



Title	Structural Significance of Intramolecular Interaction Network in Protein Structure [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	今野, 翔平
Citation	北海道大学. 博士(理学) 甲第13671号
Issue Date	2019-03-25
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/74151
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	theses (doctoral - abstract and summary of review)
Additional Information	There are other files related to this item in HUSCAP. Check the above URL.
File Information	Shohei_Konno_abstract.pdf (論文内容の要旨)



[Instructions for use](#)

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (理学)

氏名 今野 翔平

学位論文題名

Structural Significance of Intramolecular Interaction Network in Protein Structure (分子内相互作用ネットワークのタンパク質構造における構造的意義)

第一章では本学位論文の背景として、タンパク質立体構造における分子内相互作用のネットワークの意義について述べる。タンパク質はアミノ酸残基が直鎖状に結合した分子であり、アミノ酸配列に基づく固有の立体構造へ折りたたみ、機能を発現する。タンパク質の立体構造は、水溶液中において立体構造を安定化する相互作用の総和が不安定化に働く作用の総和をわずかに上回ることによって構造が維持され、少数の相互作用が失われることで、立体構造全体が不安定化することが知られている。このような立体構造の安定性は、種々の相互作用が分子内に張り巡らされた分子内相互作用ネットワークの結果として生じると想定されているが、具体的にどのような相互作用のどのようなネットワークによって、どのような構造的特徴を有するタンパク質構造が形成されるのか、その詳細は明らかではない。そこで本学位論文では、これまでタンパク質構造を維持するために重要な寄与を果たしていると考えられているものの、その構造安定化への熱力学的寄与が明らかではないタンパク質内の疎水性相互作用について、その形成に伴う脱水和に注目して追跡することで定量的に議論することを試みる。さらに、疎水性相互作用のような分子内相互作用がネットワークとしてタンパク質の立体構造構築の上でどのような意義を有するのか検討するため、タンパク質内相互作用の粗視化モデルとして、タンパク質内部に存在する種々の分子内相互作用を数学的なネットワーク理論に組み込み、タンパク質構造を分子内相互作用ネットワークとして解析することで、そのネットワークとしての特徴とタンパク質構造との相関を評価できるモデルの構築を試みた。

第二章では、疎水性相互作用の形成に伴う脱水和を実験的に観測し、そのエントロピー的効果を定量的に見積もることに成功した。疎水性相互作用によりタンパク質は、その疎水基の溶媒への露出を最小化するが、その際、ペプチド鎖の折りたたみに伴う疎水基の接触により、水分子が溶媒中へ放出される脱水和を伴う。そこで、タンパク質の折りたたみに伴う脱水和量を実験的に算出することができれば、疎水性相互作用によるタンパク質の立体構造への安定性の寄与を求めることができると考え、水和によってタンパク質の部分モル体積が変化することに注目して、折りたたみ前後の部分モル体積変化から脱水和量を見積もった。折りたたみに伴う部分モル体積変化は、折りたたみの平衡定数の圧力依存性から算出可能であることから、紫外可視吸収測定により変性反応の平衡定数を算出可能なシトクロム c について、二種類の変性剤、尿素とグアニジン塩酸塩(GdnHCl)、をそれぞれ添加して種々の圧力下で紫外可視吸収測定を行い、シトクロム c の変性反応に伴う部分モル体積変化(ΔV_u)を算出した。その結果、正の ΔV_u が得られ(尿素変性: $56 \pm 5 \text{ mL mol}^{-1}$, GdnHCl 変性: $29 \pm 1 \text{ mL mol}^{-1}$)、これまで報告されている他のタンパク質では ΔV_u が負の値であることと対照的であった。この原因として、親水基への水和は負の体積変化を伴うのに対し、疎水基への水和は正の体積変化を伴うこと、さらにシトクロム c は疎水性の

高いヘムを補欠分子族として有することを考慮すると、シトクロム *c* の正の体積変化は、疎水性のヘムへの水和の寄与と考えられる。このことは、構成するアミノ酸残基の疎水性度の平均がシトクロム *c* に近く、補欠分子族をもたない staphylococcal nuclease A (SNase A) では ΔV_u が負であることから支持された。さらにシトクロム *c* の折りたたみに伴ってヘムからの脱水和する水分子の個数を見積もり、そのエントロピー的寄与を算出すると -50 kJ mol^{-1} となり、一方、シトクロム *c* の立体構造形成のギブズエネルギー変化は -37 kJ mol^{-1} であることから、このようなヘムからの脱水和は立体構造形成に重要であると考えられる。さらに GdnHCl と尿素を用いた場合で ΔV_u が異なることは、これら2つの変性剤による変性状態の水和状態が異なっていることを意味しており、GdnHCl 変性ではグアニジウムイオンが疎水基と相互作用して変性状態の疎水基に水和する水分子数を減少させ、一方、尿素は比較的弱い変性剤であるため、変性状態においても部分的に溶媒に露出していない構造が残存すると考えられる。このような部位を水和させるために変性状態のヘムの軸配位子である His26 を Gln に置換した変異体を作成し、同様に体積変化を求めたところ、尿素変性における ΔV_u は減少 ($4 \pm 2 \text{ mL mol}^{-1}$) し、野生型の尿素変性において残存していた構造は親水基を含むと考えられた。以上より、疎水性相互作用形成に伴う脱水和を追跡することで、疎水性相互作用のタンパク質立体構造におけるエントロピー的寄与を定量的に議論するとともに、変性剤によってその変性状態の水和状態が異なることも見出した。

第三章では、タンパク質を構成する分子内相互作用を数学におけるネットワークとして捉え、そのネットワークの特徴とタンパク質立体構造との相関を明らかにすることを試みた。第二章ではタンパク質構造における疎水性相互作用の重要性を明らかにできたが、従来のネットワーク理論を用いた研究ではタンパク質の立体構造を表現するネットワークとして、 $C\alpha$ 炭素間距離が閾値 8.5 \AA 以下の場合に結合があるとみなす $C\alpha$ ネットワーク (CAN) や、水素原子を除く二つの残基間を構成する原子の最接近距離が閾値 5.0 \AA 以下の場合に結合があるとみなす原子間距離ネットワーク (ADN) が広く使われ、相互作用やアミノ酸残基側鎖の情報を欠落させたまま解析するしかなかった。その結果、これらのネットワークモデルは α ヘリックスと β シートの構造をネットワークの構造から識別できず、タンパク質立体構造解析の点で大きな問題を抱えていた。そこで、本研究では、相互作用の種類ごとに関係する原子間の距離を調べて残基間の結合の有無を判定する結合選択ネットワーク (ISN) を作成した。その結果、タンパク質の結晶構造を元にした ISN では、ネットワーク理論における二種類の特徴量、平均次数と平均クラスター係数の分布から α ヘリックスと β シートの構造を識別することに成功し、さらにこの ISN は、結合の有無を判別する原子間距離の閾値の範囲を広くとっても α ヘリックスと β シートの構造を識別可能であり、モデルとしての頑強性が高いと考えられる。CAN においても閾値 5.5 \AA では、同様に α ヘリックスと β シートの構造を識別可能であるものの、閾値のわずかな変化によりネットワークの形状が大きく変化することから頑強性が低く、モデルとしての安定性に欠けると考えられる。このような差異は、CAN はその閾値の小ささから $C\alpha$ 原子に近接する主鎖周辺の相互作用のみを反映しているのに対し、ISN は主鎖と側鎖両方の相互作用を反映しているためと考えられる。このため、CAN は主鎖の水素結合に基づく二次構造のみの反映しているのに対し、ISN は二次構造だけではなく側鎖が形成する三次構造の情報を反映していると考えられる。

第四章では、本学位論文において明らかになった点や今後の展望をまとめた。第二章では疎水性相互作用の形成に伴う脱水和によるエントロピー的寄与が立体構造の安定化に大きな寄与をもたらすことを明らかにした。第三章では、第二章でタンパク質の立体構造形成における重要性が示唆された疎水性相互作用を考慮することのできる粗視化ネットワークモデルとして ISN を構築した。今後は、アミノ酸変異による種々のタンパク質内相互作用の変化とネットワークとしての分子内相互作用変化の両者を、実験、理論両面で比較することにより、タンパク質構造における分子間相互作用ネットワークの構造的意義を定量的に評価するモデルが構築でき、タンパク質の立体構造構築原理の一端を明らかにすることが期待される。