

蛋白質基本フォールドの熱力学的安定化機構の解明

●城所 俊一

長岡技術科学大学工学部

〈研究の目的と進め方〉

本研究では、計算機シミュレーションと熱力学的な実験とを用いて、基本フォールドの中で各モジュールが構造安定化に果たす役割を定量的に表現し、基本フォールドの熱力学的安定化機構を明らかにすることをめざすことを目的とした。

〈研究開始時の研究計画〉

本研究では、まず残基間の空間距離とペプチド鎖に沿ったアミノ酸配列上の距離の情報に基づいて、蛋白質の部分構造を分類する際の定量的な指標としてエントロピー尺度を考案・検討し、蛋白質の部分構造の安定化機構を明らかにすることをめざした。さらに、基本フォールドの熱力学的な安定化の機構を理解するための重要な物性量として、分子体積の精密測定法とその溶媒条件依存性などに注目し、高精度の熱測定と密度測定によりこれら进行评估する手法を確立することをめざした。

〈研究期間の成果〉

本研究で新たに開発したエントロピー尺度は、立体構造の類似度の高いものだけでなく、構造が大きく異なる立体構造間の定量的な比較においても有用であることが明確に示された。蛋白質立体構造データベースの全部分構造を調べた結果、100残基程度の部分構造の多くは1エントロピー単位(eu)内に入っていることがわかった。また、これらの構造からは大きく異なる立体構造も少数ではあるが存在する。これらの特異な構造は、モジュールのようなコンパクトな構造はもたずに他の部分構造との相互作用により安定化されていると考えられる。また、高精度の熱測定と密度測定により、溶液中での蛋白質の部分モル体積を希薄溶液で精度高く測定する手法を確立し、pHや温度変化、構造転移に伴う体積変化を測定する手法を確立することに成功した。

既に構造のわかっている蛋白質中に見られる部分構造の多くは、アミノ酸鎖が取り得る部分構造の中で、部分構造の中で十分な相互作用を行うことでコンパクトな構造をとっているものであり、このようにしてできる部分立体構造は、エントロピー尺度を利用して分類できる可能性が示された。分子体積の溶媒依存性を実測した結果から、立体構造の安定化の機構が分子体積と密接に関係することが示唆された。

〈国内外での成果の位置づけ〉

本研究で開発したような立体構造が大きくことなる分子を比較するための合理的な尺度はこの当時は存在しなかった。類似構造の比較のための尺度としては、他の尺度が普及しているが、実際には、構造の類似度が低くなった場合に区別がしにくくなるという問題が以前として残っている。今後、このような問題を解決するために、本研究の成果は重要となると期待される。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

本研究およびその後の研究により、蛋白質の分子体積自体は立体構造や安定性の良い指標ではないことが明らかになった。しかし、分子体積の温度依存性は、立体構造や水和に大きく依存することが明確となり、物性・機能との関連も注目され始めている。

〈今後の課題〉

立体構造と安定性の関係から、分子機能へと研究は発展しつつある。蛋白質とリガンドとの相互作用と水素・水和水との関係や、触媒機能との関係などに本研究の成果を発展させることが期待される。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

- 1) Nurul Karim, Hirofumi Okada, Shun-ichi Kidokoro, Calorimetric evaluation of the activity and the mechanism of cellulases for the hydrolysis of cello-oligosaccharides accompanied by the mutarotation reaction of the hydrolyzed products, *Thermochim. Acta*, 431, 9-20, 2005.
- 2) Shigeyoshi Nakamura, Shun-ichi Kidokoro, Direct observation of the enthalpy change accompanying the native to molten-globule transition of cytochrome c by using isothermal acid-titration calorimetry, *Biophys. Chem.*, 113, 161-168, 2005.
- 3) Shun-ichi Kidokoro, Statistical mechanical analysis of protein heat capacity accompanied with thermal transition, in *The Nature of Biological Systems as Revealed by Thermal Methods* (D. Lorinczy ed.), Kluwer Academic Pub., 333-341, 2004.
- 4) Nurul Karim, Shun-ichi Kidokoro, Precise and continuous observation of cellulose-catalyzed hydrolysis of cello-oligosaccharides using isothermal titration calorimetry, *Thermochim. Acta*, 412, 91-96, 2004.
- 5) Shigeyoshi Nakamura, Shun-ichi Kidokoro, Isothermal acid-titration calorimetry for evaluating the pH dependence of protein stability, *Biophys. Chem.*, 109, 229-249, 2004.
- 6) Said A. Ali, Noriyuki Iwabuchi, Takuro Matsui, Ken Hirota, Shun-ichi Kidokoro, Munehito Arai, Kunihiro Kuwajima, Peter Shuck, Fumio Arisaka, Reversible and fast association equilibria of a molecular chaperone, gp57A, of Bacteriophage T4, *Biophys. J.*, 85, 2606-2618, 2003.
- 7) Shun-ichi Kidokoro, Calorimetric evaluation of protease activity, *Netsu Sokutei*, 28, 74-82, 2001.
- 8) Takeo Usui, Sachiko Kojima, Shun-ichi Kidokoro, Kazunori Ueda, Hiroyuki Osada, Mikiko Sodeoka, Design and synthesis of a dimeric derivative of RK-682 with increased inhibitory activity against VHR, a dual-specificity ERK phosphatase: implications for the molecular mechanism of the inhibition, *Chem. Biol.*, 8, 1209-1220, 2001.