

学位（博士）論文要旨 (Doctoral thesis abstract)

論文提出者 (Ph. D. candidate)	工学府 博士後期課程 生命工学 専攻 平成 28 年度入学 学籍番号 16831701 氏名 早乙女友規 SAOTOME Tomoki
主指導教員氏名 (Name of supervisor)	黒田 裕 KURODA Yutaka
論文題目 (Title)	球状蛋白質の熱変性における高温での可逆的なオリゴマー形成の物理化学的解析
<p>本博士論文は 4 章で構成される。第 1 章では、小型球状蛋白質の平衡論的な解析に関する背景および先行研究について紹介した。小型球状蛋白質の熱変性過程は可逆性と協同性が非常に高く、非常にシンプルな 2 状態モデル ($N \leftrightarrow D$) で説明できると考えられてきた。その一方で、高温での可逆的なオリゴマー (RO; Reversible Oligomer) の形成・解離を伴う場合、小型球状蛋白質の熱変性過程は複雑になるため、2 状態モデルでは説明できないことが明らかになった。熱変性した蛋白質は不可逆的に熱凝集することが多いため、高温での RO 形成は非常に珍しく、高温での蛋白質の振る舞いを理解するうえで重要な現象と考えられる。その一方で、高温での RO の物性・構造・形成メカニズムに関する知見は乏しい。そこで本研究では、小型球状蛋白質としてはユニークな熱変性過程を解析し、高温での RO の物理化学的性質に関する情報の補完を目的とした。</p> <p>第 2 章では、高温条件下における 4 型 Dengue virus 由来エンベロップ蛋白質第 3 ドメイン (DEN4 ED3) の RO 形成と一残基置換による阻害について紹介した。DEN4 ED3 の熱変性過程では高温での RO 形成および解離が観測され、その熱転移は三状態モデル ($4N \leftrightarrow I_4 \leftrightarrow 4D$) で表された。DSC 測定で観測された二本の吸熱ピークの pH 依存性から、中性 pH で RO の熱安定性は大きく向上するものと推測される。また CD 測定では 2 状態の構造転移が観測され、RO では二次構造が失われている。さらに Val 380 を疎水性の低いアミノ酸 (Ala, Ser, Thr, Asn, Lys) に置換したことで RO 形成が阻害され、その熱転移モデルは $N \leftrightarrow D$ で表された。5 種類の変異体で同様の傾向が見られたため、DEN4 ED3 の高温での RO 形成には Val 380 を介した疎水性相互作用が関係すると推測される。</p> <p>第 3 章では、酸性条件下におけるウマ心臓由来 cytochrome c の MG 状態と高温での RO 形成の熱力学的解析について紹介した。MG 状態は天然状態と変性状態の中間的な性質を有するため、蛋白質のフォールディング中間体として構造・物性の解析が進められてきた。最近の研究では、酸性・高塩濃度の条件下で形成された cytochrome c の MG 状態が N 状態へ構造転移したとき、ドメインスワッピングによって N 状態でダイマーが形成されると分かった。ゆえに MG 状態の cytochrome c の構造転移において、オリゴマーの形成が構造安定化につながったと推測される。そこで MG 状態の cytochrome c の熱変性過程を解析したところ、熱変性過程で高温での RO 形成が観測され、その熱転移は 6 状態モデル ($MG1 \leftrightarrow MG2 \leftrightarrow D \leftrightarrow I_2 \leftrightarrow I_3 \leftrightarrow I_4$) で表された。また PPC 測定で ΔV を算出した結果、高温で RO を形成</p>	

したときに MG 状態よりも分子体積が減少すると分かった。よって高温での RO 形成では、複数の分子が密集してよりコンパクトな構造をとると推測される。

第 4 章では、本研究の結論を述べた。DEN4 ED3 と cytochrome c のユニークな熱変性過程を解析した結果、いずれの場合も高温での RO 形成が観測され、小型球状蛋白質としては複雑な熱変性過程の原因であると判明した。さらに高温での RO 形成に関して、DEN4 ED3 の場合は Val380 を介した疎水性相互作用が駆動力になると考えられる。また cytochrome c の場合は、MG 状態と比較して I₄ 状態の方が分子表面の水和量は減少しており、高温で RO を形成した方がコンパクトな立体構造を有するという興味深い結果が得られた。その一方で、cytochrome c の熱変性過程では高温での RO の解離が見られなかった。よって蛋白質の等電点と溶液の pH が近く、塩濃度が十分に低いなど、分子間の静電的相互作用が弱まった条件下でのみ高温での RO の解離が起こると推測される。

This thesis is composed of four chapters. Chapter 1 is a summary of previous researches on thermodynamic analysis of small globular proteins. In general, small globular proteins showed cooperative and reversible unfolding, and it can be explained by using two-state model (N-D). On the contrary, when the association and dissociation of reversible oligomer (RO) occurred at thermal denaturation of small globular proteins, its thermal denaturation process cannot be analyzed by two-state model. Because thermally denatured proteins are often led to irreversible aggregation at high temperature, the association of RO at high temperature is considered to be very unique phenomenon, and an important phenomenon in understanding the behavior of denatured proteins at high temperatures. However, the physical properties and mechanism of RO have not been clarified because there were few precedents. In this doctoral thesis, the unique thermal denaturation processes of small globular proteins were analyzed, and aimed to supplement information on the physicochemical properties of RO at high temperatures.

In chapter 2, RO formation and inhibition by single mutation of Val380 on dengue 4 envelope protein domain 3 (DEN4 ED3) at high temperature were introduced. Even though DEN4 ED3 is a small globular protein, its thermal denaturation process was complicated due to RO formation and dissociation at high temperature ($4N \leftrightarrow I_4 \leftrightarrow 4D$). Furthermore, substitutions of Val 380 with a less hydrophobic amino acid (Ala, Ser, Thr, Asn, Lys) were significantly affected to inhibit RO formation at high temperature, and its thermal transition model was represented by two-state model (N-D). These results implied that RO formation of DEN4 ED3 at high temperature is derived from hydrophobic interaction via Val 380.

In chapter 3, thermodynamic analysis of MG state of horse heart cytochrome c under acidic condition and RO formation at high temperature was introduced. The structural

and thermodynamic characteristics of MG state have been studied well, and recent studies indicated the oligomerization would be involved with the refolding of cytochrome c from MG state to N state. Because the volumetric information of MG state is insufficient, it is worth examining the oligomerization process during thermal transition from MG state. As a result of analyzing the thermal transition of cytochrome c in the MG state by DSC measurement, RO formation at high temperature was observed, and its thermal transition could be explained by a six-state model ($MG_1 \leftrightarrow MG_2 \leftrightarrow D \leftrightarrow 1/2I_2 \leftrightarrow 1/3I_3 \leftrightarrow 1/4I_4$). Furthermore, as a result of PPC measurement, the molecular volume of I_4 state was smaller than MG state, and it was considered that the hydration amount was greatly reduced.

In chapter 4, all results were briefly summarized.