

## 蛋白質の「配列-構造-安定性」相関の系統的解析

研究者 高野 和文  
大阪大学大学院 工学研究科

## 概要

蛋白質は、そのアミノ酸配列に起因して特異的な立体構造を形成しますが、そのメカニズムはまだ明らかにはなっていません。本研究では、この課題に対して、直接実験で「配列と構造」の関係を構築することで新たな知見を得ることが可能かどうかという問題に取り組みました。

## 1. はじめに

蛋白質がその機能を発揮するために重要なその立体構造は、図1に示すような熱力学量(安定性)や周辺環境などの支配の基、アミノ酸配列に依存して形成されると考えられています。私はこれまで、系統的な一残基アミノ酸置換蛋白質について、その構造と安定性の関係を調べ、立体構造の安定化機構を明らかにしてきました[1]。ここで得られた知見は、蛋白質立体構造の構築原理を理解するうえで非常に重要なものですが、「アミノ酸配列と立体構造」の関係を解明するためには、それだけではまだ不十分といえます。より「配列と構造」の関係を意識した実験研究が必要と思われれます。

一方、蛋白質の立体構造が次々に決定され、配列と構造の関係の情報は増大しています。これらの情報を基に、立体構造予測が試みられています。しかし、「なぜこの配列がこの構造を形成しているのか?」といった踏み込んだ問題に実験として取り組んでいる研究はあまりありません。

本研究では、これまでの研究を発展させ、「配列と構造」の関係を直接実験で捉えることで、蛋白質立体構造の構築原理に新たな知見を得ることが実験から可能かどうかという問題に取り組みました。具体的には、ある10残基程度のアミノ酸配列を蛋白質の種々の環境に導入し、その配列がどのような因子に規定され立体構造を形成するのかを調べました。取り扱った配列は、① $\alpha$ 構造と $\beta$ 構造を形成することが報告されている「カメレオン配列」と、② $\alpha$ 構造から $\beta$ 構造へと変化する「アミロイド性配列」です。これらの配列を、既に立体構造が決定されている安定な超好熱菌由来蛋白質のC末端領域の様々な部位に導入しました。このC末端領域では他の部位との強い相互作用はありません。

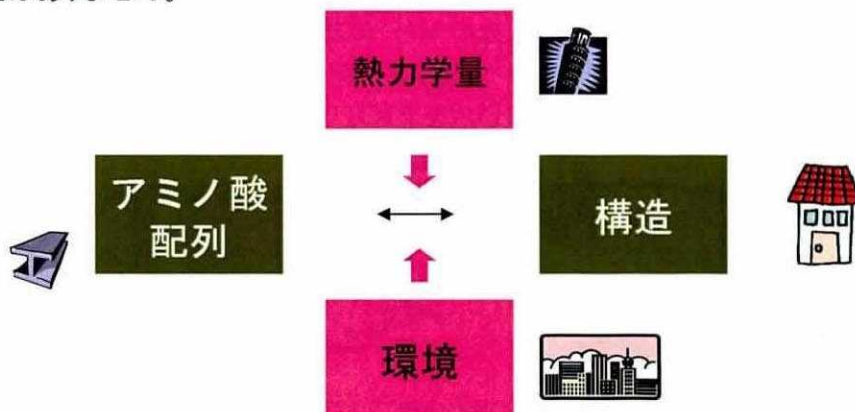


図1 蛋白質の「配列と構造」の関係

## 2. カメレオン配列の構造特性

同じアミノ酸配列でありながら蛋白質の立体構造中で異なる二次構造を形成する配列は、「カメレオン配列」と呼ばれています。本研究では、カメレオン配列の一つ「TQDMINKST」を超好熱菌由来の安定な蛋白質である Methionine aminopeptidase (MAP) と Ribonuclease HII (RNaseHII) [2] の C 末端領域の種々の部位に導入した変異体を作製し、その X 線結晶構造解析を行いました。MAP の C 末端は  $\beta$  シート構造 ( $\beta$  構造) を、RNaseHII の C 末端は  $\alpha$  ヘリックス構造 ( $\alpha$  構造) を形成しています。

MAP にカメレオン配列を導入した変異体では、構造が決定できた 2 種とも、いずれも  $\beta$  構造を形成していました (図 2)。導入部位はそれぞれ異なりますが、いずれも導入した配列前部の  $\beta$  構造の影響を受けているようにみられます。

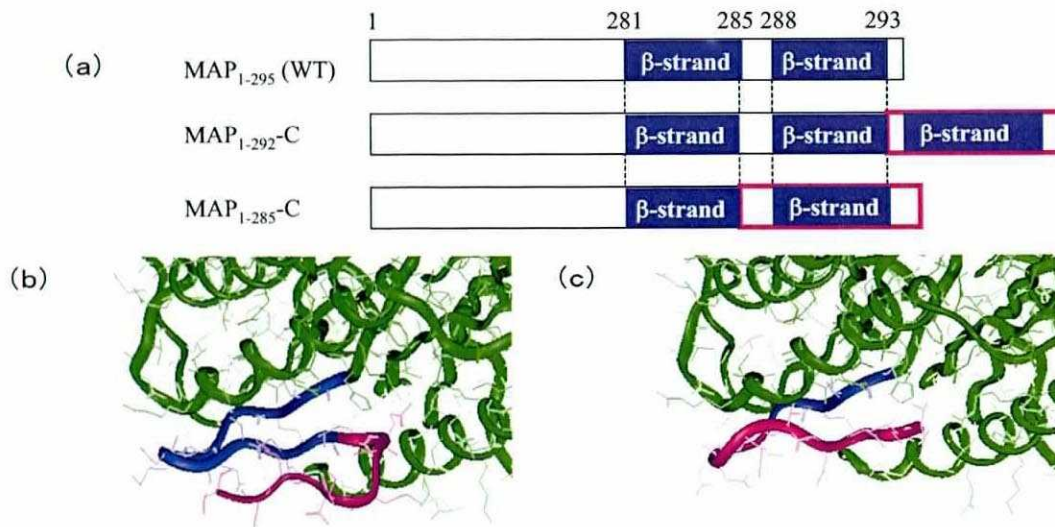


図 2 (a) 作製した MAP の変異体の模式図 紫部がカメレオン配列、(b) 変異体 MAP<sub>1-292</sub>-C の C 末端付近の構造 紫部がカメレオン配列、(c) 変異体 MAP<sub>1-285</sub>-C の C 末端付近の構造 紫部がカメレオン配列

RNaseHII では、元々存在しています C 末端の  $\alpha$  ヘリックスの途中からカメレオン配列を導入した場合、元と同様に  $\alpha$  ヘリックスを形成する傾向にありましたが、 $\alpha$  ヘリックスの伸長はみられませんでした。また、この  $\alpha$  ヘリックスの前後にカメレオン配列を導入した場合は、 $\alpha$  ヘリックスは形成されませんでした (図 3)。これらの結果は、先の MAP の結果と同様に、導入した配列前部の構造に影響を受けているといえます。さらに、 $\alpha$  ヘリックスが伸長されなかったことから、周辺部位からのわずかな相互作用がこの  $\alpha$  ヘリックスの形成を支配していると思われます。

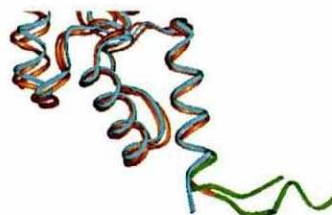


図 3 RNaseHII<sub>1-212</sub>(WT)、RNaseHII<sub>1-208</sub>-C、RNaseHII<sub>1-212</sub>-C の C 末端付近の構造 緑部がカメレオン配列



### 3. アミロイド性配列の構造特性

アルツハイマー病やプリオン病をはじめとする様々なヒトの病気では、蛋白質が条件により $\alpha$ 構造から $\beta$ 構造へと変化し、繊維状の凝集体を形成することが病気の原因であるといわれています[3]。アルツハイマー病における老人班の主成分であるアミロイド $\beta$ ペプチド( $A\beta_{1-42}$ )は42個のアミノ酸からなり、これまでの研究から $A\beta_{1-42}$ の Tyr10-Val24 ( $A\beta_{10-24}$ )と Lys28-Ala42 ( $A\beta_{28-42}$ )の領域が $\beta$ 構造形成に重要であると提案されています。本研究では、これらの領域の配列をRNaseHIIのC末端領域の種々の部位に導入した変異体を作製し、そのX線結晶構造解析を行いました。 $A\beta_{1-42}$ は凝集しやすいという特性から水溶液中での構造は知られていません。

$A\beta$ 配列が導入されたRNaseHII変異体は、カメレオン配列が導入された場合よりも、蛋白質精製や結晶化が困難でしたが、変異体RNaseHII<sub>1-197</sub>- $A\beta_{28-42}$ について結晶構造を得ることができました。その結果、RNaseHII<sub>1-212</sub>(WT)では $\alpha$ ヘリックス構造を形成しているC末端領域が、変異体RNaseHII<sub>1-197</sub>- $A\beta_{28-42}$ では逆平行 $\beta$ シート構造を形成していました(図4)。この結果は、水溶液中の $A\beta_{1-42}$ において、 $A\beta_{28-42}$ が $\beta$ 構造を形成していることを示唆しています。この $A\beta_{28-42}$ の構造は、水溶液環境下における $A\beta_{1-42}$ の初めての原子レベルでの構造です。

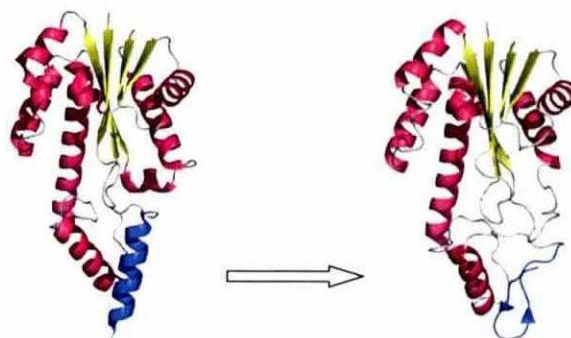


図4 RNaseHII<sub>1-212</sub>(WT)(左)とRNaseHII<sub>1-197</sub>- $A\beta_{28-42}$ (右)の構造

また、作製した変異体のアミロイド線維形成能の測定などから、図5に示すような $A\beta_{1-42}$ の水溶液環境下における構造変化のモデルが提案できました。

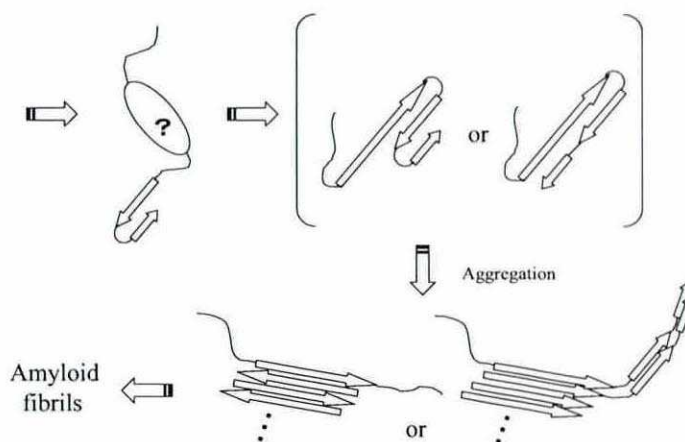


図5  $A\beta_{1-42}$ の水溶液環境下における構造変化モデル

#### 4. 「配列-構造-安定性」相関

カメレオン配列やアミロイド性配列を導入した変異体の安定性は、野生型と比べてあまり大きな変化はありませんでした。この結果は、一残基アミノ酸置換蛋白質の大きな安定性変化と異なります。このことは、これらの配列がその構造に関わらず安定化に寄与していることを示唆しています。

カメレオン配列についての研究結果において、今回はすべてC末端に配列を導入したため、その構造は前部(N末端)側の構造に大きく影響を受けていると考えられます。一方、アミロイド性配列は自ら $\beta$ 構造を形成していました。これらの結果から、立体構造を形成できる蛋白質の配列は、アミロイド性配列のようにその配列特性に依存して構造を形成する「構造形成型」配列ユニットと、カメレオン配列のような環境に依存して構造を形成する「環境適応型」配列ユニットの組合せによって構成されていると推測されます。

#### 5. 終わりに

本研究により、蛋白質の「配列と構造」の関係について、幾つかの新しい知見の手がかりを得ることができました。また、これまで不可能であった凝集性の配列の構造解析も本研究で用いた手法により可能となりました。今後は「配列と構造」の関係におけるこれらの課題をより明確に明らかにすることを目指して、引き続き研究を進めていく予定です。

#### 参考文献

- [1] Takano et al. (1995) *J. Mol. Biol.* 254, 62. ; Takano et al. (2003) *J. Biol. Chem.* 278, 31790. 他23報
- [2] Mukaiyama, Takano et al. (2004) *Biochemistry* 43, 13859.
- [3] Ohnishi and Takano (2004) *Cell. Mol. Life Sci.* 61, 511. ; Cornista, Koga, Takano et al. (2005) *J. Biotechnol.* (in press).

#### 謝辞

MAPの発現プラスミドをご提供いただきましたタカラバイオ株式会社に感謝します。