

蛋白質立体構造の安定性



油谷 克英*

Stability of Protein Conformation

Key Words : Protein stability, Calorimetry, Lysozyme, Amino acid substitution

1. 研究のゴール

蛋白質は、生体を支え維持するために最も重要な構成成分の一つである。その蛋白質は20種のアミノ酸がペプチド結合によってつながって(縮合されて)できている一本の分子鎖(ペプチド鎖)である。このペプチド鎖のアミノ酸の配列順序によって、特有な立体構造(図1)が形成される。この特有な立体構造が蛋白質の種々の機能発現(酵素の触媒作用とかホルモン作用など)に関わっている。20種のアミノ酸の

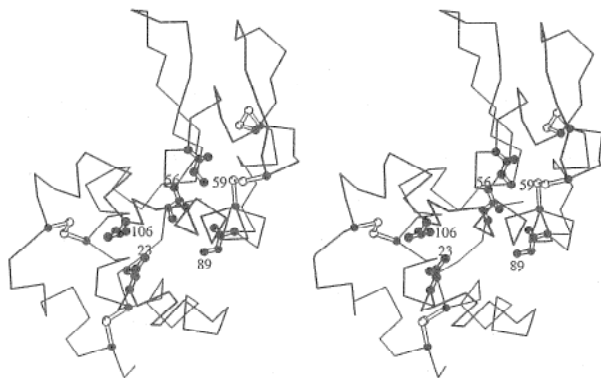


図1 リゾチームの立体構造(ステレオ図)。変異を起こさせたイソロイシンの部位を示す。

遺伝子(DNA)配列 → アミノ酸配列 → 立体構造(機能)
(第一の遺伝暗号解読) (第二の遺伝暗号解読)

図2 遺伝子(DNA)配列が蛋白質の立体構造(機能)を一義的に決定する。

並び方によって、種々の異なった機能が発現する。つまり、蛋白質の機能に関する情報はアミノ酸配列順序の中に含まれている。

昨今の分子生物学の進歩によって、遺伝子を自由に操作し、ある生物の特定蛋白質の遺伝子(または合成遺伝子)を他の生物、バクテリアや酵母の細胞内に組み込むことによって、その蛋白質を作らせることが出来るようになった。4種の遺伝子(DNA)が20種のアミノ酸にどのように対応しているかは、1960年代に遺伝コード(暗号)として完全に解明されている。これを「第一の遺伝暗号の解読」と呼べば、アミノ酸配列順序に含まれている蛋白質の立体構造と機能に関する情報の解読を「第二の遺伝暗号の解読」と呼ぶことが出来る(図2)。遺伝子の配列を自由に操作できる技術が確立した今日、「第二の遺伝暗号の解読」が解決できれば、必要とする好みの蛋白質を自由に生産することが出来ることを意味している。つまり、天然にある蛋白質の性質の改変(機能の高い、安定性の高いなど)に加え、これまでに天然にない性質を付加(プラスチックなどを分解する酵素)した新しい性質の蛋白質の生産が可能となる。応用面での効果は、工、農、医、薬の多岐にわたるばかりか、ライフサイエンスなどの

* Katsuhide YUTANI
1938年7月3日生
1961年大阪大学理学部生物学科卒業
現在、大阪大学蛋白質研究所、助教授、理学博士、蛋白質物理化学
TEL 06-879-8615
FAX 06-879-8616
E-Mail yutani@protein.osaka-u.ac.jp



基礎科学にも大きなインパクトを与える。ヒトゲノムをはじめ種々の生物種の遺伝子の塩基配列がすさまじい勢いで明らかにされてきている。30億対のヒトゲノム全てが10年余りでその配列が分かると言われている。膨大な遺伝子の配列情報を入手できるが、その遺伝情報のうち、ほんの僅かしか判読できていない。得られた遺伝子情報(蛋白質のアミノ酸配列)からそれがコードしている蛋白質の機能を判読することができれば、ライフサイエンスへの寄与は計り知れない。

それでは、どのようにして蛋白質の一次構造(アミノ酸配列)に含まれている立体構造(機能)に関する情報を解読するのか。この「解読」が我々の目指す研究のゴールであるが、種々の面からのアプローチがある。我々は、蛋白質を構成する個々のアミノ酸残基が蛋白質の立体構造の形成と安定化に果たす役割を熱力学的に研究することによって、この情報解読に寄与しようとしている。

2. 天然の蛋白質の立体構造は僅かのエネルギーで安定化されている

生理的条件下(生体内の環境)で維持されている蛋白質の立体構造は、極端な温度、pH、あるいは高濃度の変性剤(尿素、塩酸グアニジンなど)存在などの環境下におかれると、その固有の立体構造は破壊される。このような現象を変性と呼んでいる。蛋白質の変性とは、非共有結合のみが破壊され、共有結合が維持された状態を言う。この変性蛋白質は、一般に、温度を下げたり、変性剤濃度を希釈するなどして生理的条件下に戻すと、自発的に元の立体構造を再形成して、機能も回復する。つまり、蛋白質の変性は可逆的である。この可逆的性質は60年前に既に報告されている。1960年代に入ってS-S結合を持つ蛋白質の還元的変性も可逆的であることが証明された。蛋白質の変性が可逆的であることは、蛋白質の立体構造は、アミノ酸配列によって一義的に決められていること、つまり、蛋白質の立体構造形成の情報が一次構造の中に含まれていることの証明である。

蛋白質の変性が可逆的であるので、蛋白質は

生理的条件下(水中)で、天然(Native, N)状態と変性(Denatured, D)状態との間の平衡関係(1)式が成立すると仮定できる。その安定性の量的尺度である、変性のギブスエネルギー変化 $\Delta G(=G_d-G_n)$ は2式で表わされる。

$$N \rightleftharpoons D \quad (1)$$

$$\begin{aligned} \Delta G &= -RT \ln K \\ &= \Delta H - T\Delta S \end{aligned} \quad (2)$$

ここで、 $K(=[D]/[N])$ は(1)式の変性反応の平衡定数。エントロピー項 $\Delta S(=S_d-S_n)$ は、真空中では大きな正の値となる(D状態はN状態に比べはるかに多くのコンホメーションをとるため)が、水中では水和のエントロピーで相殺され、生理的条件下ではゼロに近い。また、 ΔH に寄与するのは多くの蛋白質内の非共有結合(ファンデルワールス相互作用、水素結合、疎水的相互作用など)がある。しかし、この頃も、水中では、水和の寄与と相殺されて、結局、僅かな値となる。結果的に、 ΔG の値は非常に低くなる。

球状蛋白質の生理的条件下(水中で中性pH, 25℃付近)での ΔG は5~15kcal/molの範囲内にはいることが知られている。蛋白質の立体構造はこのような僅かのエネルギーで保たれている。つまり、蛋白質の安定性は、僅少のエネルギーバランスによって保たれているので、Marginal Stabilityと呼ばれている。10kcal/mol程度のエネルギーは、非共有結合の相互作用による安定化エネルギーの数モル分に相当する。このことは、例えば、1本の水素結合の欠如によって、 ΔG が数十%も低下することを示唆している。実際置換部位を除いては立体構造の変化が見られない変異蛋白質の安定性が、一残基置換によって安定性が著しく変化した例は多くある。トリプトファン合成酵素 α サブユニットの分子内部にある49位Gluを一連のアミノ酸に置換した変異型のpH7, 25℃の ΔG を野生型と比較する(表1)と、最も安定な変異型(E49I)の値は野生型の1.9倍も高く、最も不安定な変異型(E49Q)は野生型の0.7倍に低下している^{1), 2)}。このように一残基置換によって蛋白質の安定性が著しく変化することは、蛋白質安定化機構の

表1 蛋白質の安定性は一残基置換で著しい影響を受ける具体例. 大腸菌トリプトファン合成酵素 α サブユニットの野生型と49位Gluを置換した18種の変異型の水中での変性のギブスエネルギー変化(ΔG)^{1), 2)}.

49位の 残基	ΔG (水中) [kcal/mol, 25℃]		49位の 残基	ΔG (水中) [kcal/mol, 25℃]	
	pH7.0	pH9.0		pH7.0	pH9.0
Gly	7.1	6.4	Lys	7.9	7.5
Ala	8.5	6.8	Asn	8.2	6.2
Val	12.0	9.4	Gln	6.3	8.5
Ile	16.8	10.0	Asp	8.5	7.0
Leu	15.0	12.2	Glu	8.8	4.9
Pro	8.2	6.9	Cys	11.0	8.3
Tyr	8.8	6.8	Met	13.3	8.4
Phe	11.2	8.3	Thr	8.8	7.0
Trp	9.9	5.7	Ser	7.4	8.0
His	10.1	9.2			

研究にとって、変異蛋白質の利用が大変有効であることを示している。

3. 安定性の定量

蛋白質の安定性の研究で最も基礎的な課題のひとつはその安定性(変性の熱力学的パラメーター)を精度高く定量することである。具体的方法を次に述べる。①塩酸グアニジン、尿素などの変性剤変性の変性曲線(蛋白質の変性の指標として、遠紫外部のCD値、芳香族残基の吸光度や蛍光強度、NMRのケミカルシフトなどの分光学的変化がよく用いられる)を解析し、各変性剤濃度中での変性反応の平衡定数(式1)から、変性剤濃度ゼロMに外挿した値を求め、それらから水中での変性のギブスエネルギー変化(ΔG)を算出する³⁾。②熱変性曲線(分光学的変化が変性の指標としてよく用いられる)のファント・ホッフプロットから変性温度での変性のエンタルピー変化(ΔH)を求める⁴⁾。③断熱型示差走査熱量計を用いて、直接的に変性の熱力学量を求める⁵⁾。①と②の方法では、水中での ΔG を得るためにいくつかの仮定を用いなければならない。しかし、③の熱量計による測定は、熱変性の可逆的な条件にあっては、変性温度、変性前後の比熱と変性にともなう比熱変化、変性温度での変性のエンタルピー変化が直

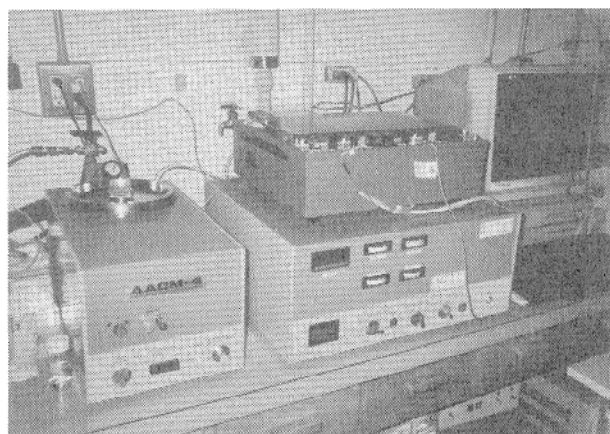


図3 旧ソ連性の示差走査熱量計(DASM4)。阪大蛋白質研に設置されている。非常に慎重な取り扱いのもとに現在も貴重なデータの測定に寄与している。

接的に求められるので、これらの値から変性のエンタルピー変化、変性のエントロピー変化、変性のギブスエネルギー変化の温度関数が算出できる⁵⁾。

熱量計(図3)による測定(熱測定)からは、最も信頼できる蛋白質変性の熱力学量を求めることができるが、①熱量計の電気系の問題(特にDASMの場合)、②測定が簡便でない(変性の可逆的条件の検索並びに感度ぎりぎりでの測定のため何度もの繰り返し測定のために長時間を必要とする)などの理由で最近まで普及が非常に遅れていた。Privalovらが、熱量計を改良し、蛋白質の熱変性の熱力学的パラメータを求めることが可能であることを、卵白リゾチームを用いて示したのは1974年であった⁴⁾。同時にその装置(DASM1)は市販されたが、旧ソ連製であり、電気系統がすぐ故障し、誰にでも簡単に使用できる状態ではなかったために普及を遅らせた。国内では電気系統をサポートする会社も現れたことと、旧ソ連製(DASM4)(図3)に相当するアメリカ製(MC2)の出現によって、熱量計は徐々に普及しつつある。4年ほど前に、Privalovがアメリカの大学に移り、新たな熱量計の改良に着手し、昨年(1995年)に新製品を発表した。しかし、蛋白質を取り扱っている生化学者が簡単に使用できるようになるには、最低10倍の感度(1/10の濃度での測定を可能にする)をあげる改善が必要である。現状の装置では、1回の測定で1-3mgの蛋白質量を必要とする。少しの改良があったとはいえ、

20年間も同じ装置を使用していることは、需要が少なかったことに原因している。つまり、変性の熱力学量を高い精度で測定することの重要性が広く理解されなかったことが、機器の改良と普及を遅らせている。最近では、その重要性が認められつつあり、装置改良の努力もおこなわれている。

このような事情により、一般には簡単な分光的方法が好んで使われている。例えば、野生型の ΔH が求められていれば、分光学的手法から野生型と変異型の変性温度の差を求めると、変性温度での ΔG の変化量($\Delta\Delta G = \Delta T(\Delta H/T_d)$)が推定できることから、このようにして得た値から安定化の機構を議論している論文がよくみられる。変異型を作製した場合、 ΔH に変化が生じるかどうかを調べるのが課題であり、それが同じであると仮定して ΔG を求めても、変性温度の差異以上の情報を得たことにはならない。また、変性剤変性実験から得られる水中での変性の ΔG は、高濃度の変性剤中でのデータからなんらかの仮定を経て算出されているので、これらは単なる推定値に過ぎない。そのため、いくつかの困難はあるが、真の蛋白質の変性の熱力学量を得るためには、断熱型示差走査熱量計によって慎重に測定するしか道はない。

4. 蛋白質の安定化に寄与する因子

天然のタンパク質はそのN状態を安定化する因子、不安定化する因子、また、D状態を安定化する因子、不安定化する因子のバランスの総和が僅かにN状態を安定化しているに過ぎない。それらの安定化因子はN状態とD状態の両方に影響する。そのため、N状態への安定化因子がD状態にどのように寄与するかを見きわめないと、生理的条件下でタンパク質を安定化させているかどうか分からない。それらの因子が結果的にどのように寄与しているかは立体構造上またはアミノ酸配列上の周辺残基との関連でできる。これらのミクロな環境が互いに相互作用して、N状態の構造は保たれている。

主な安定化因子について述べる。①疎水性相互作用。蛋白質を構成するアミノ酸残基の中で、非極性の疎水性残基はかなりの割合を占める。

水中ではこれらの疎水性側鎖が水との接触を避けて互いに蛋白質分子内部に凝集する。これらの疎水性相互作用が蛋白質分子の立体構造安定化の重要な因子である。②水素結合。蛋白質の二次構造(ヘリックスや β 構造)は、ポリペプチド主鎖のC=OとN-Hとの間の規則的な水素結合によって形成されている。この他に、主鎖と側鎖、側鎖と側鎖、それらと水分子との間に水素結合が形状されている。X線結晶解析結果によると、蛋白質内部では水素結合を作り得る官能基はすべて水素結合を作っている。しかし、これらの水素結合がすべて蛋白質の安定化に寄与しているとは一般に考えられていない。それは、蛋白質が変性し立体構造が壊れると、これまで形成していたほとんどの水素結合も破壊されるが、水素結合を作っていた基は溶媒に露出され新たに水との水素結合を形成し、水素結合数の出入りはほとんど変わらないからである。この説のように多くある水素結合が蛋白質の安定化にとって重要でないとすれば、水素結合の役割は何であるのか疑問が生じる。しかし、変異型蛋白質を用いて、水素結合が蛋白質の安定化に重要な役割を果たしているといういくつかの例が報告されている。③構造エントロピー。D状態のエントロピーを下げ、D状態をより不安定にすることによって蛋白質の安定性を向上させようとする戦略は、理論的にも明快で、実験的にも取り組み易いためにいろいろな試みがなされている。SS結合を新たに導入すると、D状態の自由度が減少するため、D状態でのペプチド鎖のエントロピーの減少による蛋白質の安定化(ΔG の増大)が期待される。しかし、SS結合増設変異型の熱安定性の向上が理論通りにエントロピーの減少によっているのかどうかは、熱測定によって確かめることが可能であるがまだそのような研究は行われていない。ヒト・リゾチームの4本あるSS結合のうち1本のSS結合を欠いた変異型は理屈通りに熱安定性を低下(ΔG の低下)させたが、 ΔG の低下は、エントロピーの増大によるのではなく、主にエンタルピーの減少によっていることが熱測定によって明らかにされている⁶⁾。このエンタルピーの減少は、N状態での置換部位周辺残基の運動性

の増加によると説明されている⁶⁾。

5. 安定性改善の実用化への道

蛋白質の安定性の改変は、蛋白質を利用する応用分野からの期待が大きいが、安定化の原理が少し分かってきたというのが現状で、容易には期待通りに成功しない。蛋白質は、差し引き少しのエネルギーで安定化されているだけなので、蛋白質の安定化因子を少し付加するだけで、原理的には大きく安定化されるはずである。蛋白質の安定性を高めるルールとしては、①分子内部の疎水性相互作用の強化、②水素結合、塩結合の導入、③2次構造(α ヘリックス、 β 構造)の強化、④金属イオン(Caイオンなど)の導入、⑤変性状態のエントロピーの減少(SS結合、Pro置換)、⑥不安定化因子の除去、などがあげられる。これらの安定化因子の導入が、新たな不安定化要因となることもある。どのような構造上の特徴を備えていれば安定化因子が不安定化要因とならないで実質的に蛋白質を安定化させられるのかを明らかにする必要がある。

6. 現状の問題点

最後に、最近の私どものデータを提出して現状の問題点と到達点について検討したい。ヒト・リゾチームはアミノ酸残基数130からなる比較的小さい酵素蛋白質である。この蛋白質は次の特徴をもっている。①アミノ酸置換蛋白質の作製法が確立されている。②熱変性の可逆的条件が確立されており、熱測定に最適である。③変異型の結晶が容易にでき、変異型のX線結晶構造解析が可能である。私達はこの蛋白質の系統的でかつ網羅的な変異型を作製し、各変異型について熱測定によって変性の熱力学的パラメータ

を求めると共に変異による構造変化をX線結晶解析によって明らかにしている。これらの結果から、蛋白質の個々のアミノ酸残基がタンパク質の立体構造の安定化に果たす役割を明らかにできる。表2はヒト・リゾチームに5個あるイソロイシンをメチル基を一つ欠いたバリンに置換した5種のタンパク質の変性の熱力学的パラメータを示差走査熱量計(DASM4)で求めたものである⁷⁾。図1のステレオ図から5種のイソロイシンがいずれも分子内部に埋もれていることが分かるが、分子内部に埋もれている割合は94-99%である。表2は5種のイソロイシンはいずれもほとんど完全に分子内部に埋もれているが、置換部位によって安定化への寄与の程度が異なることを示している。変性温度にして、 -1.1 から -3.6 ℃の範囲で変化している。I56V(56位のイソロイシンがバリンに置換した変異型)とI59V変異型の変性温度は類似しているが、変性の ΔH には大幅な差が見られた。このことは同程度の安定性の低下をきたす変異型でも変性のメカニズムが異なることを示唆している。それぞれの変異型のX線結晶解析で得た構造変化との関連で、どのような構造変化の差異が安定性に寄与したかを詳細に検討してみると、置換の影響が僅かずつ分子全体に及んでおり、その僅かずつの変化のトータルが安定性に影響していることが判明した⁷⁾。

この研究が特徴的に表しているように、アミノ酸置換による安定性の変化は、同じアミノ酸残基であっても置換部位によって大幅に異なるので、置換部位の構造の特徴をどのように記述するかが最も重要な課題となっている。これまでに報告されているような置換部位の特徴表示では、不十分であることが明らかとなってきた。

表2 ヒト・リゾチーム変異型(Ile→Val)の変性の熱力学的パラメータ。pH2.7で野生型の変性温度(64.9%)での比較。

Protein	T_d (℃)	ΔT_d (℃)	ΔC_p^0 (kJ/mol K)	ΔH_{cal} (kJ/mol)	$\Delta \Delta G$ (kJ/mol)	$\Delta H_{cal}/\Delta H_{vH}$
Wild-type	64.9 ± 0.5		6.6 ± 0.5	477 ± 4	(0)	0.95
123V	63.8 ± 0.4	-1.1	5.8 ± 1.8	468 ± 11	-1.5 ± 0.4	0.93
156V	61.3 ± 0.3	-3.6	5.6 ± 1.7	475 ± 13	-5.0 ± 0.4	0.97
159V	61.5 ± 0.4	-3.4	5.0 ± 1.0	461 ± 7	-4.6 ± 0.4	0.94
189V	63.5 ± 0.6	-1.4	8.0 ± 0.3	484 ± 3	-2.0 ± 0.8	0.95
I106V	62.7 ± 0.3	-2.2	5.9 ± 0.7	457 ± 10	-3.0 ± 0.4	0.96

そのためには、系統的でかつ網羅的にアミノ酸置換体を作製し、それぞれの変異型の安定性を精度高く定量し、併せて置換に伴う構造変化(できればN, Dの両状態とも)を解析する必要がある。今後、これらの多くの基礎データの蓄積を基にして立体構造上の特性と安定性を結びつける経験則の確立を急がなければならない。

7. ま と め

最初に述べたこの研究のゴールとの関連で言えば、蛋白質の安定性に関して解明すべきことは、蛋白質を構成している(特徴的な構造上の部位で)個々の残基が蛋白質分子の安定化にどのようなメカニズムでどの程度(定量的に)寄与しているかを明らかにすることである。それは、構造上の特徴を詳細に記述し、それに対応する20種のアミノ酸残基の評価関数(安定化度)を示すことである。タンパク質のような複雑な系では、このようなことは無理なように思えたが、最近、蛋白質の基本構造(折れたたみの種類)は1000種以下であることが分かってきた⁸⁾。それぞれの基本構造は、固有の α ヘリックス、 β 構造、ターン部分、分子表面、分子内部など構造要素の各種の組合せからなる特徴を持っている。これらの基本構造との関連で、可能な限り精度の高い評価関数を作る努力をしたい。これらは、アミノ酸配列に基づいて、どのような立体構造をとるのか、その立体構造のどの特性が機能発現のキーとなっているのか、と

いう第二の遺伝子暗号解読につながる基礎的知見を提供するものである。

文 献

- 1) Yutani, K., Ogasahara, K., Sugino, Y., & Matsushiro, A. (1977) *Nature* 267, 274-275.
- 2) Yutani, K., Ogasahara, K., Tsujita, T., Sugino, Y., (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 4441-4444.
- 3) Pace, N. C., (1986) *Methods Enzymol.*, 131, 266-280.
- 4) Brandts, J. F. (1964) *J. Am. Chem. Soc.* 86, 4291-4230.
- 5) Privalov, P. L. and Khechinashvili, N. N., *J. Mol. Biol.* (1974) 86, 665-684.
- 6) Kuroki, R., Inaka, K., Taniyama, Y., Kidokoro, S., Matsushima, M., Kikuchi, M., and Yutani, K. (1992) *Biochemistry* 31, 8323-8328.
- 7) Takano, K., Ogasahara, K., Kaneda, H., Yamagata, Y., Fujii, S., Kanaya, E., Kikuchi, M., Oobatake, M., & Yutani, K. (1995) *Mol. Biol.* 254, 62-76.
- 8) Chothia, C. (1992) *Nature* 357, 543-544.

