

蛋白質の安定性とそこに秘めるもの



研究ノート

高野 和 文*

Protein Stability and the Potentials

Key Words : Protein Stability, Amino Acid Sequence, Three Dimensional Structure, Denaturation, Thermodynamics

1. はじめに

ヒトゲノムが解読された今日、生命活動の全般を担う蛋白質の機能解析や構造解析などのプロテオミクス研究が盛んに進められている。蛋白質はそのアミノ酸配列に基づき固有の立体構造を形成し、機能を発揮する。しかし立体構造を形成することができるアミノ酸配列はごく一部に限られており、アミノ酸配列から立体構造を予測することやアミノ酸配列情報で蛋白質をデザインすることも、現在のところ可能になっていない。蛋白質の立体構造は、熱力学的に僅かなエネルギーバランスの基に形成されている。この精巧な蛋白質の構造構築機構に魅せられて10余年、おもに熱力学的安定性の観点からこの問題に取り組んできた。本稿では、蛋白質の安定性研究から見た蛋白質の構造構築機構とその意義について紹介する。

2. 蛋白質の熱力学的安定性

蛋白質は高温、極端なpHなどの厳しい条件下では、その立体構造は変化し崩壊する。その結果、蛋白質はその機能を失う。この立体構造の崩壊では、疎水性相互作用や水素結合などの非共有結合は破壊されるが、共有結合は維持されている。この現象を

「変性」とよぶ。蛋白質の変性には、熱変性、酸・アルカリ変性、変性剤変性、低温変性、圧力変性などが知られている。変性した蛋白質を再び生理的条件下に戻すと、自発的に元の構造に巻き戻り、機能も回復する。

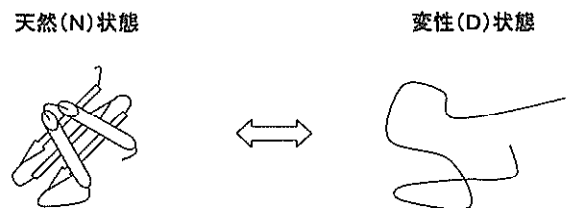


図1 蛋白質の天然(N)状態と変性(D)状態

理想的条件下では、蛋白質の変性は可逆的であるため(図1)、天然状態(N)と変性状態(D)の関係は式(1)で表され、安定性の熱力学的な量的尺度である変性のギブスエネルギー変化(ΔG)も式(2)(3)で求められる。

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

$$K = [D]/[N] \quad (2)$$

$$\Delta G = -RT \ln K \quad (3)$$

ここで、[D]と[N]はそれぞれの状態の濃度、Rは気体定数、Tは絶対温度である。 ΔG が0の時は、天然構造と変性構造が等量存在する状態で、変性の中点となる。生理的条件下における蛋白質の安定性(ΔG)は、一般的には10kcal/mol程度である。このことは、天然構造を形成する 10^8 個の分子に対し、1個の分子が変性構造を形成していることを表しており、生理的条件下と言っても、蛋白質のごく一部の分子が変性構造を形成している平衡状態であることを意味する¹⁾。このように、蛋白質の安定性は熱



* Kazufumi TAKANO
1970年4月生
1998年大阪大学・大学院理学研究科・高分子学専攻修了
現在、大阪大学・大学院工学研究科・生命先端工学専攻、助教授、博士(理学)、蛋白質物理化学
TEL 06-6879-4157
FAX 06-6879-4157
E-Mail ktakano@mls.eng.osaka-u.ac.jp

力学的に取り扱うことが可能で、生体分子ではあるが物理化学的な理解が進んでいる。ここでは、その測定方法に関しては省略する。

3. 蛋白質の安定化因子

蛋白質の安定性を高める主な因子として、①分子内部の疎水性相互作用、②分子内の水素結合・イオン結合、③二次構造(α ヘリックス、 β 構造)傾向性、④金属イオンなどの結合や水和水、⑤ジスルフィド結合などによる変性状態のエントロピーの減少などが挙げられる。これらは様々な測定により検証されてきたが、最も広く行われているのは、系統的な変異蛋白質を用いた解析である²⁾。さらに、変異蛋白質の構造解析も行いことで、変異による安定性変化量と構造変化量から個々の安定化因子の寄与も算出されている³⁾。こうして得られた成果は、蛋白質の安定性の理解にとどまらず、アミノ酸配列情報からその立体構造を予測する際の評価関数として有用となる⁴⁾。これは、日々解読される膨大な量の遺伝情報から蛋白質の構造・機能に関する知見を得る有力な手がかりとなる。

4. 安定化と好熱菌由来の安定な蛋白質

蛋白質の安定性の理解が進むにつれ、産業的な立場から、不安定な有用酵素(蛋白質)をアミノ酸変異により安定化させる試みが行われている。しかしながら、幾つかの成功例はあるものの、アミノ酸変異による構造変化を予測できない現状において、変異による予想外の構造の変化に対応できず、安定化の取組みはあまり進展していない。このような状況の中、火山の火口や温泉などの高温環境下に生息する微生物—好熱菌が次々に発見され、好熱菌が産する安定な蛋白質の利用が可能となっている。したがって、安定化の需要はますます減ってきている。現在応用面で必要とされているのは、温度やpHなどの溶媒環境の変化により、自在に酵素を失活(蛋白質を変性)および再生させる安定性制御の技術であろう。

また、蛋白質の安定性の理解が進んだといっても、好熱菌由来の蛋白質がなぜ安定なのかは明らかになっていない。統計的な観点からイオン結合の増加などが提唱されているが、それだけではないようである。最近、一部の好熱菌蛋白質において、式(1)~(3)で

示す平衡論的な安定性に加え、速度論的な安定性も高くなっていることがわかってきた⁵⁾。このように、問題は少し複雑な様相となっているが、これまで安定性が高いが故に実験が困難であった好熱菌蛋白質の安定化機構も、取り扱いやすいモデル蛋白質の出現により今後一気に解明されると考えられる。

5. 外的因子と構造変化

細胞内は様々な物質が濃厚に存在している。およそ1g/mlに相当するとも言われている。これは試験管内実験での蛋白質濃度と遙かに異なっている。したがって、他の様々な分子との相互作用や物理的効果が蛋白質安定性に影響を及ぼしている。例えば、スクロースなどの糖、アミノ酸やその誘導体などの低分子化合物、ポリエチレングリコールなどの高分子化合物などの水溶性物質が蛋白質の安定化剤として知られている。低分子化合物による安定化は、変性状態の水和効果によると考えられ、Osmolyte Effectと呼ばれている。また、高分子による安定化は、排除体積効果・エントロピー効果により、Macromolecular Crowding Effectと呼ばれている。これらの溶媒効果は、生体外における蛋白質を安定化させるのに簡便な手法で、製薬分野などのProtein Formulationにおいて応用展開されている。

最近、アミロイドやアルツハイマー病、プリオン病をはじめとする多くの病気で見られる蛋白質の凝集体であるアミロイド線維が、本来機能的な立体構造を形成している蛋白質が主に規則的な β 構造に変化して形成されていることが明らかとなってきた。つまり蛋白質は特異な天然構造の形成に加え、それ

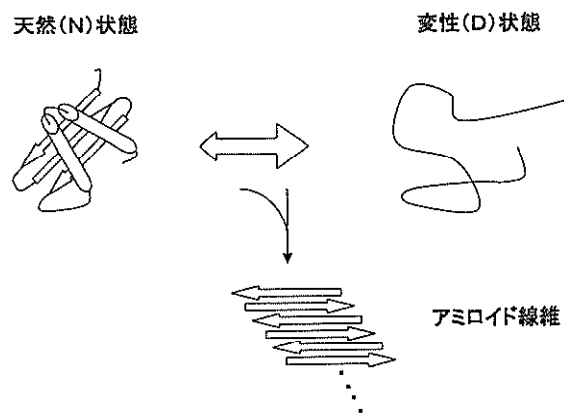


図2 アミロイド線維形成

が変化した共通の構造状態も形成することを意味する。様々な蛋白質についてのこれまでの研究から、環境の変化(pH, 温度, 濃度など)やアミノ酸変異などの要因による天然状態の不安定化などが原因と考えられている(図2)⁶⁾。このように、蛋白質の安定性は今日問題となっている病気の発症とも深く関わっている。

6. おわりに

蛋白質の安定性研究は、今日の構造・機能解析の華やかさに比べ、地味な感は否めない。しかし、多種多様な蛋白質において、構造・機能は各論に過ぎず、安定性をはじめとする物性はその基盤をなす。日常蛋白質を取り扱う研究者においても、安定性の基礎を理解しておれば、不安定な蛋白質の対処にも大いに役立つ。あまり大きな声で言えないが、構造・機能解析に研究が集中する今日、物性研究に宝の発掘のチャンスが高まっている。もちろん、そのための労力は十分に必要である。

参考文献

- 1) 高野和文：タンパク質の安定性とフォールディング, ゲノミクス・プロテオミクスの新展開 (エヌ・ティー・エス), 701-705(2004).
- 2) K. Takano, J. M. Scholtz, J. C. Sacchettini & C. N. Pace : J. Biol. Chem. 278, 31790-31795(2003).
- 3) K. Takano, Y. Yamagata & K. Yutani : Biochemistry 40, 4853-4858(2001).
- 4) K. Takano & K. Yutani : Protein Eng. 14, 525-528(2001).
- 5) A. Mukaiyama, K. Takano, M. Haruki, M. Morikawa & S. Kanaya : Biochemistry 43, 13859-13866(2004).
- 6) S. Ohnishi & K. Takano : Cell. Mol. Life Sci. 61, 511-524(2004).

