

論文提出者	工学府博士後期課程 生命工学 専攻 平成 18 年度入学 学籍番号 06831105 氏名 Mohammad Monirul Islam 印		
主指導教員氏名	黒田 裕	副指導教員氏名	朝倉 哲郎
論文題目	ウシ膵臓トリプシン阻害蛋白質変異体の構造及び熱力学解析 (Thermodynamic and Structural Analysis of Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor Variants)		
論文要旨 (2000 字程度)			
<p>1970 年頃に蛋白質が立体構造を形成するために必要な情報がすべてアミノ酸配列に記述されているというアンフィンゼンドグマが提唱されてから、その標記方式の研究が盛んに行われてきたが、その標記方式の解明は極めて困難であると判明している。また、酵素や蛋白質の熱安定性においても、その応用面の重要性を背景に多くの研究が行われているが、熱安定性を設計するための技術は未熟である。本論文は、全長 58 残基からなるウシ膵臓トリプシンインヒビター (BPTI) 変異体をモデル蛋白質に用いて、その熱力学的安定性と構造形成機構の研究について報告している。</p> <p>本論文は四章から構成されており、第一章「緒論」では、蛋白質の固有な構造を形成する機構及びその安定化の解明の必要性について述べていると共に、現在行われている蛋白質の安定化実験について説明している。また、アラニンスキャニング法と単純化法を用いて蛋白質の構造形成機構の研究を進めることの意義、及び各章の意義と目的について述べている。</p> <p>第二章では、X線結晶構造解析法を用いて、配列中の30%以上のアミノ酸がアラニンであるBPTI変異体 (以下、単純化BPTI) の分子構造を 1Åの高分解能で解き、大量のアラニンが主鎖構造へ及ぼす影響が極めて小さいことが初めて示された (主鎖構造のRMSD=0.5Å程度)。また、配列単純化によって蛋白質内部の側鎖構造が再配置されるかを調べている。単純化BPTIの側鎖で、蛋白質の内部 (露出表面積、ASAが 30%以下) に、もしくは部分的に埋もれている (ASAが 30%~50%) 側鎖の構造は、Q31、R20 と Y21 の 3 残基を除いて、野生型BPTIのものとはほぼ完全に一致していることが示された。以上のことから、単純化のため多くの残基をアラニンに置き換えたにもかかわらず</p>			

らず、蛋白質内部の側鎖構造はあまり再配置されず、極少数の残基で局所的に構造が変わることが明らかにされた。

第三章では、野生型の 3 本の SS 結合中 1 本のみを保存した BPTI 変異体 (BPTI[5, 55], BPTI[5, 55]-A14G, A38V, A14GA38V) の熱力学特性の解明を行った研究をまとめている。熱測定は示差走査型熱量計 (DSC) を用いて行ない、BPTI 変異体の変性中点温度 (T_m)、変性状態への熱容量変化 (ΔC_p)、エンタルピー変化 (ΔH)、エントロピー変化 (ΔS)、自由エネルギー変化 (ΔG) などの熱力学的パラメータを決定している。その結果、BPTI-[5, 55], -A14G, A38V, A14GA38V が天然蛋白質と同様に、可逆的に熱変性し、その変成過程は高い協同性を持つことが示された。また、A14G 置換によって BPTI 変異体はエンタルピーによって大きく安定化されていた。A14G 置換による構造への影響を調べたところ、安定化は、G14 と A38 の側鎖原子間に生じる立体障害を和らげることが構造安定化の原因であると考察されている。さらに、A14G 置換によって水分子と蛋白質の間の水素結合が増えていることと、14 番目と 38 番目の両残基付近のパッキングが局所的に最適化されていることも観測された。これらの結果は、蛋白質分子の安定性の向上 (及び低下) の構造的要因を考える上で重要な知見である。

第四章「結論」では、得られた成果を要約し、本研究の意義を述べている。本論文で述べた単純化蛋白質の構造解析、及び 1 残基変異による熱安定性向上の熱力学解析は、蛋白質の熱力学特性と構造形成に対して、きわめて重要な知見を与える。特に、機能発現に必要な蛋白質の固有な構造の形成に必須な情報を特定できることで、意図した立体構造 (機能) を有する酵素・蛋白質の設計を可能にすると期待される。また、アミノ酸側鎖が蛋白質の構造形成及び熱安定性に及ぼす影響の理解が深まったことで、酵素や蛋白質の安定化技術や天然に存在しない新規蛋白質の設計技術の開発基盤となることが期待される。