーを不利にするため、天然状態での立体障害が無ければ、タンパク質の安定化に働く事がわかった。

○Staphylococcal nuclease M32A変異体の熱安定性

分子動力学／自由エネルギー摂動法によるM32A変異体の熱安定性は、計算値-1.9 kcal/molとなり、実験値-1.7 kcal/mol [Shortle et al. (1990)]と良く一致していた。Met32→Alaの置換は、天然状態及び変性状態共に、自由エネルギー的に不利であるが、天然状態での自由エネルギー変化がより不利であるので、M32A変異体は野生型よりも不安定化していた。M32A変異体の天然状態において、Met32が側鎖の短いAlaに置換されたため、新たに生じた空隙に水分子が侵入して、Thr27、Phe34及びPhe76からなる疎水環境を破壊されていた。そのため、疎水性相互作用が失われ、自由エネルギー的に大きく不利になっていた。このことから、Thr27、Phe34及びPhe76からなる疎水コアが、staphylococcal nucleaseの熱安定性にとって重要である事、また、Met32は、この疎水コアを保護する役割を担っている事がわかった。M32A変異体の様に天然状態において不利な構造変化をもたらす置換は、変性状態の自由エネルギーを不利にするとはいえ、タンパク質の安定化に有効ではない事が明らかとなった。

学位論文審査の要旨

主 査	教 授	加 茂 直 樹
副 査	教 授	栗 原 堅 三
副 査	助教授	宮 内 正 二
副 査	助教授	三 宅 教 尚

学 位 論 文 題 名

分子動力学／自由エネルギー摂動法を用いた staphylococcal nuclease 変異体の熱安定性の解析

本学位論文は、6章からなる68ページの論文である。序論では、酵素の耐熱化の重要性をのべ、耐熱化の方法として水素結合の導入、疎水性相互作用の増強、変性状態における構造エントロピーの減少による安定化があることを述べている。

タンパク質におけるアミノ酸残基の置換によって引き起こされた性質の変化をコンピュータシミュレーションで評価する方法として、分子動力学／自由エネルギー摂動法がある。申請者は、この方法をstaphylococcal nucleaseの種々の変異体に応用して、アミノ酸残基の置換が熱安定性に及ぼす影響を明らかにする事を試みた。

Staphylococcal nucleaseは、変性実験が詳細に行われ、変性の熱力学的特性やCDスペクトルが詳細に研究されているタンパク質の一つであり、野生型の結晶構造は、x線結晶解析で既に明らかにされている。従って、申請者はコンピュータシミュレーションに最適のタンパクであると考えた。3つの変異体、A69T(Ala69→Thr)、G88V(Gly88→Val)、M32A(Met32→Ala)を選んで計算し、熱安定性の分子的な考察を、分子動力学／自由エネルギー摂動法より考察した。

結果、つぎのように結論している。水素結合性基や電荷の導入は水和自由エネルギーを有利にするため、変異体の変性状態を大きく安定化する。変異体の天然状態において、水素結合の導入は変異体の天然状態を大きく安定化できない。また、電荷の導

入は非常に遠くまで影響するため、イオン結合の導入が必ずしも安定化に働くとは限らない。結果として、水素結合やイオン結合の導入はタンパク質を効果的に安定化するとは期待できない。

疎水性側鎖による空隙の解消するような変異体への変換は、変異体の変性状態を大きく不安定化する。変異体の天然状態は、ファン・デル・ワールス相互作用により安定化する。これらの相乗作用により、タンパク質は安定化される。タンパク質の熱安定化に対して、変性状態の不安定化の寄与が大きい。しかし、置換によって、変異体の天然状態の構造が破壊されることは避けなければならない。

このように、申請者はコンピュータによる計算を行うことにより、タンパク質の熱安定性を論じ、興味ある結論を得ており、薬学博士を授与するに十分と認めた。