

Aspergillus niger 非ペプシン型酸性プロテアーゼAおよび
リボヌクレアーゼT₁のNMRによる高次構造解析

小 島 正 樹

①

学 位 論 文

Conformation Analyses of *Aspergillus niger* Non-Pepsin-Type Acid

Proteinase A and Ribonuclease T₁ by NMR

(*Aspergillus niger* 非ペプシン型酸性プロテアーゼAおよび

リボヌクレアーゼT₁のNMRによる高次構造解析)

平成4年12月博士(理学)申請

東京大学大学院理学系研究科

生物化学専攻

小島 正樹

第1章 序	
1.1 酸性プロテアーゼ	1
1.2 アスパラギン酸プロテアーゼ	1
1.3 <i>A.niger</i> プロテアーゼA	2
1.4 リボヌクレアーゼT ₁	3
1.5 本研究の意義	4
第2章 プロテアーゼAのpH変性の解析	
2.1 序	7
2.2 方法	7
2.2.1 プロテアーゼAの精製	7
2.2.2 NMR測定	8
2.2.3 CD測定	8
2.2.4 酵素活性の測定	9
2.2.5 ゲル濾過	9
2.2.6 データ解析	9
2.3 結果	10
2.3.1 NMRスペクトル	10
2.3.2 CDスペクトル	11
2.3.3 酵素活性	11
2.3.4 ゲル濾過	11
2.4 考察	12
2.4.1 中性pHにおける変性	12
2.4.2 2本鎖の解離と不可逆性	13
2.4.3 変性のメカニズム	13
第3章 プロテアーゼAの熱変性の解析	
3.1 序	15
3.2 方法	15
3.2.1 NMR測定	15
3.2.2 CD測定	15
3.2.3 酵素活性の測定	16
3.2.4 ゲル濾過	16
3.2.5 DSC	16
3.2.6 データ解析	16
3.3 結果	17

3.3.1 NMRスペクトル	17
3.3.2 CDスペクトル	17
3.3.3 酵素活性	18
3.3.4 ゲル濾過	18
3.3.5 DSC	18
3.4 考察	18
3.4.1 熱安定性の概要	18
3.4.2 安定性と分子内相互作用	19
3.4.3 不可逆過程の解析	20
3.4.4 二状態遷移	20
3.4.5 解析方法の検討	20
第4章 プロテアーゼA軽鎖の高次構造解析	
4.1 序	22
4.2 方法	22
4.2.1 軽鎖の調製	22
4.2.2 2D-NMR測定	22
4.2.3 スペクトルの解析	23
4.2.4 立体構造計算	23
4.3 結果と考察	23
4.3.1 スペクトルの特徴	24
4.3.2 シグナルのアミノ酸タイプ決定	24
4.3.3 シグナルの連鎖帰属	25
4.3.4 距離情報の抽出と立体構造計算	26
第5章 intactプロテアーゼAの高次構造解析	
5.1 序	27
5.2 方法	28
5.2.1 <i>A.niger</i> の培養とサンプルの精製	28
5.2.2 NMR測定(同位体標識)	30
5.2.3 NMR測定(同種核3次元)	31
5.2.4 NMR測定(natural abundance)	31
5.2.5 データ処理	31
5.3 結果と考察	32
5.3.1 <i>A.niger</i> の培養条件の検討	32
5.3.2 NMRスペクトル	35
5.3.3 プロテアーゼAの生理的役割	36

5.4 補遺 (基質アナログとの相互作用の解析)	37
第6章 リボヌクレアーゼT ₁ 変異体の分子動力学計算	
6.1 序	38
6.2 方法	39
6.3 結果と考察	39
6.3.1 変異体の立体構造	40
6.3.2 予想される反応機構	40
第7章 野生型リボヌクレアーゼT ₁ の高次構造解析	
7.1 序	42
7.2 方法	42
7.2.1 NMR測定	42
7.2.2 スペクトルの解析	42
7.2.3 立体構造計算	43
7.3 結果と考察	43
7.3.1 シグナルの帰属	43
7.3.2 二次構造	45
7.3.3 Lys25体との比較	46
7.3.4 距離情報の抽出と立体構造計算	47
第8章 カルボキシメチル化リボヌクレアーゼT ₁ の熱安定性の解析	
8.1 序	48
8.2 方法	48
8.2.1 NMR測定	48
8.2.2 データ解析	49
8.2.3 立体構造表示	49
8.3 結果	49
8.3.1 NMRスペクトルの特徴	49
8.3.2 変性曲線と熱力学的解析	50
8.4 考察	50
8.4.1 変性過程の特徴	50
8.4.2 分子構造との比較	51
第9章 今後の展望	
9.1 今後の展望	53
<<参考文献>>	54

第1章 序

1.1 酸性プロテアーゼ

Hartley は蛋白質分解酵素をその活性中心に存在する必須原子団の性質から、セリンプロテアーゼ、チオールプロテアーゼ、金属プロテアーゼ、および酸性プロテアーゼの4群に分類した(1960)。この中で酸性プロテアーゼは他と分類を異にし、酸性 pH 域で作用するプロテアーゼを総称している。このことは、酸性プロテアーゼの活性中心残基の性状が他のプロテアーゼほど明確になっていなかったことを意味している。また同時に、この分類で、酸性プロテアーゼが他の3群と実際にほとんど重複せずに独立の1群をなしたという事実は、酸性プロテアーゼの活性中心部位の性状が他の3群とはかなり異なっていることを示唆している。実際酸性プロテアーゼはDFP、SH試薬、EDTAなどにより特異的失活を起こさない。即ち一般にその活性部位に活性セリン、SH基、あるいは金属を含まないプロテアーゼである。ペプシン及び類縁酸性プロテアーゼは至適 pH が非常に低いことから、活性中心にカルボキシル基の存在が推定されていたが、特異的の化学修飾の研究により、共通して活性部位に必須のAsp残基を含むことがわかり、他の3群にならって現在ではアスパラギン酸プロテアーゼと呼ばれている。その後の研究の進展により、カルボキシル基以外の活性中心残基を有し酸性下で働くプロテアーゼや、アスパラギン酸プロテアーゼの中でも中性付近で活性をもつものがあることがわかり、現在ではアスパラギン酸プロテアーゼと酸性プロテアーゼとは必ずしも対応しない。しかし pH1~2 付近の酸性下で活性を発現するためにはカルボキシル基の存在がまず容易に推定される。

1.2 アスパラギン酸プロテアーゼ

アスパラギン酸プロテアーゼはレトロウィルスから微生物、高等動植物に至るまで生物界に広く分布し、それぞれ独自に重要な機能を担っている。この種のプロテアーゼに共通の特徴として以下の点が挙げられる。1)カテプシンE (Athauda et al., 1991)とレトロウィルス由来のプロテアーゼ(Meek et al., 1989)の分子量はそれぞれ、約80,000と約20,000であるが、他の全てのアスパラギン酸プロテアーゼは35,000~42,000の範囲の分子量をもつ。2)最初不活性な前駆体(Zymogen)として生合成され、その後自己触媒的にアミノ末端の活性化ペプチドを切断して活性化する。3)活性中心に2個のAsp残基をもち、そのカルボキシル基が触媒機能の発現に関与するので、いくつかの例外を除いて、酸性領域で強い活性を示す。上記Asp残基はジアゾ化合物(Rajagopalan et al., 1966)やエポキシド(Tang, 1971)によって特異的に修

飾され失活する。4)ペプチド性阻害剤であるペプスタチンにより阻害される (Umezawa et al., 1970; Morishima et al., 1970; Kunimoto et al., 1972)。図 1.1 に反応機構のモデルを示す。なおレトロウィルスと真核生物のプロテアーゼを比較すると、前者は 2 量体として働くのに対し、後者は単量体で働く点が異なっている (Meek et al., 1989)。

またレトロウィルス RSV (Miller et al., 1989; Jaskolski et al., 1990), HIV-1 (Navia et al., 1989; Wlodawer et al., 1989; Lapatto et al., 1989)のプロテアーゼ、真菌の endothiapepsin (Blundell et al., 1990), penicillopepsin (James & Sielecki, 1983), rhizopuspepsin (Suguna et al., 1987)、及び porcine pepsin (Sielecki et al., 1990; Abad-Zapatero et al., 1990; Cooper et al., 1990), human renin (Sielecki et al., 1989), bovine chymosin (Gilliland et al., 1990; Newman et al., 1991)については、X線結晶構造解析により立体構造が決定されている。いずれも図 1.2 のような構造をとっており、三次構造的にみると以下のような特徴がある (Rao et al., 1991)。1)互いに相同な 2 つのドメイン (レトロウィルスの場合は単量体サブユニット) が対称的に向き合って溝状の活性部位を形成しており、各ドメインはこの活性部位の側に ϕ ループと呼ばれる反平行 β シート構造を形成している。2)活性中心の 2 つの Asp 残基は各ドメインの ϕ ループ上に位置し、活性部位をはさんで向き合っている。 ϕ ループ上のアミノ酸配列は生物間でよく保存されているが、 β シートを構成する鎖の数はレトロウィルスでは 4 本、真核生物では 6 本であり、各鎖のつながり方も両者の間で異なっており、分子進化を考える上で興味深い。

1.3 *A.niger* プロテアーゼ A

プロテアーゼ A [EC.3.4.23.6] はクロコウジカビ (*Aspergillus niger* var. *macrosporus*) が産生するプロテアーゼのうちの 1 種である (Koaze et al., 1964) が、*A.niger* プロテアーゼ B を含む上記ペプシン型アスパラギン酸プロテアーゼとは諸性質を異にする。変性ヘモグロビンに対する至適 pH は 1.1 で、強酸性下で働くが、分子量は約 22,300 (Horiuchi et al., 1969) でペプシン型プロテアーゼと比べて分子サイズが小さい。図 1.3 に示す通り軽鎖 (39 残基) と重鎖 (173 残基) の 2 本鎖が非共有結合的に結合している (Takahashi et al., 1991) が、レトロウィルスプロテアーゼのように同一の 2 本鎖からは成っていない。ペプスタチンに対して非感受性であり、特異的化学修飾剤である D A N (diazoacetyl-DL-norleucine methyl ester) や E P N P (1,2-epoxy-3-(*p*-nitrophenoxy)propane) に対しても殆ど反応しない (Chang et al., 1976)。基質特異性もペプシン型酵素とは異なることが確かめられて

いる (Iio & Yamasaki, 1976; Ido et al., 1987)。さらに D F P (diisopropylfluorophosphate)、S H 試薬、金属キレート剤といった、アスパラギン酸プロテアーゼ以外の各種プロテアーゼに特異的な修飾試薬によっても阻害されず(Iio, 1978)、活性中心残基は現在のところ不明である。

アミノ酸組成の点から見ると酸性アミノ酸が非常に多い (Asp18 個, Glu19 個) に対して、塩基性アミノ酸は極めて少なく (Lys3 個, His1 個, Arg0 個)。電荷的にかなり偏った組成をしている。重鎖中に 4 個存在する Cys 残基は全てジスルフィド結合している。遺伝子レベルの解析結果からプロテアーゼ A は軽鎖と重鎖の間に 11 残基の挿入配列を含む 1 本鎖として合成され、プロセッシングを受けて 2 本鎖に変換するものと考えられる(Inoue et al., 1991) (図 1.4)。挿入配列は正に荷電したアミノ酸を 3 残基含み、成熟酵素 (4 残基+1N 末端) と比べて正電荷が多い。

プロテアーゼ A 以外の非ペプシン型の酸性プロテアーゼとして、現在までに *Scytalidium* プロテアーゼ B (Maita et al., 1984) と Thermopsin (Ling & Tang, 1990) の 2 種について一次構造を含む性状が報告されており、前者は *A. niger* プロテアーゼ A と一次構造上 50% の相同性があるが、後者は相同性がない。また前者はプロテアーゼ A と異なり 1 本のポリペプチドから成る。プロテアーゼ A はペプシン型アスパラギン酸プロテアーゼを含むどの蛋白質とも相同性がない (Takahashi et al., 1992)。

以上のことは本酵素が今までのタイプに属さない新しいプロテアーゼであることを示している。

1.4 リボヌクレアーゼ T₁

リボヌクレアーゼ T₁ (RNase T₁) [EC.3.4.23.6] はコウジカビ *Aspergillus oryzae* が産生するグアニン塩基特異的な RNA 分解酵素である (Egami et al., 1964)。グアニンヌクレオチドの 3' 末端のリン酸転移反応により 2',3'-環状リン酸の生成を経て加水分解されると考えられている (Takahashi & Moore, 1982)。本酵素は 104 アミノ酸残基から成る 1 本鎖の球状蛋白質 (Takahashi, 1965; 1985) で、これまでに特異的化学修飾や NMR, X 線結晶構造解析等多くの研究が成されてきた (e.g. Arata et al., 1979; Arni et al., 1988, 1992; Hakoshima et al., 1992; Heinemann & Sanger, 1982; Hoffmann & Rüterjans, 1988; Schimdt et al., 1991; Shimada & Inagaki, 1990; Sugio et al., 1985, 1988; Takahashi & Moore, 1982)。これらの研究より His40, Glu58, Arg77, His92 が活性中心部位に位置し触媒残基として働くこと、グアニン塩基認識部位として Tyr42-Glu46 および Asn98 がそれに隣接して存在する

ことが知られている。なお分子中には1個の α ヘリックス、2個の β ストランド、5個の β ストランドよりなる反平行 β シートが含まれる。図1.5にRNase T₁の一次構造を示す(結晶中の立体構造については図6.1参照)。

なお本酵素の反応機構については、当初は化学修飾および結晶構造解析の結果から、Glu58が一般塩基、His92が一般酸として触媒機構に関与するモデルが提出された(Takahashi, 1970; Heinemann & Sanger, 1982)。図1.6にその反応機構を示す。一方6章で述べるように、その後の蛋白工学的研究よりGlu58をGlnやAsp(Nishikawa et al., 1986)、あるいはAla(Shirley et al., 1989)に置換しても活性が若干残ることが示されている。

野生型RNase T₁には2種類のisozyme, Lys25体とGln25体が存在する。両者の間で酵素活性に差はないが、熱安定性は前者が後者よりやや安定であることが知られている(Shirley et al., 1989)。なお上記化学修飾において、RNase T₁をヨード酢酸で処理するとGlu58が特異的にカルボキシメチル化されて酵素は失活するが、その際カルボキシメチル化により変性温度が若干上昇することが見出された(Takahashi & Moore, 1982)(8章において詳述する)。RNase T₁についてはまたこれまでに多くの変性巻き戻り実験や熱安定性に関する実験も行われてきた(e.g. Kiefhaber et al., 1990a-c; Oobatake et al., 1979; Pace & Grimsley, 1988; Pace et al., 1990; Yu et al., 1994)。塩により分子の安定性が増大すること(Oobatake et al., 1979; Pace & Grimsley, 1988)、変性構造からの巻き戻り実験においてPro39のPro55のシス異性化が律速段階であり、この過程はCyclophilinのようなprolyl cis/trans isomeraseの添加により促進されること、等が示されている(Kiefhaber et al., 1990a,b; Schonbrunner et al., 1991)。

1.5 本研究の意義

プロテアーゼAは従来にはない新しいタイプの酸性プロテアーゼであり、その構造機能相関を解明することは極めて興味深く、酸性プロテアーゼの構造と機能の全体像を理解する上でも重要であると考えられる。さらに本酵素は現在知られているプロテアーゼの中では分子量が下限に近く、本酵素の構造機能相関を究明することは酵素一般の高反応性、高特異性を解明する有力な手がかりとなりうる。本研究ではまず、本酵素のpH及び熱に対する安定性を調べるために、pH変性及び熱変性の解析を行った。2章、3章ではそれぞれpH変性、熱変性の解析結果について述べる。得られた知見は2D-NMR測定の際にも必要となる。次に軽鎖を単離しNMRにより遊離状態の軽鎖の構造解析を行った。軽鎖は分子量4,000のペプチドで、2D-

NMR により立体構造を解明することが可能である。また両鎖の結合が活性の発現に不可欠であることから、native コンフォメーション中と解離状態とで各鎖の構造を比較することは、プロテアーゼ A の構造形成を考える上で興味深い。怪鎖の構造解析については 4 章で述べる。一方 intact プロテアーゼ A についても現在異種核多次元スペクトルの解析を進めている。現在分子量 20,000 以上の分子で NMR により構造決定された例は数少ないが、スペクトルを見る限り β シートに富むこともあってシグナルがよく分離して観測されており、本酵素の構造は好適な挑戦対象である。また現在 NMR による構造解析の分野において試料調製をいかに行うかが重要な問題となってきているが(Werner et al., 1994)、5 章で述べるように本酵素の同位体標識は遺伝子工学的手法を用いずに行っており、大量発現系作製が困難な場合の NMR 試料調製の例として他の研究にも有効な指針を与え得るものと期待される。なお当研究室では独立に本酵素の X 線結晶構造解析を行っており(Tanokura et al., 1992)、同一蛋白質分子で結晶構造と溶液中の構造を比較することは興味深い。本酵素の蛋白工学的手法による部位特異的アミノ酸置換や化学修飾の研究も同時に進行しており(Kagami, Onmura et al., unpublished results)、非ペプシン型特性を有する本酵素の構造・機能相関解明の一環として本研究の果たす役割はきわめて大きいと考えられる。

また RNase T_1 はこれまでに多くの構造的研究がなされており、酵素化学においてはリゾチームなどと並んで酵素の基質認識や反応機構の分子論的モデルとしてしばしばとり上げられているが、一方で上述のように未解決の点も少なからずあり、さらに高い時間・空間分解能で解析を進めるには好個の対象である。本研究では 1.4 に挙げた幾つかの問題を高次構造の点から解析した。まず Glu58 変異体の残存活性の問題、すなわち Glu58 の役割に関する従来の解釈との矛盾を検討するためには Glu58 変異体の立体構造の情報が不可欠である。現在 Glu58 変異体の構造解析は X 線、NMR ともに行われていないので、既に解かれている野生型酵素の立体構造をもとにして分子動力学シミュレーションを行い、変異体・基質アナログ (3'-GMP) 複合体の構造を予測した。シミュレーションの結果とそれに基づいた反応機構の解釈については 6 章で述べる。次に野生型として存在する 2 種類の isozyme, Lys25 体と Gln25 体の差異、特に熱安定性の分子論的機構を 2 次元 NMR を用いて解析した。Lys25 体の NMR 解析については既に報告されている(Hoffmann & Rüterjans, 1988)ので、Gln25 体の 2 次元 NMR スペクトルを解析し Lys25 体のものと比較した。Gln25 体については立体構造を計算している。スペクトルの解析結果と計算過程について 7 章で述べる。さらにカルボキシメチル化誘導体の熱安定性について解析した。RNase T_1 の熱変性に関しては CD、蛍光、DSC 等を用いた研究

が報告されている（文献等の詳細は 8 章参照）。本研究では局所的な構造情報をもたらす NMR の利点を生かして、野生型酵素およびカルボキシメチル化誘導体の熱変性過程を、立体構造上離れた 2 個の水素原子をモニターすることにより解析した。またカルボキシメチル化に伴う熱安定性の増大を分子論的に解釈するため野生型と誘導体の構造比較を分子動力学計算により行った。8 章に結果を示す。最後に今後の展望について 9 章で述べる。

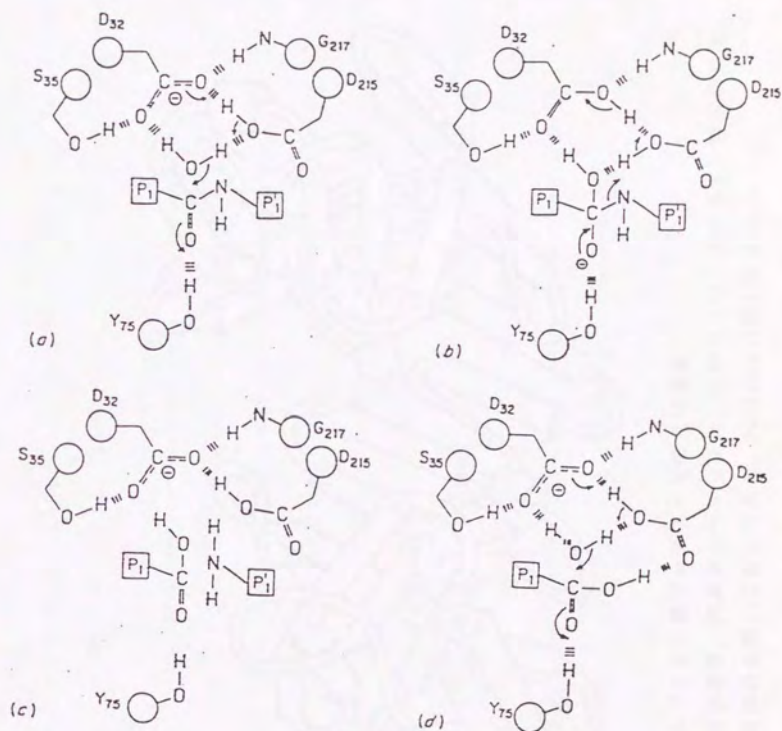


図1.1 アスパラギン酸プロテアーゼの反応機構
Foltmann(1981)による

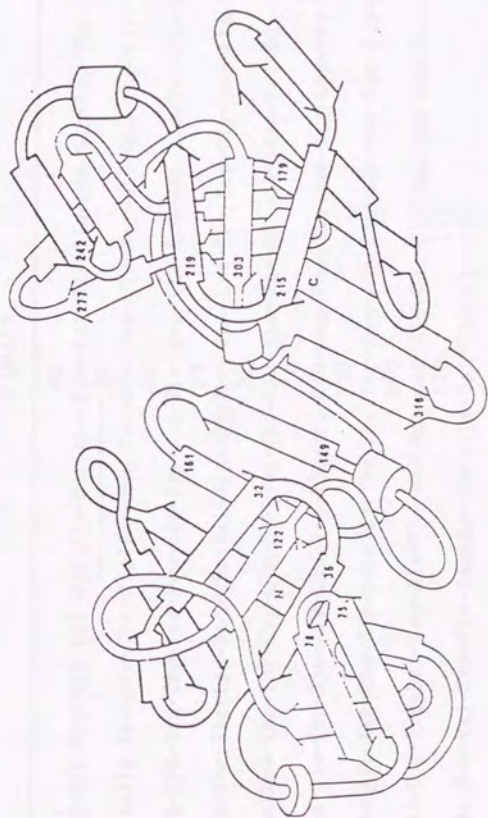


図1.2 アスパラギン酸プロテアーゼの立体構造

数字は残基番号。円筒は α ヘリックス、矢印は β シートを表す。図は活性中心の溝の部分を開いて書いてある。Follmann(1981)による。

L CHAIN

1 20
Glu-Glu-Tyr-Ser-Ser-Asn-Trp-Ala-Gly-Ala-Val-Leu-Ile-Gly-Asp-Gly-Tyr-Thr-Lys-Val-
30 39
Thr-Gly-Glu-Phe-Thr-Val-Pro-Ser-Val-Ser-Ala-Gly-Ser-Ser-Gly-Ser-Ser-Gly-Tyr

H CHAIN

1 20
<Glu-Ser-Glu-Glu-Tyr-Cys-Ala-Ser-Ala-Trp-Val-Gly-Ile-Asp-Gly-Asp-Thr-Cys-Glu-Thr-
30 40
Ala-Ile-Leu-Gln-Thr-Gly-Val-Asp-Phe-Cys-Tyr-Glu-Asp-Gly-Gln-Thr-Ser-Tyr-Asp-Ala-
50 60
Trp-Tyr-Glu-Trp-Tyr-Pro-Asp-Tyr-Ala-Tyr-Asp-Phe-Ser-Asp-Ile-Thr-Ile-Ser-Glu-Gly-
70 80
Asp-Ser-Ile-Lys-Val-Thr-Val-Glu-Ala-Thr-Ser-Lys-Ser-Ser-Gly-Ser-Ala-Thr-Val-Glu-
90 100
Asn-Leu-Thr-Thr-Gly-Gln-Ser-Val-Thr-His-Thr-Phe-Ser-Gly-Asn-Val-Glu-Gly-Asp-Leu-
110 120
Cys-Glu-Thr-Asn-Ala-Glu-Trp-Ile-Val-Glu-Asp-Phe-Glu-Ser-Gly-Asp-Ser-Leu-Val-Ala-
130 140
Phe-Ala-Asp-Phe-Gly-Ser-Val-Thr-Phe-Thr-Asn-Ala-Glu-Ala-Thr-Ser-Gly-Gly-Ser-Thr-
150 160
Val-Gly-Pro-Ser-Asp-Ala-Thr-Val-Met-Asp-Ile-Glu-Gln-Asp-Gly-Ser-Val-Leu-Thr-Glu-
170 173
Thr-Ser-Val-Ser-Gly-Asp-Ser-Val-Thr-Val-Thr-Tyr-Val

図1.3 プロテアーゼAの一次構造

Takahashi et al. (1991)による

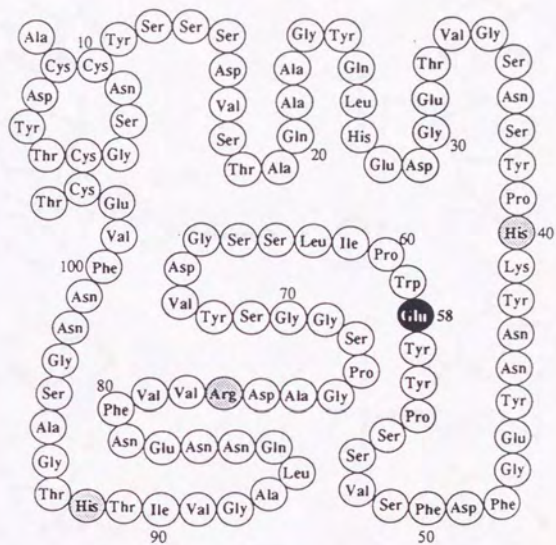


図1.5 RNase T₁の一次構造. Takahashi (1965, 1985)による.

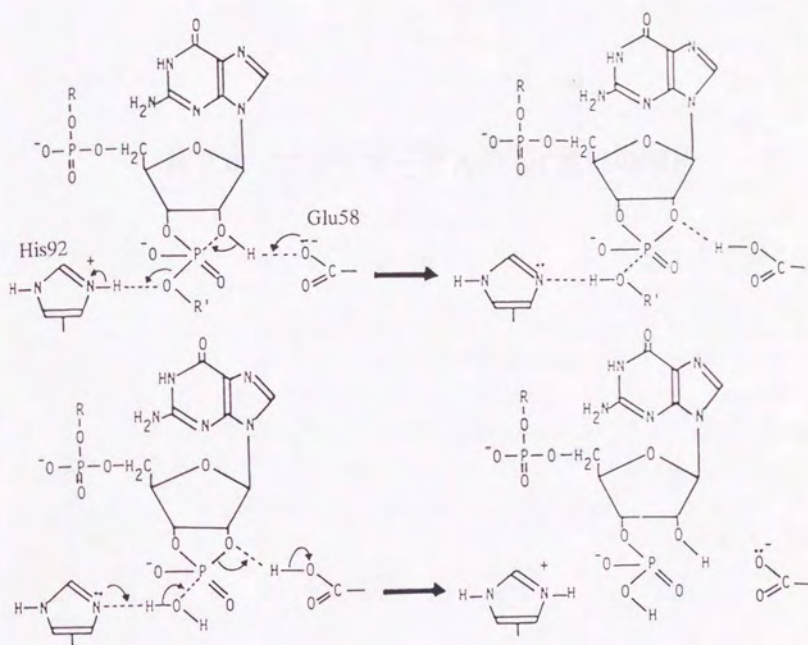


図1.6 RNase T₁の反応機構. Takahashi & Moore (1982)による.

第2章 プロテアーゼAのpH変性の解析

2.1 序

本章ではまず本酵素の変性特性に着目した pH 変性の解析結果について述べる。変性の研究は蛋白質の構造や安定性を解明するために古くから行われてきた (Creighton, 1990 や Jaenicke, 1984, 1991 の総説参照)。しかし従来の pH 依存性変性実験は塩酸ゲアニジンや尿素などの変性剤の存在下や高温、高(または低) pH など極端な条件で行っており (Pfeil et al., 1976b; Pace et al., 1990)、穏やかな条件下での変性を直接解析した例はあまりない。多くの蛋白質は常温かつ中性 pH で最もよく働き、通常そのような条件では変性しないからである (Chen et al., 1991)。プロテアーゼ A のように中性 pH で変性し、変性そのものが活性の調節に関わっていると考えられる蛋白質はペプシン等の例を除くと稀である (Bovey et al., 1960)。ペプシンの場合中性 pH での変性失活はコンフォメーションの変化を伴い、その際活性中心の溝が溶媒に露出すると考えられている (Nakayama et al., 1983)。

さらに試料蛋白質も多くの場合 1 本鎖から成る球状蛋白質であり (Atkinson et al., 1991; Kiefhaber et al., 1990a, 1990b)、本酵素のように複数のポリペプチド鎖から成る蛋白質を扱った研究はまだ数少ない (Engelhard et al., 1976; Jaenicke & Rudolph 1986)。複数のペプチド鎖の解離、会合、相互作用を考慮に入れる必要性から解析が複雑になるためであると考えられる。本研究では変性過程を詳細に解析するためにいくつかの方法を併用した。即ち 2 次構造を CD (Schmid, 1989) で、側鎖を含めた全体の 3 次構造を NMR (Wüthrich, 1976; 1986) で、酵素としての機能を活性測定で、また 2 本鎖の結合解離の状態をゲル濾過により測定し、滴定曲線を解析した。解析方法の検討については変性一般に関わる問題として 3 章で述べる。

2.2 方法

2.2.1 プロテアーゼ A の精製

プロテアーゼ A は *Aspergillus niger* var. *macrosporus* の培養濾液から抽出した粗酵素粉末より精製した。精製は DEAE-Toyopearl 650S を用いて 2 段階のカラムクロマトグラフィーにより行った。まず最初に粗酵素粉末 (100 g) を DEAE-Toyopearl 650S (11 x 50 cm) にかけ、0.05 M acetate buffer (pH 3.0) でイソクラディック溶出した。プロテアーゼ A を含む画分を SDS-PAGE で確認した後、集めて凍結乾燥し、粗プロテアーゼ A を得た。次に粗プロテアーゼ A 粉末 (0.5 g) を 0.05

M acetate buffer (pH 4.5)に溶かし、同じ buffer で平衡化した DEAE-Toyopearl 650S カラム(3.5 x 30 cm)にかけた。十分な量の buffer で洗った後、溶出 buffer の pH を 3.0 まで徐々に下げ最終的に 0.05 M acetate buffer (pH 3.0)で溶出した。プロテアーゼ A のみを含む画分であることを確認し、凍結乾燥した。粗酵素粉末からの最終的な収率は 1.1 %であった。見かけ上の低収率は出発試料が大量の酸性プロテアーゼ B を含むためである。

2.2.2 NMR 測定

NMR スペクトルは全て Bruker AM-400 NMR 分光計で測定した。

1D-NMR スペクトルは全て 37°C、試料濃度 1 mM で測定した。試料を 0.2 M NaCl 及び 0.05 M sodium acetate- d_3 を含む D_2O 溶液に溶かし、少量の NaOD または DCl で pH を調整した。pH は pH メーターの値を同位体による補正なしに使用した。化学シフトは内部標準である DSS (sodium 2,2-dimethyl-2-silapentane-5-sulfonate)のメチルプロトンシグナルを基準にした。スペクトル幅 7000Hz で 8K のデータを観測した。待ち時間は 1.0 s、パルス幅は 60°を採用し、1024 回積算した。

2D-NMR スペクトルは全て 45°Cで測定した。試料を 3 mM (D_2O 中)または 5 mM (90% H_2O /10% D_2O 中)に調製し、NaOD で pH を 4.6 (同位体による補正せず)に調整した。DQF-COSY (Rance et al., 1983)、TOCSY (HOHAHA; Bax et al., 1985)、NOESY (Jeener et al., 1979; Macura et al., 1981; Bodenhausen et al., 1984)とも TPPI 法(Marion et al., 1983)を用いて phase sensitive モードで観測した。水のシグナルに周波数中心を置き、 H_2O 中の溶媒シグナルは待ち時間 (1.0 s) に選択的に照射することにより消去した。化学シフトは溶媒の軽水シグナルを基準にした(4.51 ppm)。TOCSY スペクトルは MLEV17 パルス系列を用いて混合時間 45 ms で測定した。NOESY スペクトルは混合時間 50 ms で測定した。スペクトル幅 7000Hz で 96~128 回積算し、 $[2k(t_2) \times 512(t_1)]$ のデータを観測した。ウィンドウ関数としてガウス関数 (TOCSY 及び NOESY)、サイン 2 乗関数 (DQF-COSY) を使い、 t_1 方向に 1K までゼロ・フィリングを行った後フーリエ変換した。

2.2.3 CD 測定

CD スペクトルは、NEC パーソナルコンピューターを接続した Jasco J-600 分光計により、セルホルダーの温度を 37°Cに設定し、1 mm セルを用いて測定した。試料は 50 mM buffer 及び 0.2 M NaCl を含む溶液中で 0.05% (22.7 μ M)になるように調製した。各 pH で使用した buffer の種類は図の脚注に示す。測定は全てバンド幅 2.0 nm、時定数 1.0 s で行った。200 nm から 300 nm まで 0.2 nm おきに掃引

速度 20 nm/min で 4 回積算した。得られたスペクトルをスムージング処理し、値を平均残基分子楕円率 $[\theta]$ に変換した。

2.2.4 酵素活性の測定

酵素活性の測定は、基質として 2.5 %ヘモグロビンを含む 0.1 M buffer を用い種々の pH で行った。基本的には Anson の方法(Anson, 1939)に従った。pH を調整した 0.4 ml の基質溶液を 0.2 ml の酵素溶液に添加し、37°C で 30 分反応させた。0.8 ml の 5 %トリクロロ酢酸を加えて反応を止め、室温で 10 分間 12,000 rpm で遠心し、上清の吸光度を 280 nm で測定した。

カゼインを基質として用いた中性 pH 付近の測定は Kunitz の方法(Kunitz, 1947)に拠った。0.9 %熱変性カゼインを含む 0.1 M buffer 0.2 ml を 0.2 ml 酵素溶液に添加し、37°C で 30 分反応させた。0.6 ml の 5 %トリクロロ酢酸を加えて反応を止め、室温で 10 分間 12,000 rpm で遠心し、上清の吸光度を 280 nm で測定した。なお各 pH で使用した buffer の種類は図の脚注に示す。

2.2.5 ゲル濾過

ゲル濾過は Tosoh HPLC と TSK G3000SW カラムを用いて 37°C で行った。試料は 0.2 M NaCl を含む 50 mM 溶出 buffer 中で 0.3 mg/ml になるように調製した。各 pH で使用した buffer の種類は CD 測定の時と同一である。pH 調製後 30 分してから 10 μ l を注入した。流速 0.8 ml/min で溶出し A_{280} でモニターした。

2.2.6 データ解析

プロトン解離式に基づく pH 滴定曲線の解析には PKA-I プログラム(Tanokura et al., 1976)を用いた。協同的解離を解析できるよう Hill 係数を含む形に書き換えて使用した。解析の原理は、ある pH で測定した値(化学シフト、ピーク面積、分子楕円率、酵素活性など) $d_{obs}(pH)$ を i 番目の分子種(化学シフトの場合はイオン種)に固有の値 d_i の平均として表すことである。

$$d_{obs}(pH) = \sum f_i(pH) \cdot d_i \quad (2.1)$$

ここで $f_i(pH)$ は i 番目分子種(イオン種)のモル分率で次の関係がある。

$$[f_{i-1}(pH)/f_i(pH)] = 10^{n_i[pH-pK_i]} \quad (2.2)$$

pK_i は i 番目の分子種(イオン種)から $(i-1)$ 番目の分子種(イオン種)への変化の中点 pH であり、 n_i はそのときの(見かけの)Hill 係数である。測定データの数十分多ければ最小自乗法により d_i の値を決定することができる。このとき(2.1)、(2.2)式より pK_i 、 n_i が求まる。

CD スペクトルから2次構造を算出する際には Provencher と Gröckner による CONTIN プログラム(Provencher & Gröckner, 1981)を使用した。計算は全て大型計算機センターで行った。

2.3 結果

2.3.1 NMR スペクトル

図 2.1 に幾つかの pH で測定したプロテアーゼAの NMR スペクトルを示す。pH3.0 と 5.5 ではシグナルが広く分布し高次構造を保っていることを示している。一方 pH7.0 では変性蛋白質のスペクトルになっている。pH3.0 と 5.5 の間でも特に 3ppm 付近のシグナルの分布が異なっており、この間で構造が一部変化していることがわかる。これは後述の CD による滴定結果とも矛盾しない(図 2.6)。pH による構造変化の様子を詳細に解析するため、図 2.1 に示すように 7 個のシグナルを選び、その化学シフトを測定 pH に対してプロットした。滴定曲線を図 2.2 に示す。シグナル 1~3 は高磁場シフトしたメチルプロトン、4,5 は芳香環のプロトン、7 は主鎖アミドプロトンと考えられる。シグナル 6 は化学シフトの値及び 2D-NMR スペクトル(図 2.4)から His の 2 位のプロトンと考えられ、またプロテアーゼAは重鎖 90 番目の位置に唯一の His (His90H)を含むため、シグナル 6 を His90H に帰属しその pK_a 値を表 2.1 に示すように決定した。

6 を除く滴定曲線が pH 6.5 付近で途切れているのは、プロテアーゼAが変性してランダムコイル状態になり元の位置にピークが現れなくなったからである。6 番の His90H のシグナルは pH 6.5 を境にして未変性分子種の曲線から変性分子種の曲線へ不連続に変化していると考えられる。酸性側、アルカリ性側での固有の化学シフトをそれぞれ 8.4 ppm、7.7 ppm に固定し、Hill 係数を 1 として両分子種の pK_a を求めたところ、未変性分子種では 6.9、変性分子種では 7.3 であった(表 2.1)。

図 2.1 の 1 と 7 のシグナルはそれぞれ最も高磁場側、最も低磁場側に位置し、高次構造を反映したシグナルと考えられる。そのピーク面積は native 分子種の割合に比例するので面積強度を pH に対してプロットした(図 2.3)。1, 7 の曲線はともに pH6~7 付近で本酵素が急激かつ協同的に変性することを示しており、変性中点の pH 値は 6.5 であった(表 2.2)。pH3~5 の値がばらついているのは等電点沈澱の影響によると考えられる($pI=3.3$; Kitahara, 1982)。pH2 以下では部分的に酸変性していると考えられる。

図 2.4 は 2D NMR (TOCSY, DQF-COSY) の fingerprint 領域を表す。His90H

の側鎖 2 位と 4 位のプロトンの cross peak を H で示した。H₂O 中の TOCSY 及び DQF-COSY ではアミドプロトンと α プロトンとの cross peak が約 190 個観測され、D₂O 中でも半分近くが D と交換しないで観測される。このことはこれらのプロトンが分子内の堅固なコアに存在したり、水素結合を形成していることを意味する。また溶媒のシグナルよりも低磁場側に出る α プロトンが多いことは、 β シートに富むことを反映しており (Szilagyi et al., 1989)、このことは CD 測定によっても裏付けられた (図 2.5)。

2.3.2 CD スペクトル

図 2.5 は図 2.1 と同じ pH で測定した CD スペクトルである。pH 3.0 と 5.5 のスペクトルと理論曲線 (Chen et al., 1972; Chang et al., 1978) との比較から、プロテアーゼ A は native 状態で β シートに富むことがわかる。各 pH で計算した 2 次構造の含量を表 2.3 に示す。pH 3.0 と pH 5.5 のスペクトルを比較するとこの間で構造が一部変化していることがわかる。これは後述の滴定曲線にも明瞭に現れている (図 2.6)。また図 2.5 において pH 7.0 では明らかに特定の規則構造をとっていない (Greenfield & Fasman, 1969; Chen et al., 1972)。

各 pH で測定した $[\theta]_{218}$ (β シートの指標) (Greenfield & Fasman, 1969)、 $[\theta]_{222}$ (α ヘリックスの指標) (Greenfield & Fasman, 1969)、 $[\theta]_{229}$ (native 状態におけるプロテアーゼ A スペクトルの極値) を測定 pH に対してプロットした (図 2.6)。滴定曲線の変曲点の pH 値及びそのときの Hill 係数の値を表 2.2 に示す。なお図 2.6 から pH 4.3 付近で構造が一部変化していることがわかるがこのときの Hill 係数は表 2.2 に示すように約 1 であった。

2.3.3 酵素活性

酸変性ヘモグロビンを基質として用いたときの酵素活性の pH 依存性を図 2.7 に示す。至適 pH は 37°C で 1.1 であり、曲線は pH 2.5 と 6.5 付近に変曲点をもつ。pH 7.0 以上では活性はなかった。pH を 7.0 から 2.0 に戻しても活性が現れないことから、中性 pH での失活は不可逆的であると考えられる。図 2.7 内に示すように、基質として熱変性カゼインを用いた場合にも、同様の結果が得られた。

残存活性の測定からプロテアーゼ A は pH 3.0~5.5 では 25°C で少なくとも 4 日間は安定であった (図 2.8)。これは常温では autolysis がほとんど起こらないことを意味している。

2.3.4 ゲル濾過

プロテアーゼ A は 2 本鎖から成り、両鎖は pH 6.0 から 6.5 の間で解離する。図 2.9 に示すように pH 4.5 では native プロテアーゼ A から成る単一のピークを与えるが、pH 6.0 では解離によって生じた重鎖と軽鎖のピークがそれぞれ native 酵素のピークの前後に現れている。各ピークは SDS-PAGE と銀染色により同定した（データ不記載）。重鎖が native 酵素より速く溶出するのは、後者の方がよりコンパクトで変性により体積が増加したためだと考えられる。pH 6.5 では両鎖は完全に解離している。これらの結果より、プロテアーゼ A の中性付近での変性失活は 2 本鎖の解離を伴うことがわかる。

2.4 考察

2.4.1 中性 pH における変性

中性 pH での 2 本鎖の解離と構造変化は、Asp, Glu 残基のカルボキシル基や His 残基のイミダゾール環の協同的な脱プロトン化による分子内静電反発が引金になっている可能性がある。プロテアーゼ A は His 残基を唯一つ含んでおり、その pK_a は 6.9 であった（表 2.1）。これはプロテアーゼ A が変性するとき（pH 6.0~6.5）イミダゾール環は脱プロトン化していないことを意味し、His 残基は変性の引金にはなりえない。native 状態における pK_a がランダムコイル状態の値 (Tanokura et al., 1978) と比べてやや高いのは、native 状態において His90H が溶媒と接触出来ない環境にあるか、あるいは近傍に負電荷が存在しイミダゾール環の脱プロトン化を抑えていることによると考えられる。また変性状態の pK_a の方が native 状態より大きい（表 2.1）のは変性により環の近傍がさらに負電荷を帯びるためだと考えられる。変性状態の pK_a を求める際酸性側での固有の化学シフトを native 状態と同じとして計算したが、ランダムコイル状態の値を用いれば pK_a 値はさらに大きくなる。

一方カルボキシル基のプロトンは溶媒との交換速度が速く、 $1D-^1H$ NMR から pK_a 値を求めることは出来なかった。このためカルボキシル基の脱プロトン化と変性の開始を直接関係付ける証拠はないが、プロテアーゼ A は多くのカルボキシル基（18 個の Asp, 19 個の Glu 残基 2 個の C 末端 α カルボキシル基）を含んでおり、また変性時の Hill 係数が 4 であることから、変性の開始には少なくとも 4 個以上のカルボキシル基の協同的脱プロトン化が関わっていると考えられる。

プロテアーゼ A は pH 4.3 付近でも 2 次構造が変化する（表 2.3）。一方 NMR はこの間で 3 ppm 付近の変化が顕著であるが（2.3.1）、図 2.2 では 2, 3 を除くシグナルの化学シフトは殆ど変わらず、変化するのはいくつかのプロトンに限られることを

示している。このことは pH 4.3 付近での構造変化が局所的であることを表している。

2.4.2 2本鎖の解離と不可逆性

本酵素の変性失活は pH 変化に対して不可逆的である。pH6.9 で分離精製した軽鎖は pH を酸性に戻しても 0.2 M NaCl 溶液や 10%酢酸には溶けず、一方 100 % DMSO に溶ける。これは、native な状態で 2 本鎖は主に疎水的相互作用により結合していることを示唆している。またアルカリ側から pH を戻しながら滴定すると pH6.5 以下では His90H のシグナルが見えなくなる（図 2.2 の▲）ことなどから、一旦 2 本鎖が解離するとコンホメーションが drastic に変化し、pH を戻しても native 状態とは別の構造をとるため不可逆的に失活すると考えられる。

2.4.3 変性のメカニズム

プロテアーゼ A は中性 pH で不可逆的かつ協同的に変性する。変性中点の pH 値は CD によるときは 6.1、NMR 及び活性測定によるときは 6.5 で前者の方が 0.4 低い（表 2.2）。Hill 係数はいずれの場合も 4 で変性が協同的であることを示している。一方 2 本鎖は pH 6.0 付近で解離する。これらの pH 値の若干の差異は観測している現象の違いを反映していると考えられる。即ち CD は 2 次構造、NMR は主に 3 次構造、ゲル濾過は 2 本鎖の結合状態の変化を測定していることに起因している。また活性測定による変性中点の値が高いのは基質による安定化も作用していると考えられる。但し pH 6.0~6.5 で $[\theta]$ の値が変化してるのに対し、NMR スペクトルのシグナル 1, 7 の化学シフト及びピーク面積が変わらないのは一見すると奇妙である。一般には構造変化に対して NMR の方がより敏感だと考えられているからである。これについては幾つかの理由が考えられるがその 1 つとして中間状態の存在が挙げられる。

NMR が与える情報は特定のプロトンの近傍の local な環境に関するものである。

2.3.1 で述べたようにプロテアーゼ A は分子内部に堅固なコアをもつ水素結合を形成するかしている。もし 1 のメチルプロトンと 7 のアミドプロトンがともにこのコアに存在し、かつ native の 3 次構造は部分的には崩壊しているが一方で intact に近いコアをもった中間体が存在するとすれば、pH 6.0~6.5 でシグナル 1, 7 のピーク面積と化学シフトが変わらないことを説明することが出来る。但しこの「中間体」はいわゆる "molten globule" (Ogushi & Wada, 1983; Ptitsyn, 1987) とは異なる。molten globule とは native 状態に近い 2 次構造セグメントが溶液中で大きく揺らいでいるため(Kuwajima, 1989; Baum et al., 1989)、むしろ前述とは逆の結果

を与えるような構造だからである。中間体の有無についてはさらに検討を要する。

項目	値
反応速度	0.5
平衡定数	1.5

表1.1 反応速度と平衡定数の関係

項目	値	単位
反応速度	0.5	1/s
平衡定数	1.5	
反応速度	0.5	1/s
平衡定数	1.5	

表1.2 反応速度と平衡定数の関係

項目	値	単位	反応速度	平衡定数
反応速度	0.5	1/s	0.5	1.5
平衡定数	1.5		0.5	1.5

表2.1 His90HのpKa値

	pK _a
native	6.94
denatured	7.26

表2.2 変性の中点pHとHill係数
†はHill係数を固定したことを示す

	pK _a	Hill係数
NMR	6.55	3.7
CD	6.07	4.3
	4.18	1†
酵素活性	6.49	3.4
ゲル濾過	6.03	3.9

表2.3 二次構造含量の変化

	helix	β -sheet	β -turn	remainder
pH3.0	4 %	42	25	29
pH5.5	2	64	16	18

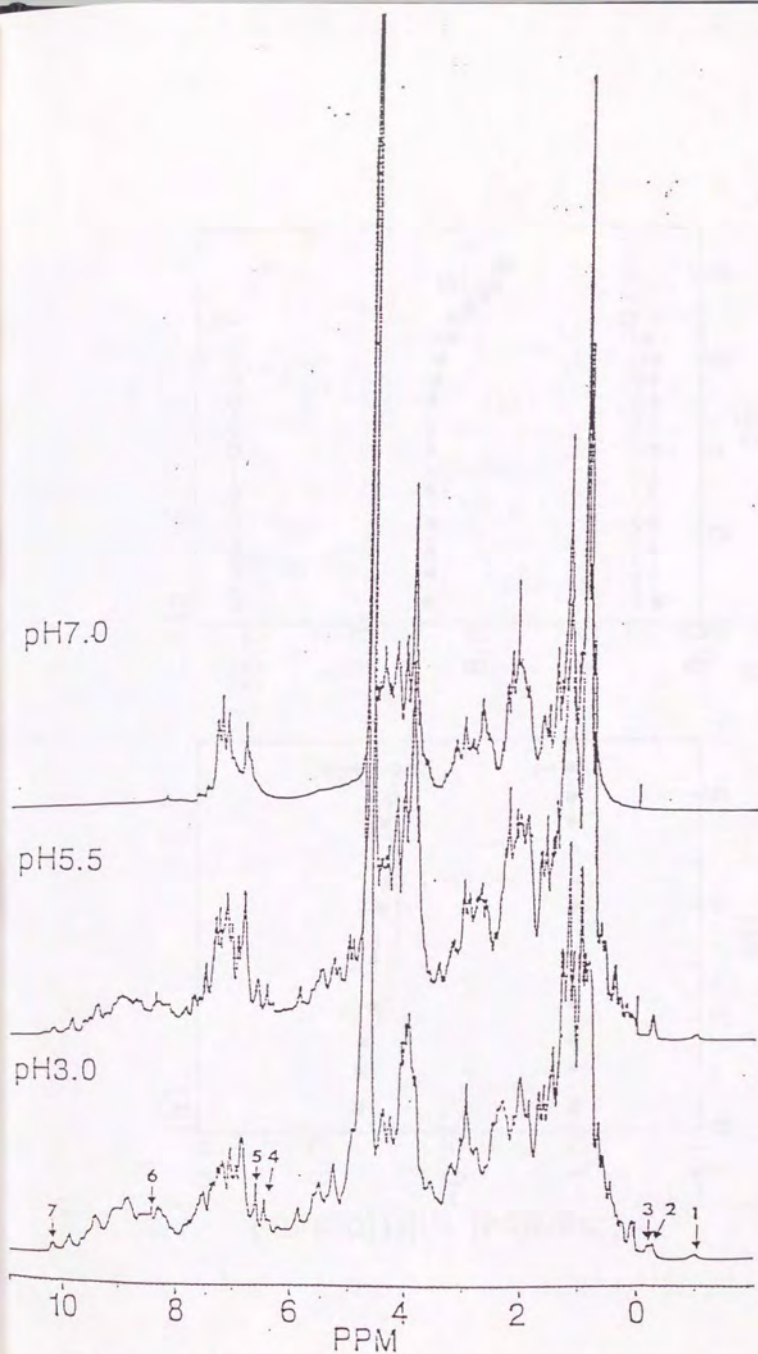


図2.1 プロテアーゼAの各種pHにおけるNMRスペクトル

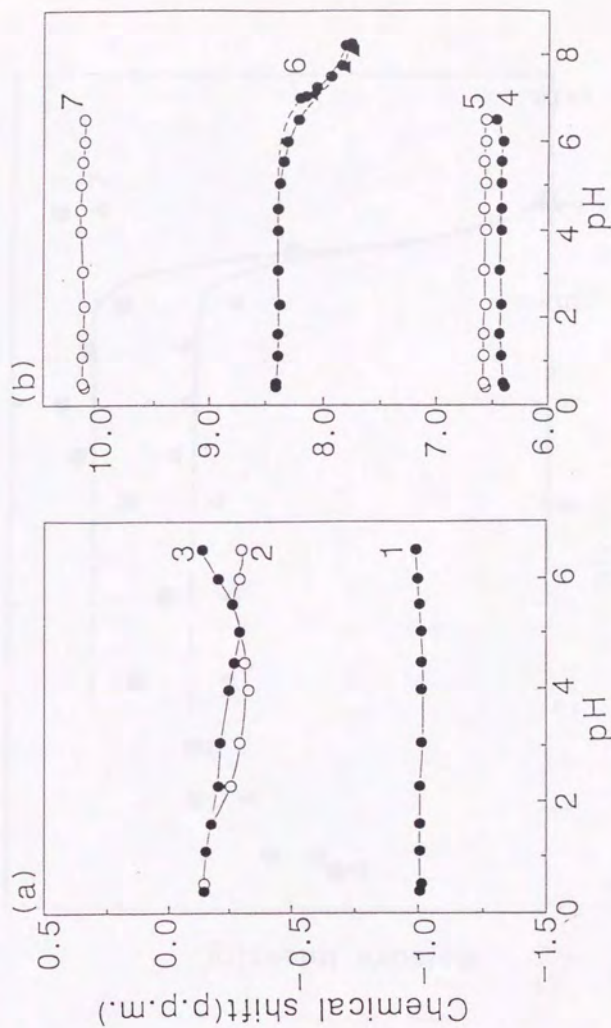


図2.2 化学シフトのpH依存性

数字は図2.1の対応するシグナルを表す。

6はHis90Hの2位のプロトンで、▲はアルカリ側から滴定したことを表す。

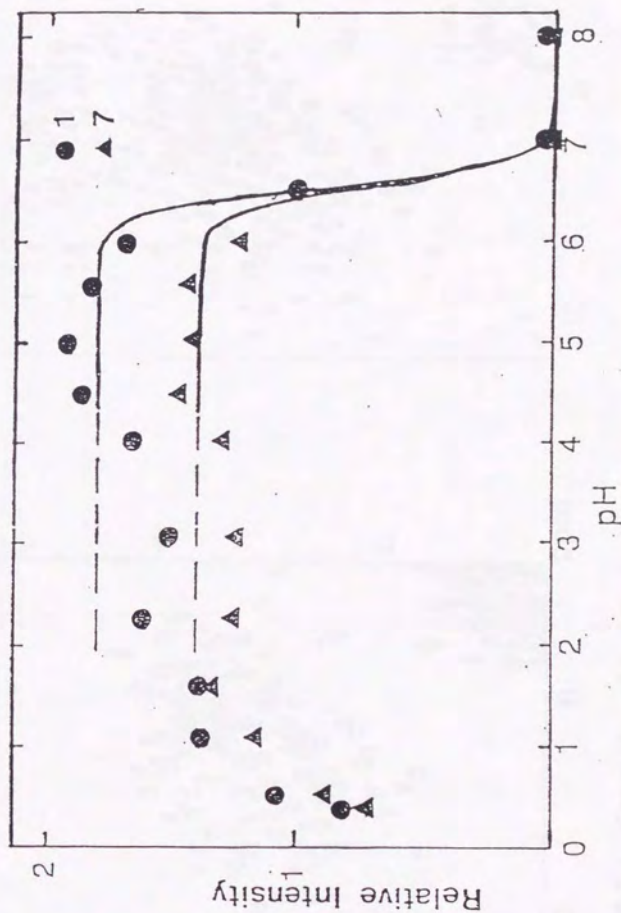


図2.3 NMRのピーク面積のpH依存性
数字は図2.1の対応するシグナルを表す

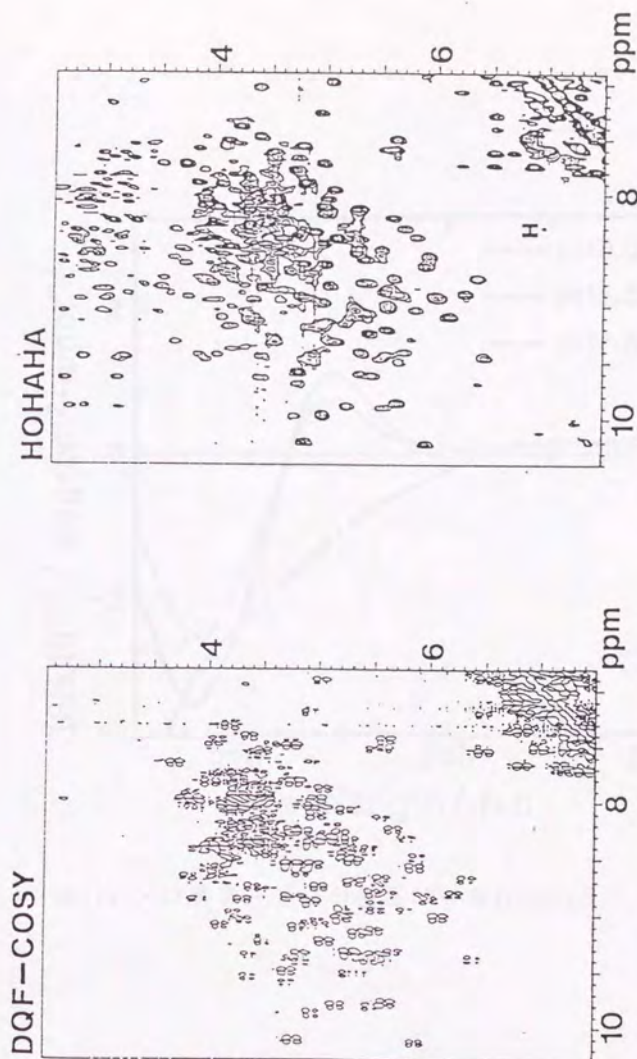


図2.4 プロテアーゼAの2D-NMRスペクトル (fingerprint領域)
HOHAHAスペクトルのHはHis90Hの2位と4位のプロトンのcross peakを表す。

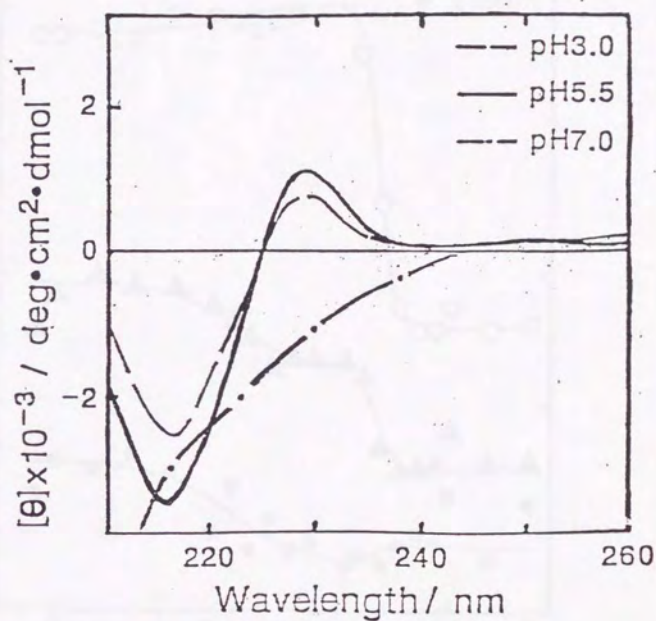


図2.5 プロテアーゼAの各種pHにおけるCDスペクトル

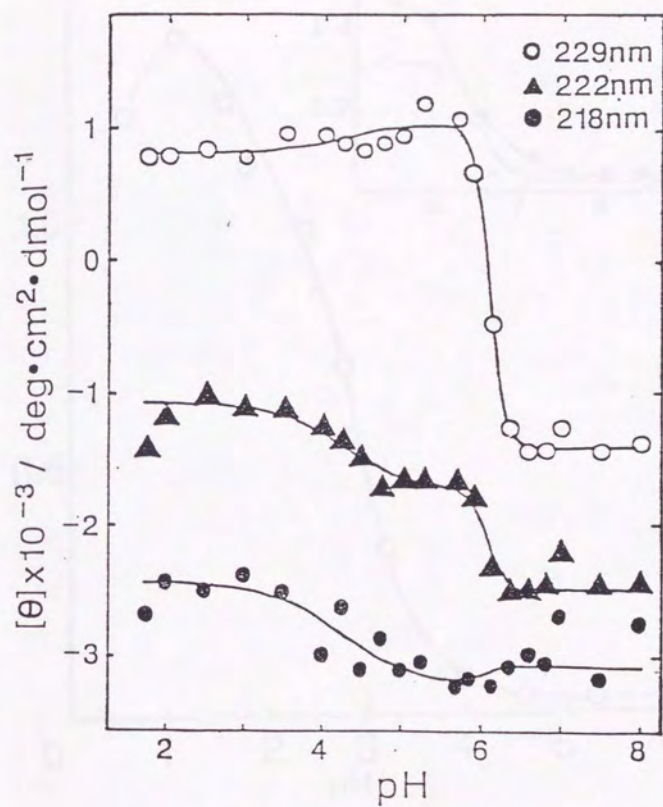


図2.6 分子橢円率のpH依存性

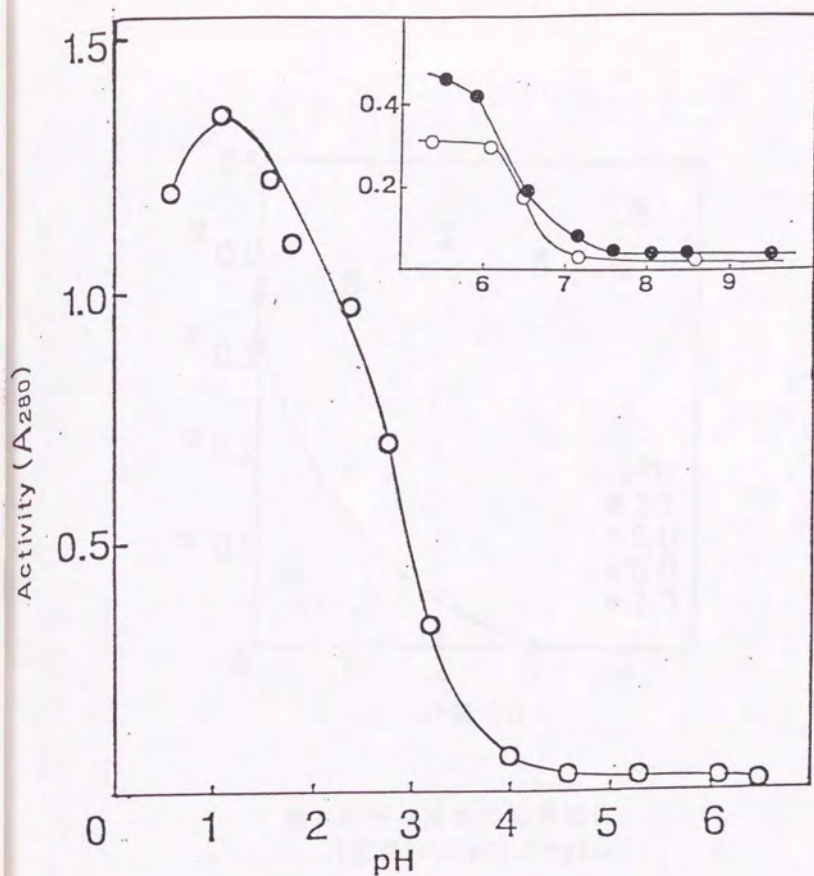


図2.7 酵素活性のpH依存性 (37°C, 30分)

○はヘモグロビンを基質としたときの酵素10 μ gあたりの活性を、枠内はそれぞれヘモグロビン (○)、カゼイン (●) を基質としたときの酵素100 μ gあたりの活性を表す。

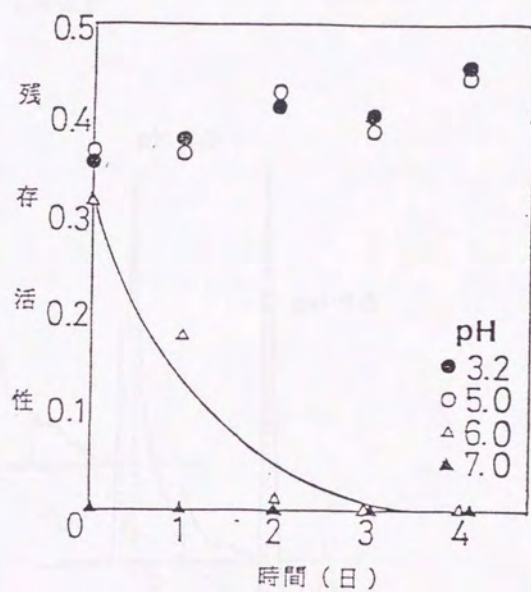


図2.8 残存活性の経時変化
(保温25°C; pH2.0でassay)

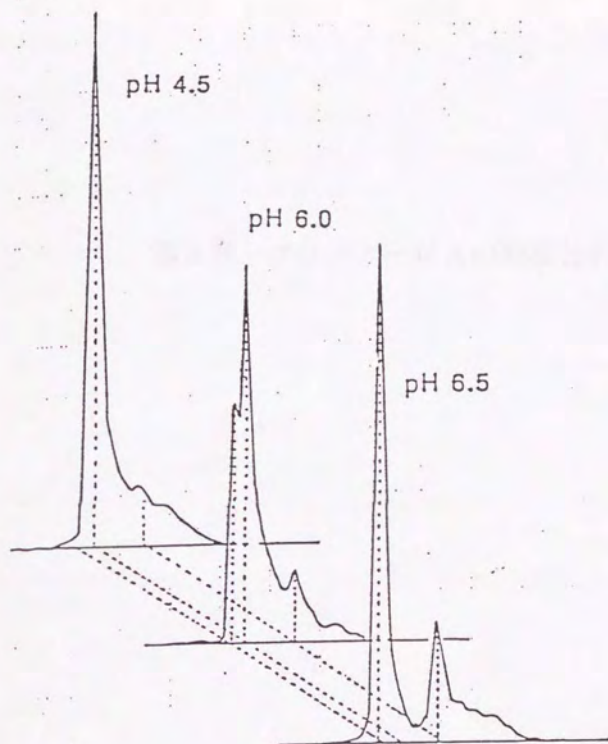


図 2.9 プロテアーゼ A の 2 本鎖の解離 (37°C)

第3章 プロテアーゼ A の熱変性の解析

3.1 序

本章ではプロテアーゼAの熱変性解析の結果について述べる。熱変性過程も pH 変性と同様 NMR、CD、酵素活性、ゲル濾過により解析した。これらはいずれも特定の現象（2次構造および3次構造の変化、2本鎖の結合解離状態）に注目してその変化を追っているが、可逆的な変性の場合はこれらのパラメータの温度依存性から種々の熱力学的関数の値を算出することができ、これにより蛋白質の構造安定性について定量的に議論することが出来る(Pace et al., 1989)。プロテアーゼAの熱変性は不可逆なため一定温度で測定したスペクトルを熱力学的に取り扱うことは出来ない。

一方 DSC（示差走査熱量測定）のデータ（熱容量）は分子全体の global な構造に関する情報を与える。変性においては、系の状態変化を大局的にとらえて熱力学的性質を議論しなければならないことから DSC はきわめて有効な手段である(Privalov, 1979 の総説参照)。但しその熱力学解析は、転移が可逆的で平衡状態におけるものが大部分である（不可逆過程の解析の例として Sochava et al., 1985, Hernandez-Arana et al., 1993）。

いずれにせよ従来の熱力学的解析は可逆過程におけるものが主で、不可逆的な変性を定量的に扱うには速度論によるものが多かった（可逆過程の場合にはランダムコイル状態からの構造形成を観察出来るというメリットもある）。この点を踏まえ、temperature-scanning kinetics (Fujita & Imahori, 1974; Fujita et al., 1979) と絶対反応速度論 (Glasstone, 1941; Jencks, 1969) により不可逆過程の系で熱力学的考察を行った。

3.2 方法

3.2.1 NMR 測定

1D-NMR スペクトルは 2.2.2 と同様の方法で測定した。

3.2.2 CD 測定

CD スペクトルは、2.2.3 と同様の方法で測定した。但し buffer はリン酸(pH 2.5) 及び酢酸(pH 4.5, 5.3, 5.5)を使用した。なお熱処理後の reversibility を調べる実験（図 3.5）では、 α_2 マクログロブリンの阻害実験も同時に行ったため 5 mM buffer(pH 5.5)中で行った。

3.2.3 酵素活性の測定

2.2.4 と同様にして測定した。pH を調整した 0.4 ml の基質溶液を 0.2 ml の酵素溶液に添加し、一定温度で 30 分反応させた。

3.2.4 ゲル濾過

ゲル濾過は Tosoh HPLC と TSK G3000PW カラムを用いて一定温度で行った。試料調製は 2.2.5 と同様である。溶出 buffer はクエン酸(pH 2.5)、酢酸(pH 4.5)及び MES(pH 5.3)を使用した。pH 調整後溶出時と同一温度で一定時間 incubate した後、10 μ l を注入した。

3.2.5 DSC

Privalov(Privalov et al., 1975)によって開発された DASM-4 示差走査熱量計を一部改良して使用した。試料濃度は 5 mM 酢酸 buffer(pH 4.8)中で 0.5 mg/ml から 5 mg/ml まで変化させた。走査速度は 0.125 K/min から 1 K/min まで変化させた。熱変性に伴うエンタルピーと熱容量変化は過剰熱容量曲線より計算した。(Velicelebi & Sturtevant, 1979; Takahashi & Sturtevant, 1981; Fukada et al., 1983)

3.2.6 データ解析

図 3.1 に熱容量曲線から求められるパラメータを示す。変性に伴う転移エンタルピー ΔH_d は(3.1)式で与えられる。

$$\Delta H_d = \int_{T_d}^{T_b} C_p dT \quad (3.1)$$

熱容量曲線から ΔH_d を求めるには図 3.1 のピーク面積を求めればよいが、蛋白質では変性前後の熱容量が変化するので、その間に転移曲線を描いてベースラインとする。

melting-profile method は、不可逆過程でかつ一定速度で昇温させながら測定した系において、速度論を用いることなくに反応の活性化エネルギーを見積もる方法である(Fujita et al., 1979)。出発点は以下の 2 式である(原論文と記号の定義が一部異なる)。N-D の反応を仮定し、

$$k = A \cdot \exp(-E/RT) \quad (3.2)$$

$$T(t) = T_c + v(t - t_0) \quad (3.3)$$

(3.2)は Arrhenius の式で E は活性化エネルギーである。また T は絶対温度、t は時

間を表す。今 N の量を規格化して c で表すと $c=[N]/([N]+[D])$ で、

$$dc/dt = -k[T(t)]c \quad (3.4)$$

となる。(3.2)(3.3)(3.4)式より

$$T_{1/2} = T_c + (1/\alpha) \ln(\alpha v \ln 2) \quad (3.5)$$

が得られる。但し $E = \alpha RT_c$, $A = \alpha T_c$ の関係がある。よって変性中点温度 $T_{1/2}$ を昇温速度 v の対数に対してプロットすれば、(3.5)式より T_c と α がわかり、故に E と A が求まる。

次に絶対反応速度論と上記活性化エネルギー E との関係について述べる。絶対反応速度論は次式で表される (Glasstone, 1941; Jencks, 1969)。

$$k = \frac{k_B T}{h} \exp\left(\frac{\Delta S^\ddagger}{R}\right) \exp\left(-\frac{\Delta H^\ddagger}{RT}\right) = \frac{k_B T}{h} \exp\left(-\frac{\Delta G^\ddagger}{RT}\right) \quad (3.6)$$

但し k_B はボルツマン定数、 h はプランク定数で、 ΔH^\ddagger , ΔS^\ddagger , ΔG^\ddagger はそれぞれ活性化エンタルピー、活性化エントロピー、活性化自由エネルギーである。一方 E と ΔH^\ddagger の間には

$$\Delta H^\ddagger = E - RT \quad (3.7)$$

の関係がある。従って E がわかれば (3.7) 式より ΔH^\ddagger がわかり、すると (3.6) 式から ΔS^\ddagger , ΔG^\ddagger が求まる。

3.3 結果

3.3.1 NMR スペクトル

図 3.2 に pH 4.5 で測定したプロテアーゼ A の NMR スペクトルを示す。57°C では高次構造を保っているが 67°C では変性していることがわかる。2.3.1 と同様にして最も高磁場側、最も低磁場側のシグナル 1、2 のピーク面積を測定温度に対してプロットした (図 3.3)。図 3.3 は 3 点の pH における熱変性曲線を示す。いずれも 50~55°C で変性し始めることを示している。

3.3.2 CD スペクトル

図 3.4 は pH 4.5、図 3.2 と同じ温度で測定した CD スペクトルである。37~57°C では構造が変化していないのに対し、67°C では構造が壊れかけている。pH 変性のときと同様、各 pH で測定した $[\theta]_{218}$, $[\theta]_{222}$, $[\theta]_{229}$ を測定温度に対してプロットした (図 3.5)。測定 pH は図 3.2 と同一である。各 pH とも 55~65°C で変性し始める。また 70°C で 20 分 incubate した後 10 分室温に放置し、37°C で測定したスペ

クトルを図 3.6 に示す。図 3.6 には上記試料を 4℃で 8 日間置いた後のスペクトルも同時に示す。8 日の間に構造が一部回復していることがわかる (80℃で変性させた場合構造は元に戻らなかった)。

3.3.3 酵素活性

図 3.7 に酵素活性の温度依存性を示す。測定 pH は図 3.3、図 3.4 と同一である。活性は 55~60℃で最大になることがわかる。

3.3.4 ゲル濾過

高温での変性も pH 変性と同様に 2 本鎖の解離を伴うかどうかを調べるためにゲル濾過を行った。図 3.8 に、pH 調整後 incubate する時間を変えて注入した HPLC のクロマトグラムを示す。時間とともに native 酵素由来のピークの減少と低分子ペプチドのピークの増加が観測され、プロテアーゼ A は高温で autolysis を起こしていることがわかる。なお 2 本鎖の解離は確認できなかった。

3.3.5 DSC

図 3.9 に種々の濃度で測定した熱容量曲線を、図 3.10 に種々の走査速度で測定した曲線を示す (図 3.10 は C_p に変換していない)。ピーク温度 T_p は 65~70℃で、 $\Delta C_p^0 = 0.1 \sim 0.15 \text{ J/K} \cdot \text{g}$ であり、変性に伴う転移エンタルピー ΔH_d は 370 kJ/mol となった。また変性過程が可逆的であるかどうか確かめるため、一度ピーク温度まで上げた試料を常温に戻して再び熱量測定したが、図 3.10 に破線で示すように reversibility は良くなかった。そこで temperature-scanning kinetics により、図 3.10 の T_p を走査速度 v の自然対数に対してプロットしたところ図 3.11 のように直線になった。このグラフから変性時の活性化エネルギー E と Arrhenius 式の頻度因子 A を求めると、 $E = 464 \text{ kJ/mol}$ 、 $A = 1.38 \times 10^{10} / \text{s}$ となった。またこのときの活性化エンタルピー ΔH^\ddagger 、活性化エントロピー ΔS^\ddagger 及び活性化自由エネルギー ΔG^\ddagger は、絶対反応速度論により 25℃においてそれぞれ、 $\Delta H^\ddagger = 462 \text{ kJ/mol}$ 、 $\Delta S^\ddagger = 1.09 \text{ kJ/K} \cdot \text{mol}$ 、 $\Delta G^\ddagger = 137 \text{ kJ/mol}$ であった。

3.4 考察

3.4.1 熱変性の概要

NMR、CD いずれの方法によってもプロテアーゼ A は 55~65℃で変性し始め (図

3.3, 3.5)、酵素活性は 55 ないし 60°C をピークに失活し始めた (図 3.7)。測定 pH、測定方法によっても若干の差異があるが、変性過程が不可逆で温度、濃度に依存するため定量的に説明することはできない。これら変性失活の開始温度は、HPLC でクロマトグラムの経時変化 (図 3.8) が見られ始める温度とほぼ一致することから、高温での変性失活は autolysis を伴うものであると考えられる。但しゲル濾過では 2 本鎖の解離を確認できず、変性時に 2 本鎖の解離をも伴っているかどうかはわからない。

CD による構造回復の実験から 70~75°C 付近に変性が不可逆になる温度があることがわかった (図 3.6)。またプロテアーゼ阻害剤である α_2 マクログロブリンの阻害実験によっても同様の結果を得た (データ不記載)。恒温槽の精度などのためそれ以上温度を限定することは出来なかったが、この温度は熱容量曲線の T_p よりやや高く、曲線のピークを越えると reversibility が失われると考えられる。また図 3.3、3.5 の熱変性曲線では、 T_p に対応する温度が中点温度になっていないのは、測定時間中 (約 30 分) の間でも変性が進行しているためだと考えられる。

図 3.9 で T_p は濃度依存性を示す。このことは会合や autolysis を伴うことを示唆している。上記 HPLC の経時変化の結果 (図 3.8) をも考え合わせると、変性した蛋白質が二次的に会合や autolysis を起こし、これにより変性過程が不可逆になると考えられる。

3.4.2 安定性と分子内相互作用

ΔC_p° は分子内に存在する疎水性相互作用の数 n ϕ と相関がある (Privalov, 1982)。 ΔC_p° を g 当たりで表したとき図 3.12 のような関係がある。 ΔC_p° の 80 % 以上が疎水性効果に帰着でき、変性において疎水性基の露出が ΔC_p° に大きく寄与している。通常 ΔC_p° は 0.3 J/K \cdot g 以上の値をとるが、これと比べるとプロテアーゼ A の場合は非常に小さく、疎水性効果が殆どないことになる。疎水性効果の大きさは溶媒を水から有機溶媒に移す実験によっても見積もることが出来る (Scultz & Schirmer, 1979) が、プロテアーゼ A の場合分離した軽鎖が水に溶けず DMSO に溶けることから、両鎖は疎水的に相互作用していることが示唆される。これは前述の ΔC_p° の値が小さいことと矛盾する。プロテアーゼ A で ΔC_p° の値を評価する場合は、過程が不可逆で変性後二次的に会合や autolysis を起こすため、転移後のベースラインがどれだけ物理的な意味をもつか、という問題がある。また疎水性効果は分子を自由エネルギー的に安定化するのではなく、疎水的性環境で水素結合をより強固にするのであり (Privalov, 1982)、一般に蛋白質の構造を安定化するのは疎水性環境の水素結合あるいは塩橋によると考えられている。プロテアーゼ A の分子内部

に水素結合や塩橋が存在するかどうかは不明であるが、塩橋については変性の活性化エントロピー ΔS^\ddagger が高くなつ pH に依存することにより確かめることが出来る (Glasstone et al., 1964)。 ΔS^\ddagger は他の蛋白質と比べて確かに高いが pH に依存するかどうかは不明である。今後の実験を要する。

3.4.3 不可逆過程の解析

従来の熱変性の解析は平衡状態におけるものか、完全な不可逆過程を速度論によって解析するものであった。melting-profile method も 3.2.6 で述べたように時間変化を温度変化に置き換えたという意味では速度論的解析の延長にある (その意味では変性中点温度は DSC による値でなくても、一定速度で昇温させながら測定したデータであればよい)。速度論的解析により得られる値は native 状態と遷移状態のエネルギー差であって変性状態との差ではないため、直接構造の安定性を表してはいない。但し同種類の反応においては、 ΔG^\ddagger と ΔG との間に比例関係が成り立つという、いわゆる LFER (Linear Free-Energy Relationship) を蛋白質の変性に適用すれば、活性化状態を通じて間接的に安定性を比較することが出来る。プロテアーゼ A の場合 ΔS^\ddagger が他の蛋白質と比べて高い。例えば Thermolysin では $E=338$ kJ/mol, $A=2.41 \times 10^4$ /s である (Fujita et al., 1979) (他の蛋白質については例えば Glasstone et al., 1964 参照)。このことはプロテアーゼ A の場合他の蛋白質よりも変性による自由度の増大が大きいことを意味し、それだけ native 状態では制限された堅い構造をとっていることを表している。

3.4.4 二状態遷移

上記の熱力学的解析は melting-profile method も含めて二状態遷移を仮定している。二状態遷移を実験的に確かめるには熱測定から得られた実測値 ΔH_{cal} と van't Hoff エンタルピー ΔH_{van} とが一致することを示せばよい (Plivalov & Khechinashvili, 1974)。プロテアーゼ A の場合上記の仮定は正しいものと考えられる。

3.4.5 解析方法の検討

プロテアーゼ A の場合 pH 変性の解析は変性時にプロトンの解離を伴うと考え、native 状態をプロトン化状態、変性状態を脱プロトン化状態として その間に 2.2 式の関係を保定した。一方熱変性の解析は二状態遷移と完全な不可逆性を仮定して活性化状態とのエネルギー差を考えた。Pfeil らは熱量測定と pH 滴定とを組み合わせ、変性状態及び未変性状態における熱力学関数を pH、温度の関数として表す相

図 (phase diagram) を作成した(Pfeil & Privalov, 1976a; 1976b)。こうすれば pH 変性、熱変性を同一の方法で解析でき、また得られた値から直接安定性を議論できる。



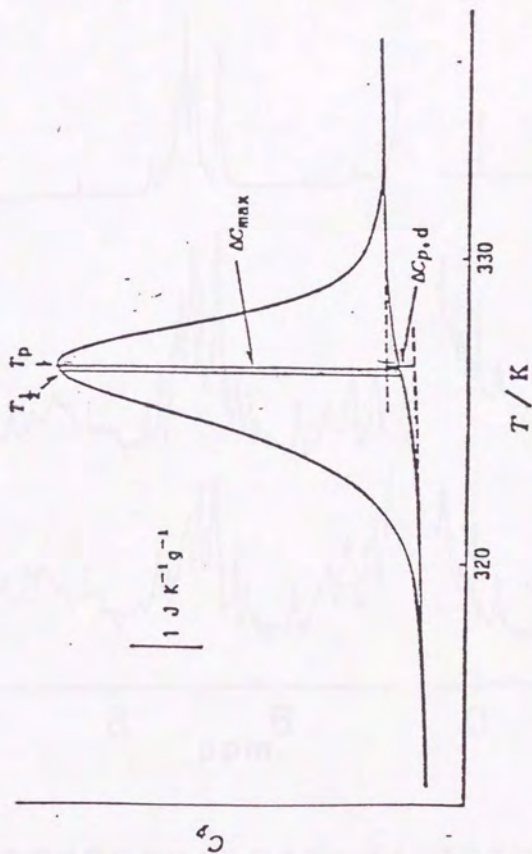


図 3.1 熱容量曲線から求められるパラメータ

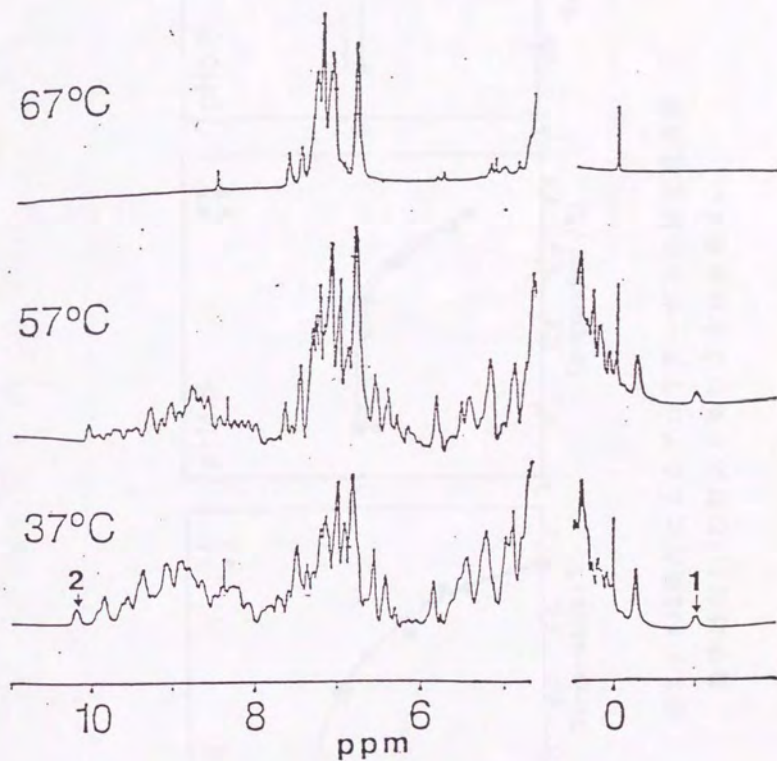


図3.2 各種温度におけるプロテアーゼAのNMRスペクトル

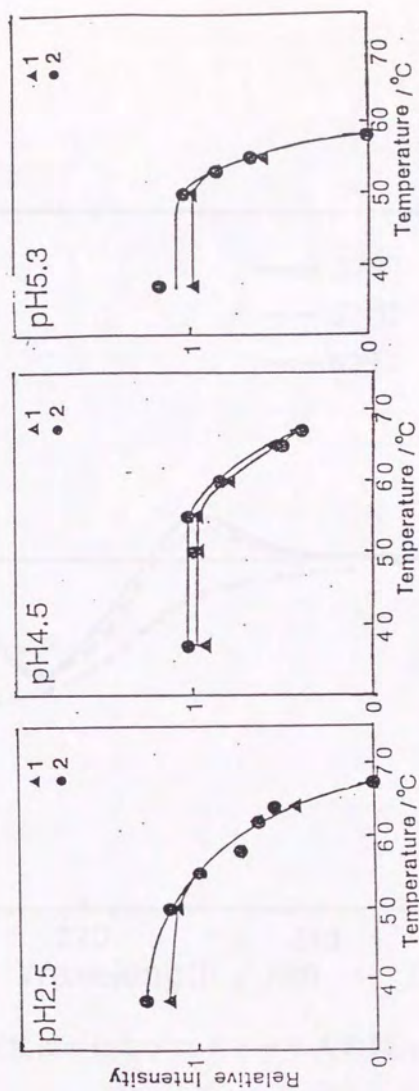


図 3.3 NMR測定によるプロテアーゼ A の熱変性曲線
 数字は図 3.2 の対応するシグナルを表す。

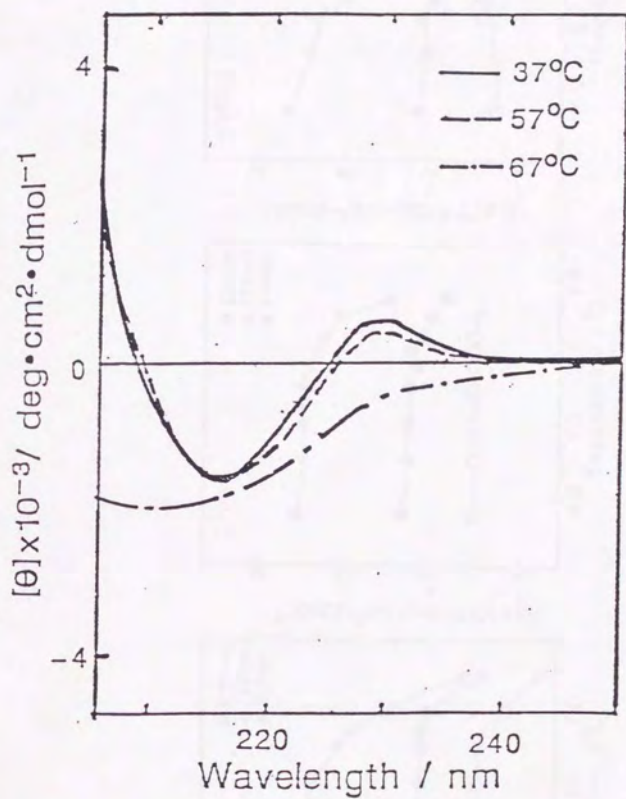


図3.4 各種温度におけるプロテアーゼAのCDスペクトル

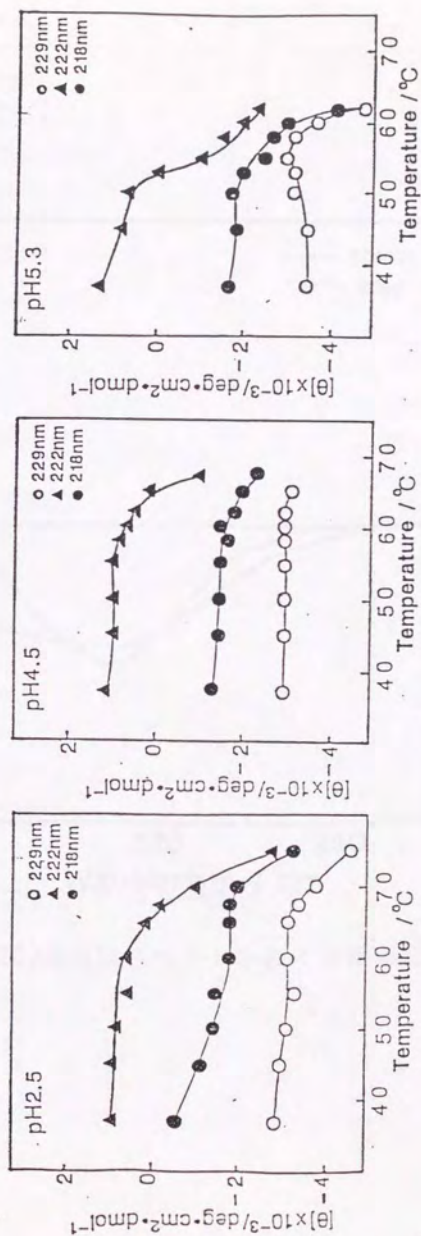


図 3.5 CD測定によるブローペアーゼ A の熱変性曲線

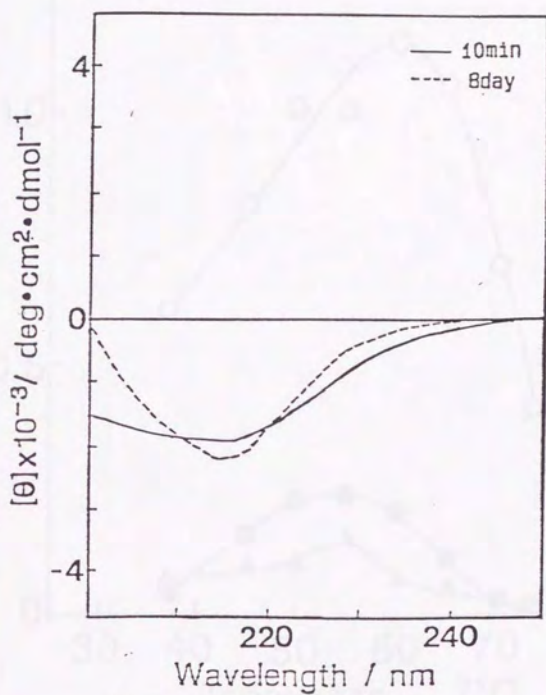


図3.6 熱処理(70°C)後のCDスペクトルとその経時変化 (pH5.5, 37°C)

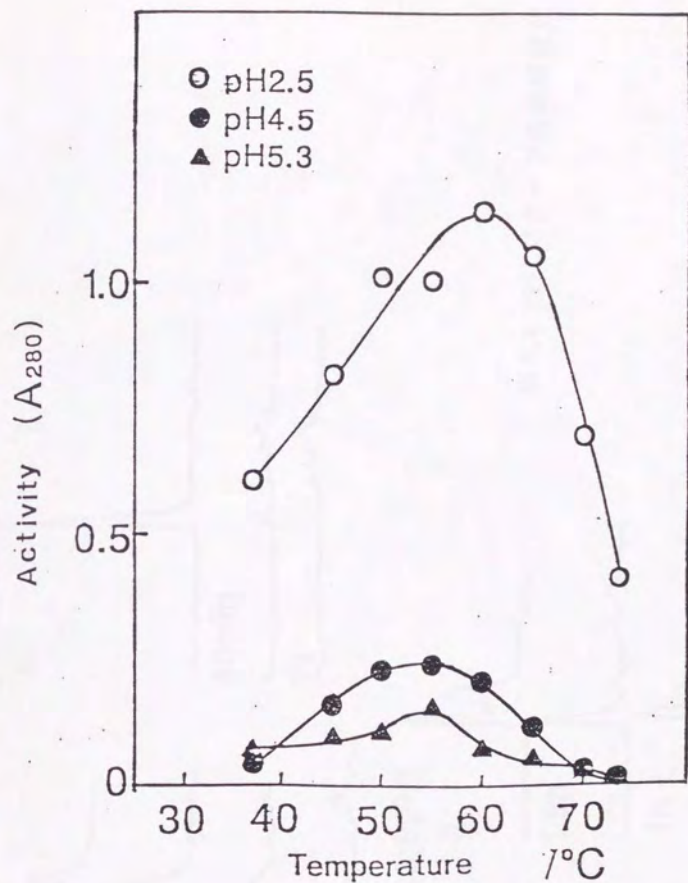


図3.7 酵素活性の温度依存性（示されたpHで30°C反応）

ヘモグロビンを基質としたときの酵素10 μ gあたりの活性を示す。

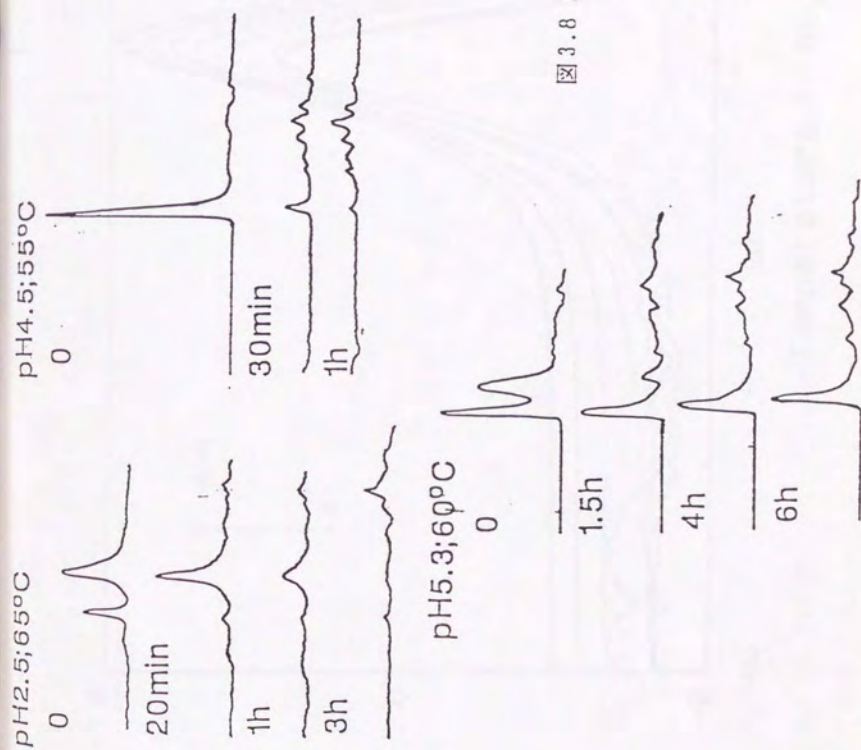


図3.8 HPLCパターンの経時変化

h.r. = 1 K/min

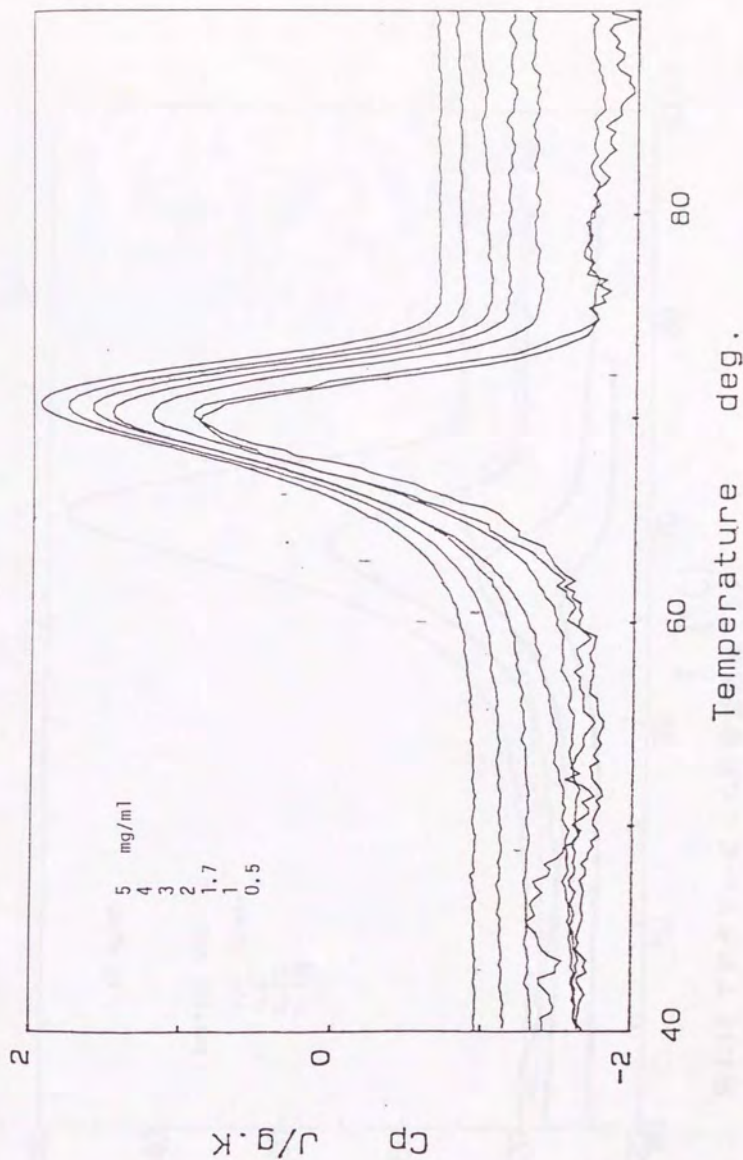


図3.9 プロテア-ゼAの熱容量曲線 (1)

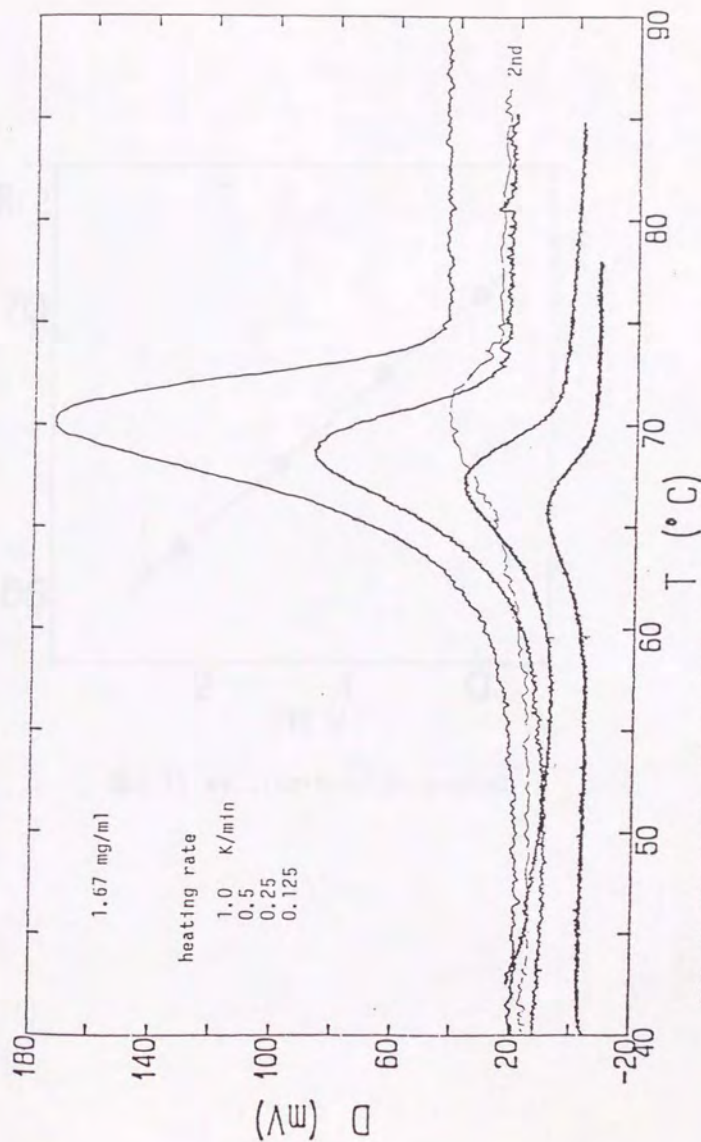
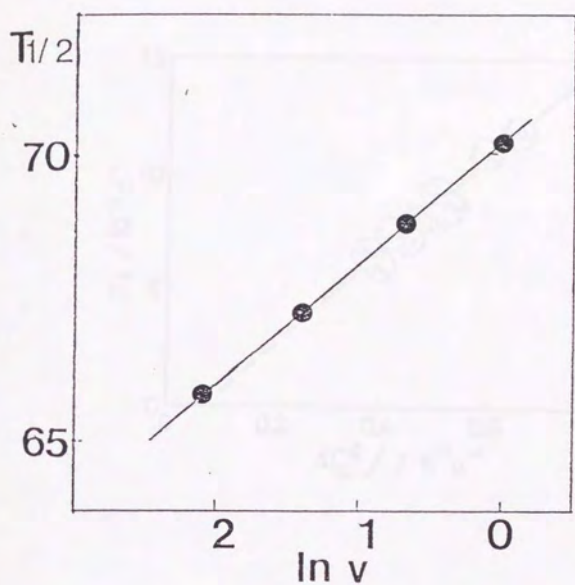


図3.10 ブロプロアミドAの熱容量曲線(2)

縦軸の値は C_p に直していない。reversibilityを調べる実験(破線と2ndで表示)は1.0 K/minで行った。



3.11 melting-profile method

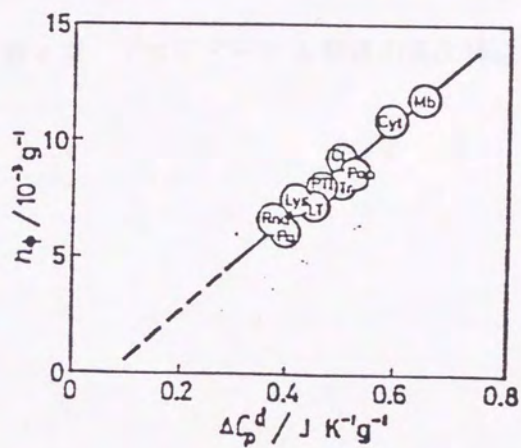


図3.12 変性の熱容量差 ΔC_p^d と分子内疎水性相互作用の数 n_ϕ との相関
Privalov (1979)による

第4章. プロテアーゼA 軽鎖の高次構造解析

4.1 序

2章で述べたように pH 変性の解析結果により、プロテアーゼ A は中性 pH で変性するが、その際 2 本鎖の解離を伴うことがわかった。また一旦分離した両鎖を混ぜ合わせても活性は回復しない。これは、両鎖が正しく結合して存在していることがコンフォメーションの保持、活性の発現に不可欠であることを示している。遊離状態で各鎖は特定の規則構造をもちうるのか、またもつとすれば native コンフォメーション中の構造と異なるのかどうかを確かめるために、ここでは軽鎖に注目し、単離した軽鎖の 2D-NMR を測定して遊離状態の構造解析を行った。軽鎖は図 4.6 に示す通り 39 アミノ酸残基から成る分子量 4,000 のペプチドであり、Arg、Gln、Cys、His を含まない。現在分子量 10,000 以下の蛋白質ならば 2D-NMR だけでも立体構造の解明まで十分可能であり、また低分子ペプチドは結晶化しにくいこともあって、近年多くのペプチドの立体構造が NMR を用いて決定されている (Wüthrich, 1986)。本章では 2D-NMR による軽鎖の立体構造解析について述べる。なお native コンフォメーション中との比較を行うためにはプロテアーゼ A の立体構造決定を待たなければならない。

4.2 方法

4.2.1 軽鎖の調製

軽鎖は中性 pH で 2 本鎖を分離することにより精製した。プロテアーゼ A 粉末を 0.4 M 炭酸アンモニウム (pH 8.0) に溶かし、Sephacryl S-200 (3.5 x 80 cm) カラムにかけた。0.1M 酢酸アンモニウム溶液 (pH 6.9) で溶出して軽鎖を含む画分を得た (SDS-PAGE により確認)。さらに Applied Biosystems 151A Separation System を用いて HPLC により精製した。C8 カラムを用い、0.1 % トリフルオロ酢酸 (TFA) 中で 0~50 % のアセトニトリル濃度勾配をかけて溶出した (流速 2.4 ml/min)。溶出 pH は 4.2 で、凍結乾燥した後、試料の一部をアミノ酸組成分析にかけて純度を確認した (Applied Biosystems derivatizer-analyzer (420A/130A-920A) を使用)。試料は NMR 測定前に溶媒に溶かした。

4.2.2 2D-NMR 測定

精製した軽鎖は pH を酸性に戻しても NaCl 溶液や 10% 酢酸には高濃度では溶けなかったため、99.96 % DMSO- d_6 中で測定した。Bruker AM-400 及び AMX-600

分光計を用い、7 mM, 25 °C で、DQF-COSY(Rance et al., 1983), E.COSY, Relayed COSY(Wagner, 1983), TOCSY(HOHAHA; Bax & Davis, 1985b), NOESY(Jeener et al., 1979), ROESY(Bax & Davis, 1985a)を測定した。スペクトルの全領域の中心付近に周波数中心を置き、TPPI 法(Marion et al., 1983)を用いて phase sensitive モードで観測した。TOCSY スペクトルは MLEV17 パルス系列を用いて混合時間 45ms で測定した。NOESY スペクトルは幾つかの混合時間(80~200 ms)で測定した。ROESY はスピンロック時間 200ms で測定した。スペクトル幅 7000 Hz(400 MHz) または 10000 Hz(600 MHz) で 32 ~ 64 回積算し、 $[2k(t_2) \times 512(t_1)]$ のデータを観測した。t1 方向に 1k までゼロ・フィリングを行った後フーリエ変換した。化学シフトは Tetramethylsilane(TMS)のシグナルを基準にした。

4.2.3 スペクトルの解析

2D-NMR からの高次構造決定は次のステップを順次踏むことによりなされる。1)TOCSY、DQF-COSY を用いてスピン系の同定によりシグナルを各アミノ酸の種類にタイプ分けする(図 4.2 参照)。2)同定したアミノ酸残基を NOESY を用いて 1 次構造に沿って並べていく。これにより全シグナルが帰属される(図 4.1 参照)。3)遠距離の NOE の情報をもとに、distance geometry(Braun & Go, 1985)や restrained molecular dynamics(Nigles et al., 1988)等の計算アルゴリズムと組み合わせで立体構造を求める。1)、2)の過程は連鎖帰属(sequential assignment)と呼ばれる(Wüthrich, 1986)。3)の立体構造計算には XPLOR、DIANA(Güntert et al., 1991)など種々のプログラムが使用されている。1)については 4.3.2 で、2)については 4.3.3 で述べる。3)の過程は distance geometry 法により次節の通り行った。

4.2.4 立体構造計算

計算は全て Silicon Graphics 社製 IRIS 4D/35 および Indigo Elan ワークステーションにて行った。NOE ピーク強度は NMRZ (New Methods Research 社)あるいは Felix (Biosym Technologies 社)により算出した。Distance Geometry 計算には蛋白質工学研究所の EMBOSS(Nakai et al., 1993)プログラム(ver. 2 および ver.4)を使用した。Restrained molecular dynamics 計算はソフトウェア NMRgraf(Molecular Simulations 社)の default setting routine(scheme 1)を用いて行った。

4.3 結果と考察

4.3.1 スペクトルの特徴

図 4.3 は軽鎖の TOCSY スペクトルの全領域を示している。11 ppm のシグナルを除き、全シグナルは 9.5~0.5 ppm の範囲に分布している。プロテアーゼ A のスペクトルが -1.5 ppm まで分布しているのに比べると、特に高磁場側の分布の仕方に特徴がある。なお 11 ppm のシグナルは軽鎖中に唯一存在する Trp の側鎖 1 位のプロトンであることが帰属により明らかになった。cross peak は 2 位のプロトンとのカップリングを表している (2 位のプロトンの化学シフト 7.25 ppm)。

図 4.4 は図 4.3 の TOCSY スペクトル及び DQF-COSY スペクトルの fingerprint 領域 (アミドプロトンと α プロトンとの cross peak が観測される領域) を示す。両スペクトルとも、Pro を除く 38 個の cross peak が全て観測された。

図 4.5 は NOESY のアミドプロトンの領域を示す。アミドプロトン間に NOE が観測されることから、軽鎖は DMSO 中でランダムコイルではなく特定の規則構造をとっていると考えられる。

4.3.2 シグナルのアミノ酸タイプ決定

まずシグナルをスピンス系により各アミノ酸にタイプ分けすることから始めた。図 4.1 に各アミノ酸残基のスピンス系と 2D-NMR スペクトル上での connectivity を示す。プロテアーゼ A は図 4.6 に示すとおり 39 残基から成るが、このうち芳香族アミノ酸は Phe が 1 個、Trp が 1 個、Tyr が 3 個あり、His は含まれていないのでまず芳香族側鎖の帰属から始めた。図 4.6 に芳香族側鎖プロトンのスペクトルを示す。図 4.1 の Trp 側鎖のスピンス系と比較することにより、Trp7 の側鎖は図 4.6 のように帰属できた。同様にしてランダムコイルの化学シフト値とスピンス系を手がかりにして Phe24 と Tyr1, II, III を帰属した (ローマ数字は残基番号まで同定できないことを示す)。 β プロトンとの NOE ピークから主鎖のスピンス系につなぐことにより、芳香族アミノ酸 4 個のシグナルを同定することが出来た。また図 4.6 で N6 を付した NOESY、TOCSY に観測される cross peak は Asn、Gln、Lys、Arg の側鎖 NH と考えられるが、軽鎖には Arg、Gln がなく、Lys は対角ピークになる可能性が高いため Asn (6 番目に唯一存在する) と帰属した。これは後に Asn6 の α プロトンと Trp7 のアミドプロトンとの間に NOE ピークが出ることにより確認された。

今決定したアミノ酸の主鎖はいずれも AMX スピンス系を構成しており (図 4.2)、側鎖のスピンス系とは β プロトンと側鎖プロトンとの NOE ピークによりつながる。図 4.7 の下に先程の図 4.6 の TOCSY スペクトルを示す。各 cross peak の化学シフトを上に通っていくと、対応する 2 個の β メチレンプロトンの化学シフトの位置に NOE ピークが観測される。なお NOESY スペクトルで W7' を付した 2 個の cross

peak は $\omega 2$ (横軸の化学シフト) が 7.25 ppm で、側鎖 2 位のプロトン (4.3.1 参照) と 2 個の β プロトンとの cross peak である。同様に N6' は主鎖アミドプロトンと β プロトンとの cross peak と考えられ、主鎖の帰属の際の手がかりになる。

β プロトンの位置を手がかりに対応する主鎖 AMX スピン系を決定する。図 4.8 の左に図 4.7 と同じ NOESY スペクトルを、右側にスピン系決定のための TOCSY スペクトルを示す。主鎖スピン系との対応がつくと α プロトンの化学シフトがわかり、アミド- β 間の cross peak も参照することにより、図 4.9 の真中の TOCSY スペクトルに示すように fingerprint 領域の帰属が出来た (Tyr については残基番号が未定なため特定の残基までは帰属できなかった)。そして Asn6 の α プロトンと Trp7 のアミドプロトンとの間には NOE ピークが観測され (左図)、今までの手順の正しいことが確認された。以上で Asn6, Trp7, Phe24 と 3 個存在する Tyr のうち 1 個の同定が出来た。

次に Ala, Val, Ile, Leu, Lys を以下の手順で決定した (図 4.10)。Ala3 個、Val4 個、Ile1 個 (Ile13)、Leu1 個 (Leu12) は TOCSY でアミド-メチル間の cross peak とスピン系の特徴 (図 4.2) を手がかりに、Lys1 個 (Lys19) はスピン系の特徴と化学シフトの値から図 4.10 のように決定した。

Thr のシグナルは図 4.2 のように特徴的な出方をするので他の残基と区別しやすく、図 4.11 に示すように 3 個中 2 個を同定した。以上で Asn, Trp, Phe, Tyr, Ala, Val, Ile, Leu, Lys, Thr の α プロトンの化学シフトがわかった。8 個の Ser, 7 個の Gly の cross peak はかたまって存在するため、個々の帰属がつけられず残りの Glu3 個、Asp1 個とともに未同定のまま、NOE ピークを手がかりに隣接残基間の連鎖帰属に入った。

4.3.3 シグナルの連鎖帰属

アミドプロトンと α プロトンとの cross peak のうち既に残基番号まで決定している Trp7 と Phe24 を出発点として、 $d\alpha-N$ の NOE ピークをひろっていくことにより帰属を行った。結果を図 4.12 のスペクトル中に示す。図中・は NOESY で対応する位置に cross peak が存在することを意味する。他の NOE ピークも参照しながら現在図 4.12 の下のアミノ酸配列に下線で示すように Glu1 から Val26 まで帰属し、Pro27 で中断した後、今度は Ala31 を手がかりに Ser28 から Ser32 まで帰属を行った。Ser32 以降は配列が GSSGSSG と続くためシグナルが重なっていると考えられる。この領域は Gly 残基に富むが、スペクトル上 Gly 残基のシグナルに見落とれないことを TQF-COSY (Boyd et al., 1985) の測定により確認した。表 4.1 に帰属したシグナルの化学シフト値を示す。

4.3.4 距離情報の抽出と立体構造計算

化学シフト表をもとに NOESY スペクトル上の全 cross peak を帰属した。NOE 強度は NOESY スペクトルのピーク強度を NMRZ のピークピッキングルーチンを用いて読み取った。芳香族アミノ酸側鎖の 2 位と 3 位（あるいは 5 位と 6 位）のプロトン間の NOE 強度を基準にして、帰属した各 NOE 強度を強、中、弱の 3 段階に分類し、各プロトン対の距離の上限として各々 5, 4, 3 Å を与えた（下限値はファンデルワールス半径の和）。EMBOSS(ver.2)を使用した際には pseudoatom 化に伴う距離の補正を行った(Wütrich, 1986)。スピン拡散の影響がないことを確認するため種々の混合時間で測定した NOESY スペクトルから NOE 強度を算出して比較した。スピン結合定数 $^3J_{\text{HNa}}$ は、E.COSY および DQF-COSY 上の cross peak から読み取った。分解能を上げるため E.COSY スペクトルは $4k(\omega_2) \times 2k(\omega_1)$ のスペクトルを得た後、1D スライスを逆フーリエ変換後 32k までゼロフィリングして再度フーリエ変換した。スピン結合定数が 10 Hz 以上のものについては Karplus の関係式より二面角 ϕ に関して $-140^\circ \leq \phi \leq -100^\circ$ の距離制限を与えた(Wütrich, 1986)。以上により近位の NOE41 個、中位の NOE13 個、残基内 NOE1 個、二面角制限 19 個の距離制限を抽出した。なお ROESY や混合時間を変えて NOESY を測定しても、cross peak の数は増えなかった。図 4.13 に近位、中位の NOE connectivities と二面角制限について示す。

抽出した距離情報をもとに Distance Geometry 計算を行った。計算時のパラメータは基本的にはデフォルト値を用いたが、一部の計算は minimization の回数を上げて行った。400 回構造計算を行ったところ 84 個の収束した構造が得られた。これらの構造を初期構造として restrained molecular dynamics 計算を行った(EMBOSS ver.2 により得た構造については水素原子を付加したものを初期構造とした)。図 4.14 に NMRgraf による計算スキームを示す。NMR cycle=200, n(step 数)=50 で計算を行った。得られた構造は主鎖間で互いに比較的良く一致し、図 4.15 に示すように β ストランドに富んでいた。なお C 末端は距離情報がないため構造は決まらなかった。この領域は Gly, Ser から成り(GSSGSSY)、一般には規則構造を取っていないことも考えられる(例えば 7 章で述べる RNase T1 の Gly70~Ser72 など)。シグナルの重なるの可能性を検討するため、軽鎖単独の同種核 3 次元 NMR を測定し、現在帰属を行っている。また構造を精密化するため立体特異的帰属を行う予定である。

表4.1 軽鎖プロトンの化学シフト (ppm)

	NH	C α H	C β H	Others
Glu1	7.92	4.50	1.93,1.96	C γ H 2.33,2.33
Glu2	8.40	4.37	1.82,1.86	C γ H 2.26,2.26
Tyr3	8.22	4.60	2.77,3.04	C2,6H 7.10 C3,5H 6.71
Ser4	8.36	4.45	3.74,3.74	
Ser5	8.37	4.46	3.74,3.74	
Asn6	8.26	4.64	2.52,2.62	N γ H 7.06,7.42
Trp7	8.15	4.51	3.05,3.28	N1H 10.85 C2H 7.25 C4H 7.62 C5H 7.06 C6H 7.14 C7H 7.41
Ala8	8.07	4.25	1.28	
Gly9	8.23	3.66,3.66		
Ala10	8.16	4.35	1.33	
Val11	7.74	4.31	2.10,2.10	C γ H 0.91,0.94
Leu12	8.03	4.31	1.78,1.78	C γ H 1.65 C δ H 0.89,0.93
Ile13	7.84	4.26	1.80	C γ H 1.16,1.51 C γ α H 0.91 C δ H 0.87
Gly14	7.94	3.77,3.77		
Asp15	8.15	4.33	1.77,2.20	
Gly16	8.30	3.85,3.85		
Tyr17	8.02	4.51	2.50,2.78	C2,6H 7.08 C3,5H 6.69
Thr18	8.96	4.09	4.30	C γ H 1.13
Lys19	8.07	4.45	1.79,1.79	C γ H 1.41,1.41 C δ H 1.59,1.59 C ϵ H2.85,2.85
Val20	7.97	4.22	2.03	C γ H 0.90,0.90
Thr21	8.07	4.36	4.05	C γ H 1.09
Gly22	8.23	3.85,3.85		
Glu23	7.94	4.32	2.20,2.20	C γ H 1.88,1.91
Phe24	8.16	4.69	2.90,3.15	C2,6H 7.25 C3,5H 7.33 C4H 7.31
Thr25	8.06	4.35	4.05	C γ H 1.09
Val26	7.84	4.46	2.06,2.06	C γ H 0.97,1.02
Pro27	---	4.47	1.93,1.93	C γ H 2.13,2.13 C δ H3.65,3.80
Ser28	7.62	4.30	4.09,4.09	
Val29	8.00	4.47	2.06	C γ H 0.97,1.02
Ser30	8.11	4.41	3.70,3.70	
Ala31	7.94	4.44	1.27	
Gly32	8.41	3.79,3.79		
Ser33	8.07	4.45	3.67	
Ser34	8.07	4.45	3.67	
Gly35	8.41	3.79,3.79		
Ser36	8.07	4.45	3.67	
Ser37	8.07	4.45	3.67	
Gly38	8.41	3.79,3.79		
Tyr39	7.64	4.25	2.79,3.01	C2,6H 7.10 C3,5H 6.71

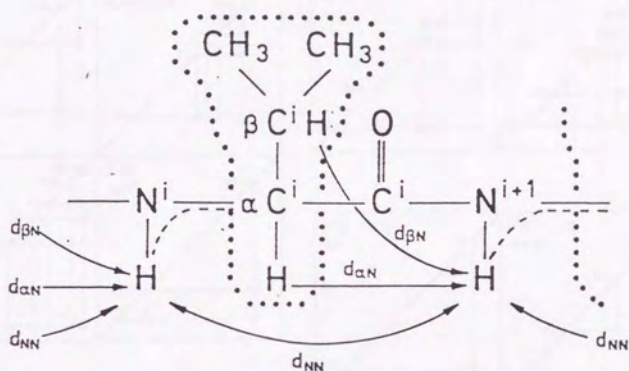


図4.1 ポリペプチド鎖の一部

点線内のプロトンは図4.2に示すように特徴的なスピン系を構成している。

破線は αH と NH とのスピン結合を、矢印は残基間のNOEを表す。

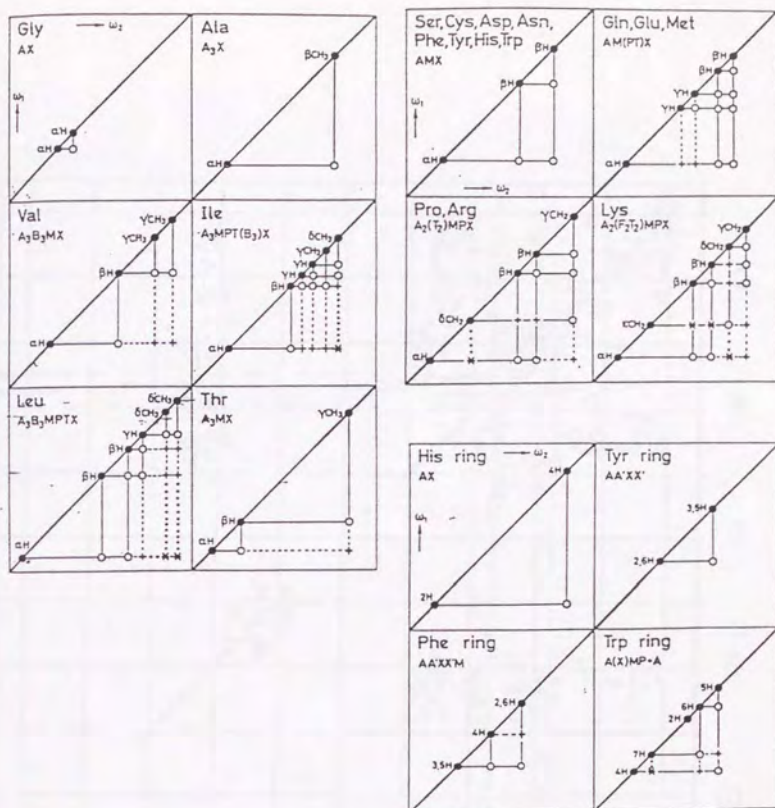


図4.2 アミノ酸のスピン系とシグナルのconnectivity

●は対角ピークを表す。DQF-COSYでは○が、HOHAHAでは全てのcross peakが観測される。

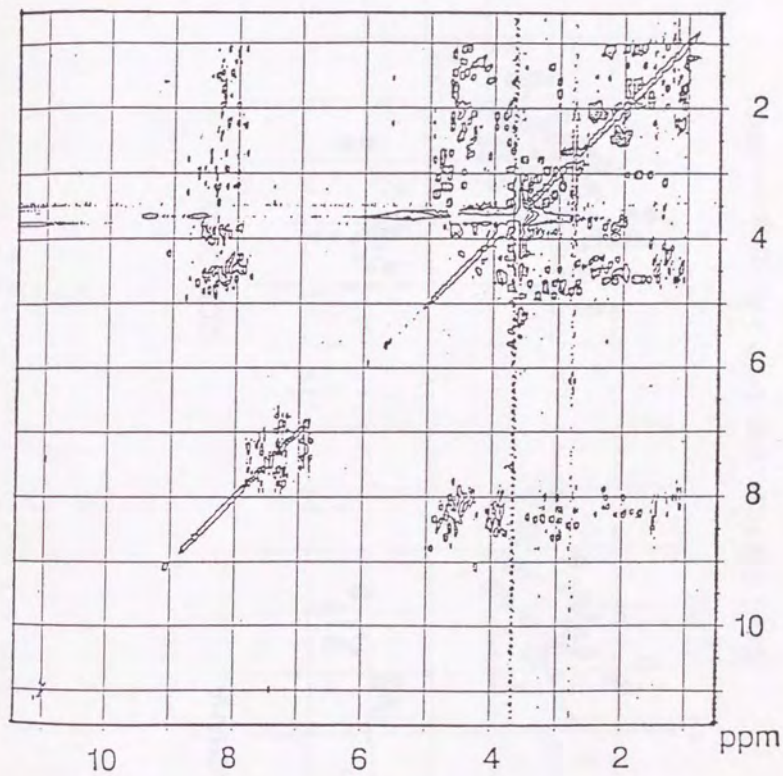


図4.3 軽鎖のHOHAHAスペクトル

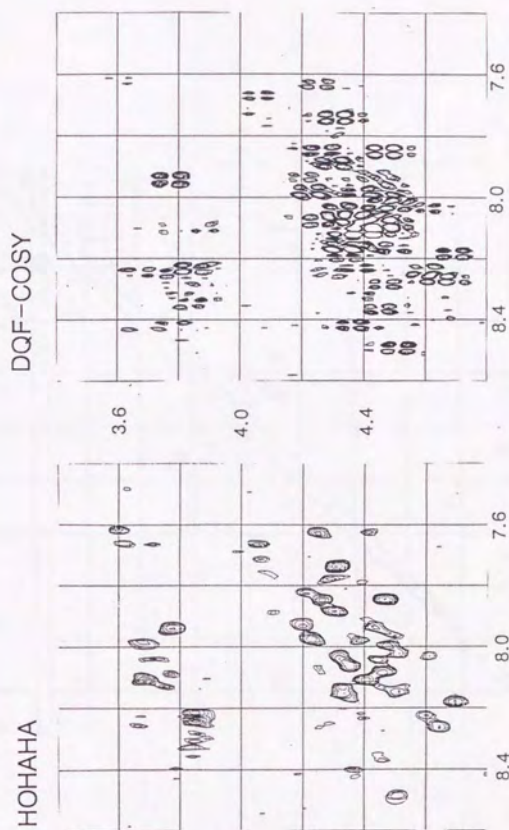


図4.4 軽鎖の2D-NMRスペクトル (fingerprint領域)

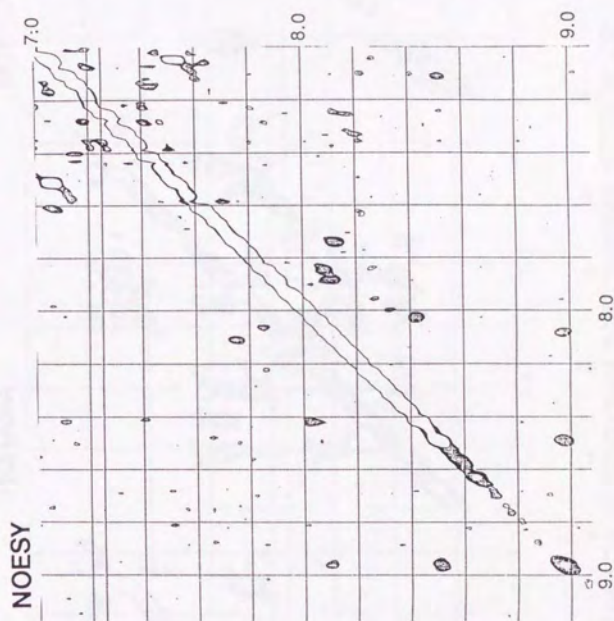
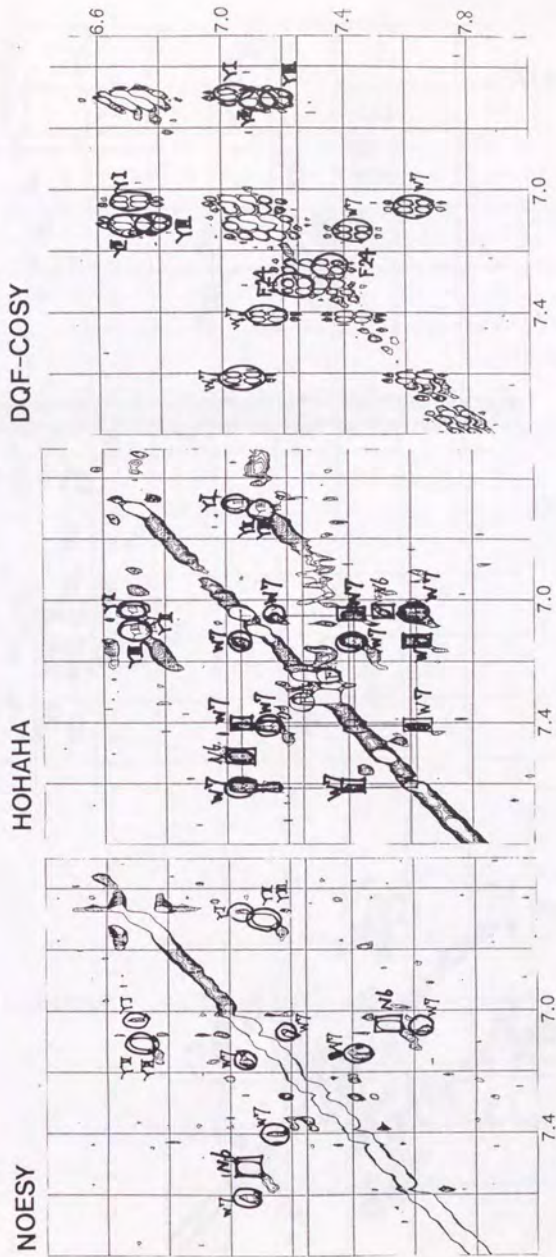


図4.5 軽鎖のNOESYスペクトル (アミド領域)



EEYSSNWAGA VLIGDGYTKV TGEFTVPSVS AGSSGSSGY

図4.6 軽鎖の2D-NMRスペクトル（芳香族領域）とアミノ酸配列

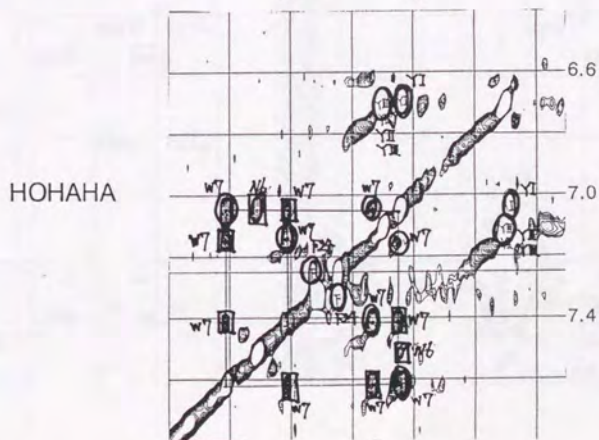
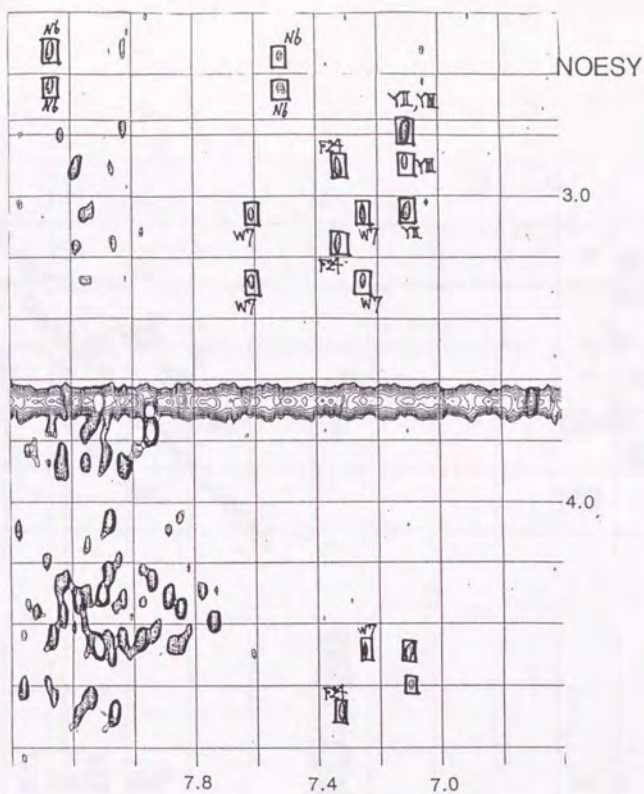
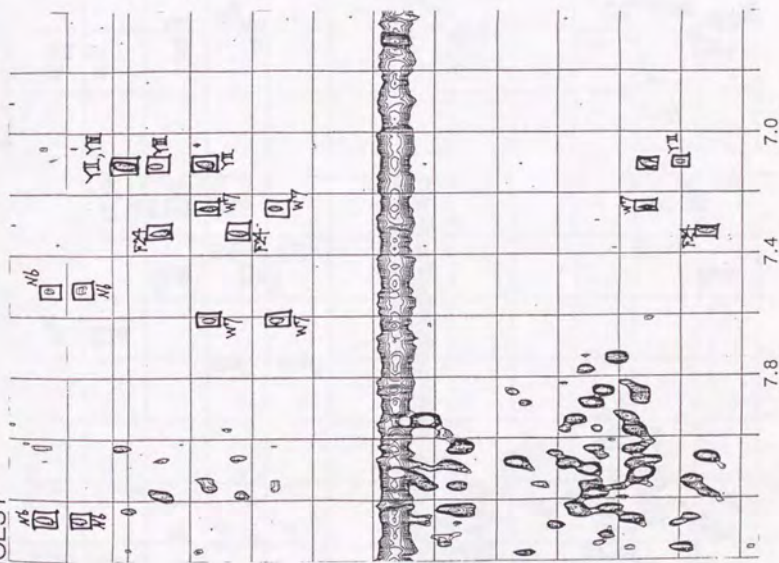


図4.7 芳香族側鎖と β プロトンとのつながり

NOESY



HOHAHA

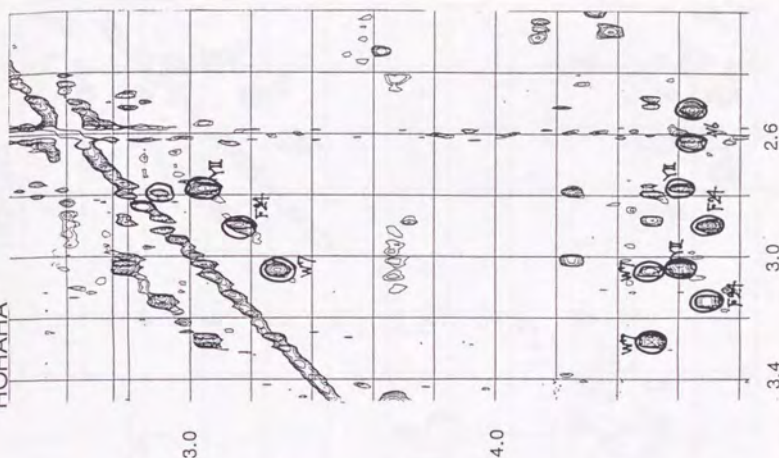


図4.8 芳香族主鎖AMXスピン系の同定

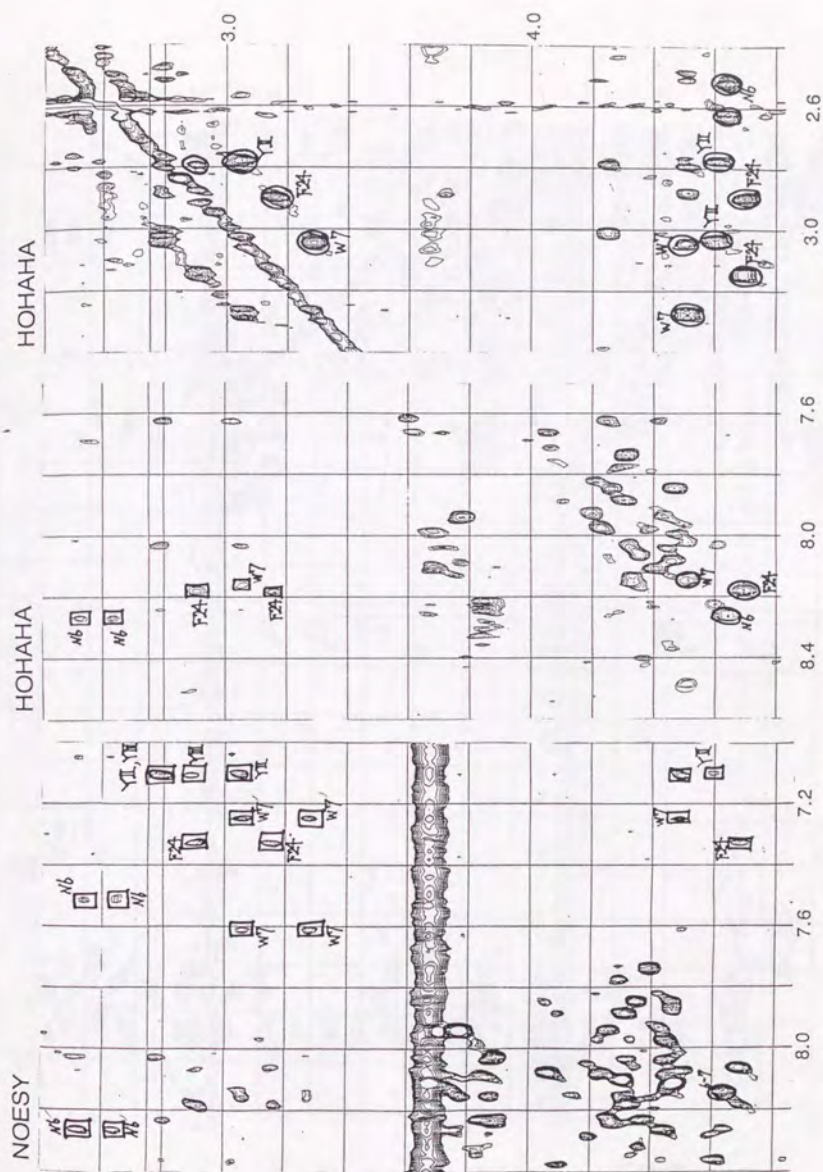


図4.9 芳香族アミノ酸の同定

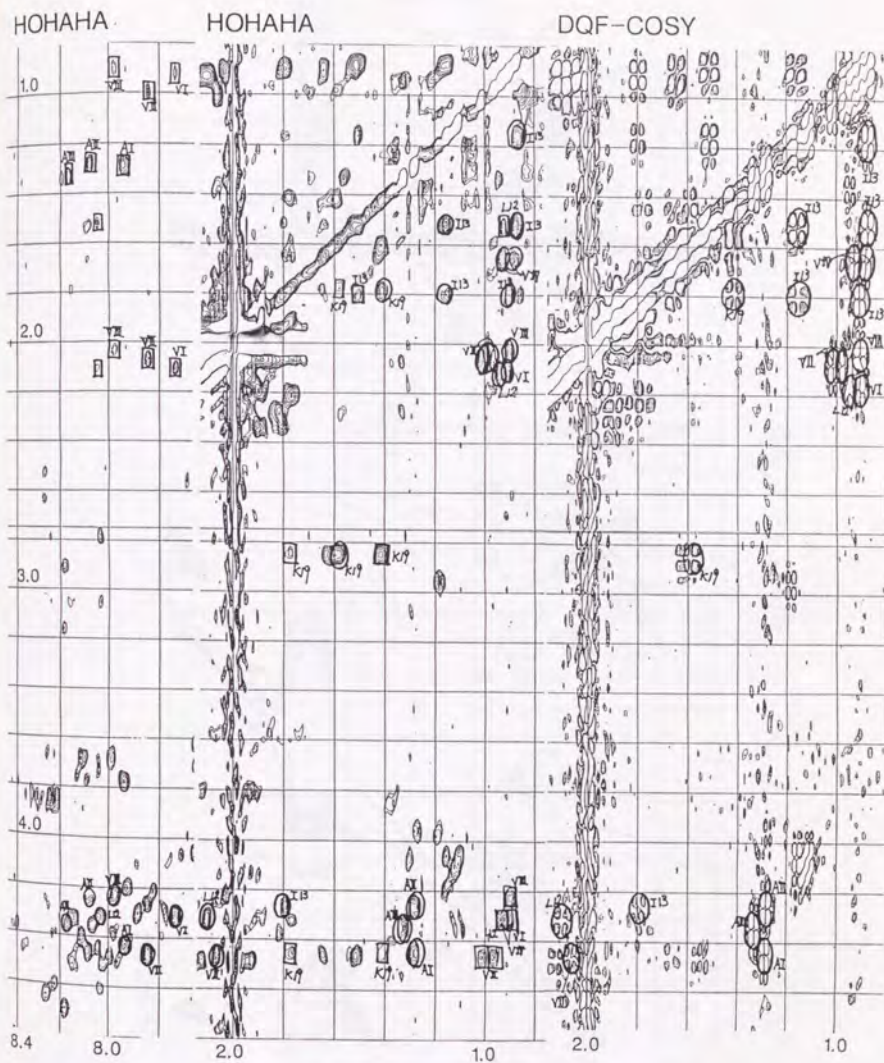


図4.10 Ala, Val, Ile, Leu, Lysの帰属

HOHAHA

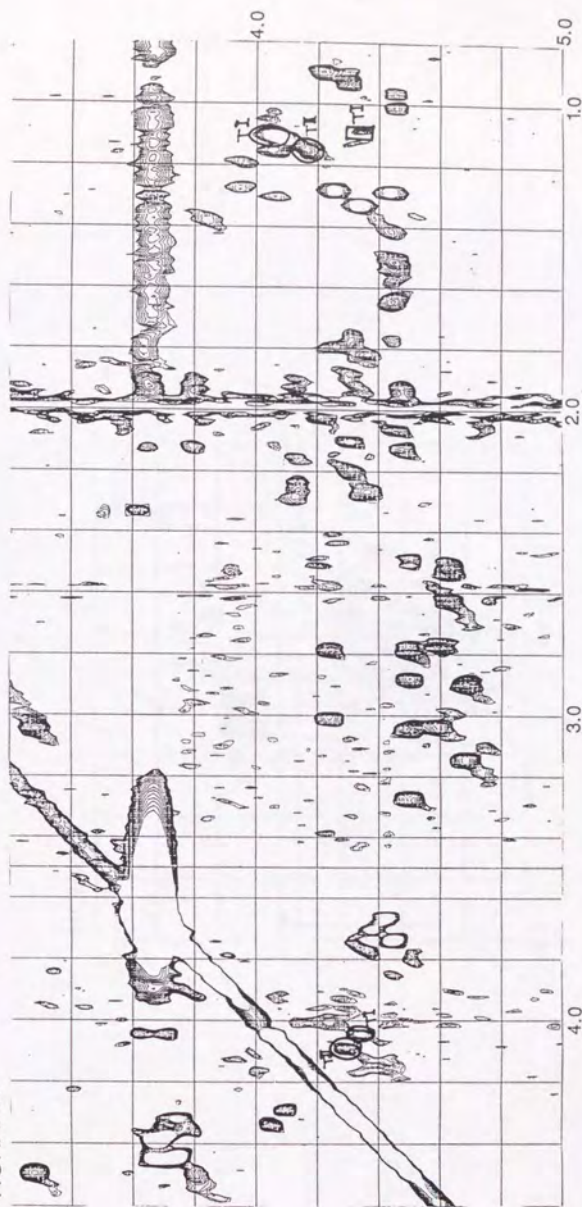
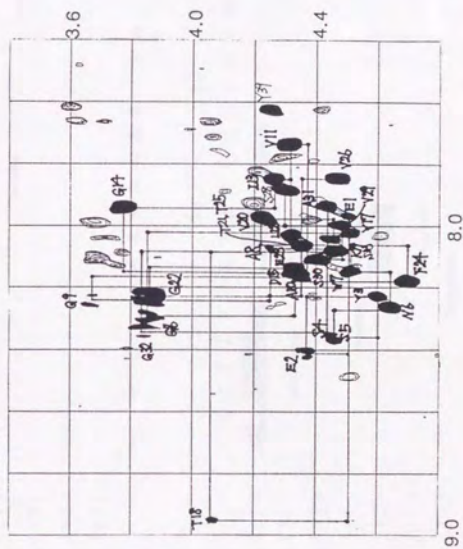


図4.11 Thrの帰属

HOHAHA



EEYSSNWAGA VLIGDGYTKV TGEFTVPSVS AGSSGSSGY

図4.12 軽鎖スペクトルの連鎖帰属

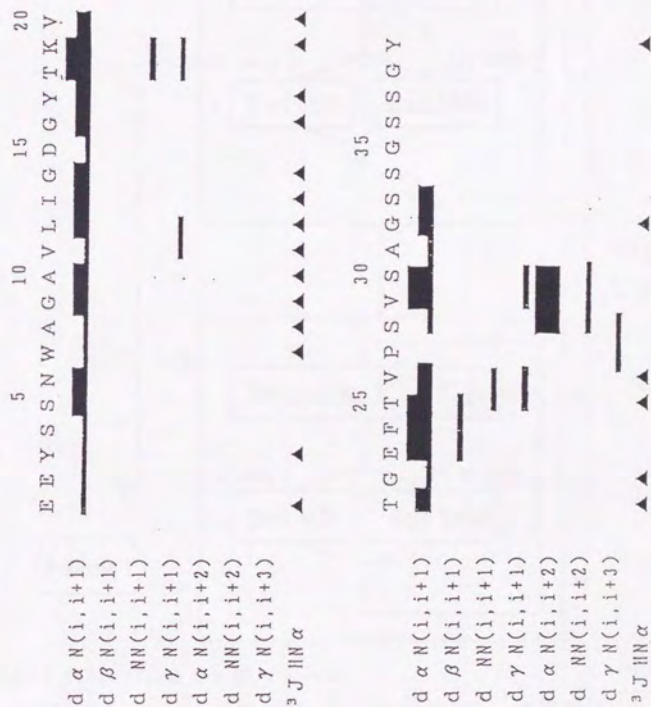


図 4.13 プロテアーゼ A 軽鎖の NOE と二面角制限 NOE 強度を線の太さで, $^3J_{HN\alpha} > 10$ Hz の残基を▲で示す

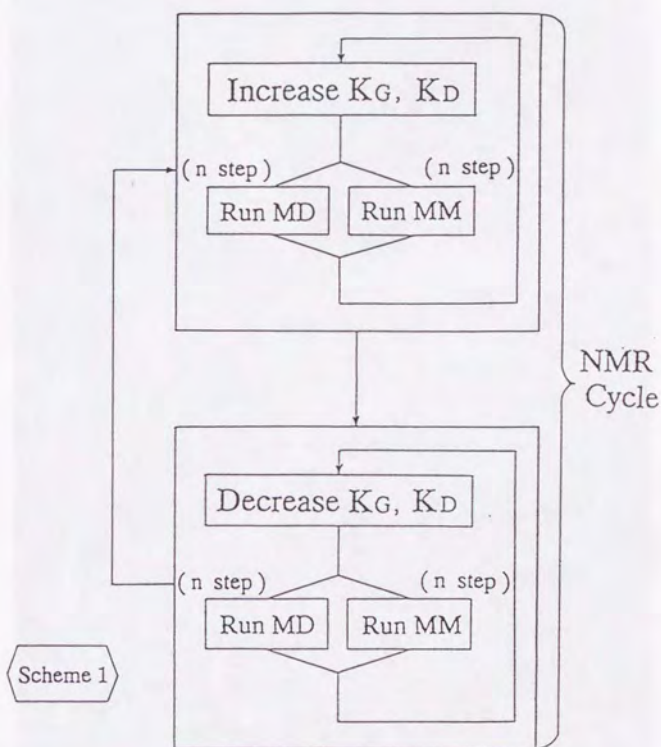


図4.14 NMRgrafによる計算スキーム

通常のポテンシャルエネルギー E_{MM} に束縛条件 E_{NMR} を課す

$$E_{total} = E_{MM} + E_{NMR}, \quad E_{NMR} = K_G \sum k_i (r_i - r_{oi})^2 + K_D \sum k_j (\phi_j - \phi_{oj})^2$$

但し, r_i, ϕ_j は NMR データの値 (距離と二面角), r_{oi}, ϕ_{oj} は初期構造の値

1) $K_G (K_D) = 0$ で分子動力学計算 (MD) とエネルギー極小化計算 (MM) を行う

2) $K_G (K_D)$ を最大値まで 20% ずつ増加させながら計算を繰り返す (n step)

3) $K_G (K_D)$ を 0 まで 20% ずつ減少させながら計算を繰り返す (n step)

4) 上記 1) ~ 3) の操作を繰り返す (NMR cycle)

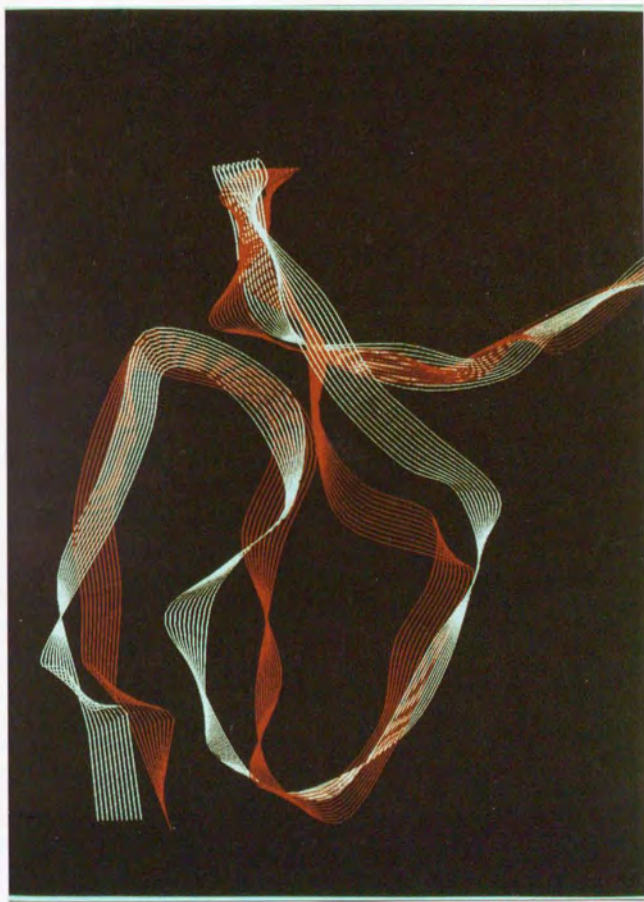


図4.15 軽鎖主鎖の立体構造 (preliminary results)
distance geometryで得られた構造を白で、その後のrestrained-
molecular dynamicsで得られた構造を赤で表す。左上がN末端。

第5章. intact プロテアーゼAの高次構造解析

5.1 序

本章では intact プロテアーゼ A の構造解析について述べる。図 2.4 にプロテアーゼ A の 2D-NMR スペクトルの一部 (fingerprint 領域) を示したが、図 5.1 にその全領域のスペクトルを示す (TOCSY, 混合時間 45 ms)。プロテアーゼ A は計 212 残基から成る分子量 22,000 の蛋白質であるが、 β シートに富むことから、その 2D- ^1H NMR スペクトルはよく分離したシグナルを与える。しかし全シグナルの帰属を完成させるためには多次元 NMR の測定が必要であり、そのためにはプロテアーゼ A を同位体ラベルしなければならない。

4 章で述べたように Wütrich らの提案した 2 次元 NMR を用いた、いわゆる連鎖帰属法は蛋白質の NMR 解析にきわめて重要な手法であるが、この方法が依拠する ^1H - ^1H vicinal coupling と NOE の性質上帰属する上で根本的な問題をもつ。また分子量が増すにつれ、原子核数と線幅の増大を伴うため、2 次元平面においてもピークが重なり、磁化移動効率も減少して帰属が困難になる。シグナルの重なりについては 3 次元 NMR を測定し、周波数軸を増すことにより改善できることが示された (Oschkinat et al., 1988)。この同種核 3 次元 NMR は、磁化移動効率の点から 2 次元 NMR と同様感度に限界があること、測定に膨大な容量と時間が必要なことから、限られた例 (Vuister et al., 1988; 1990) を除いてあまり用いられていないが、以下で述べる同位体標識が困難な蛋白質においては現在でも有力な方法である (Hanzawa et al., 1994)。一方 NMR スペクトルの帰属に安定同位体を利用した異種核 NMR の測定が有効なことは早くから示唆されてきたが (Kainosho & Tsuji, 1982; Kato et al., 1989)、近年の遺伝子工学の進歩により比較的簡単に目的の蛋白質を同位体標識出来るようになった。特に 3 次元 NMR の第 3 軸をプロトンとは独立の異種核にとることにより、シグナルの分離と感度の向上をもたらすことが示された (Zuiderweg & Fesik, 1989; Marion et al., 1989c)。近年伊倉らは完全 (^{15}N , ^{13}C) 標識化蛋白質を用いて、NOE に頼らず異種核 1 bond J 結合を基礎とする新しい帰属法を報告した (Ikura et al., 1990)。この方法が依拠する異種核 J 結合はプロトン同種核 J 結合に比べて比較的大きく、コンフォメーションに依存しないためきわめて感度がよい。また同種核実験のように他の磁化移動による交差ピークの出現が少ないため帰属が比較的容易であり、解析の一部自動化も可能である。なおカルボニル炭素についても磁化展開することによりで 4 次元 NMR の測定が行われている (Kay et al., 1991)。これら 3 重共鳴多次元 NMR の手法を用いて現在では分子量 30,000 程度の蛋白質まで帰属が可能となった (実際には Pulse Field Gradient や sensitivity enhancement, linear prediction 等の手法も組み合わせて用いられる)。

近年、遺伝子工学の分野において大腸菌 *Escherichia coli* や枯草菌 *Bacillus brevis* 等を用いて種々の分泌蛋白質の発現系が構築されている。当研究室でも種々のプロテアーゼに関して発現系を構築し、蛋白工学的研究を行っている(Hayashi et al., unpublished results)。プロテアーゼAについては1本鎖の前駆体を大腸菌により発現し活性化することに成功している(Kagami et al., unpublished results)が、培地や収率等の点で同位体標識のための系としては現段階では不十分である。また *B. brevis* の系は分泌能が高いことが知られている(Yamagata et al., 1989)が、プロテアーゼAの発現分泌にはまだ成功していない(Hayashi et al., unpublished results)。このためプロテアーゼAの同位体標識は、*A. niger* の菌体から直接行うことにし、ラベル化のための *A. niger* の培養条件を検討した。またプロテアーゼAは pH4.5 付近で非常に可溶性かつ安定なため、培養条件の検討と並行して natural abundance による異種核2次元 NMR および同種核3次元 NMR を測定した。

5.2 方法

5.2.1 *A. niger* の培養と試料の精製

A. niger の菌株(ATCC16513)は明治製菓より頂いた。スラント培養は Malt extract 2%, Yeast extract 0.2%, Agar 2% を 7~8 ml 滅菌済みガラスチューブ(試験管)に入れて固め、植菌後、室温で1週間程行った。生産培養は各培養液を250ml 用三角フラスコに30ml 入れて1スラント分植菌し、30°C, 220 rpm で巡回培養機にて行った。フラスコは綿栓して使用し、植菌前に121°C, 15分間オートクレーブした。菌の生育が悪くペレットを形成する際(特にカザミノ酸培地)には、培地にグラスビーズを入れて胞子を砕きながら培養した。培地が無機塩(硫酸、硝酸)やカザミノ酸の場合にはミネラルを補給するため水道水を使用した。またクロレラ Algal Cells 粉末(labelled, unlabelled ともに)は昭光通商より購入し、他の培地成分は市販の試薬を用いた。クロレラ破碎はクロレラ粉末に適量の蒸留水とグラスビーズを混ぜ乳鉢にて行った。培養中は一定時間毎に、pH および酵素活性測定と顕微鏡による菌体観察(図5.2)を行って培養液の状態をモニターし、最適の時期に blot out した。

A. niger の菌体破碎(菌体内酵素の確認のため)は、下記の酵素溶液によるプロトプラスト化後、浸透圧破碎により行った。

0.04 M リン酸緩衝液(pH6.0)

0.8 M NaCl

0.02 M MgCl₂

4% 酵素 mix

メイセラゼ P1 150mg

ドリラーゼ 100mg (協和)

キチナーゼ 10 mg (sigma)

β -グルクロニダーゼ 100mg (sigma)

このうちメイセラゼ P1 は明治製菓より頂いた。

プロトプラスト化はまず菌体を蒸留水にて洗浄後、試験管当たり 10ml の 4% 上記酵素溶液を入れ、30℃で 18 時間振とうし、光学顕微鏡 (400 倍) にて確認した。菌体破碎はプロトプラスト溶液を 10 倍量の低張液 (蒸留水) と混合して行い、顕微鏡にて確認した。

プロテアーゼ A の Western Blotting は Kagami らの方法に従った (Kagami et al., unpublished results)。プロテアーゼ A の anti-mouse ポリクローナル抗体は当研究室の井上英史博士より頂いた。二次抗体としてビオチン化 anti-mouse 抗体を使用し、Vecstatin ABC キット (Vector Systems) を用いて、peroxidase 活性により、SDS-PAGE ゲルから PVDF メンブレン (Whatmann) 上に転写された特異的バンドを検出した。

培養液中のプロテアーゼ A の活性測定は基本的には 2.2.4 で述べた方法と同一であるが、プロテアーゼ B の活性を抑えるために酵素溶液中にペプスタチンを適量添加した。なおペプスタチンは不溶性のため DMSO に溶かしたストック溶液を少量添加した。

培養液からのプロテアーゼ A の精製は以下の手順で行った。まず精製中他のプロテアーゼ、特に培養液中に多量に存在するプロテアーゼ B による分解を抑えるため、培養終了後直ちに遠心して菌体成分を除去し、培養濾液にペプスタチンを添加した。凍結乾燥にて濃縮し、乾燥後の粉末を少量 (10 ml) の 50 mM 酢酸緩衝液、0.2 M NaCl (pH4.5) に溶かして遠心後 (2000 rpm)、上清を Sephacryl S-200 カラム (3.5 x 100 cm) にかけてゲル濾過を行った。流速が 1 ml/min になるように調節して、50 mM 酢酸緩衝液、0.2 M NaCl (pH4.5) にて溶出した。プロテアーゼ A を含む画分を SDS-PAGE、活性測定により確認後、集めて 50 mM 酢酸緩衝液 (pH4.5, 塩なし) で 5 倍に希釈して DEAE-Toyoparl 650S カラム (1.5 x 30 cm) に吸着させた。以下 2.2.1 後半で述べた方法に従い pH 勾配 (pH4.5→3.0) をかけてプロテアーゼ A を溶出し、得られた画分を $10^{-4.5}$ M HCl 溶液に対して透析後凍結乾燥した。なお遠心、カラム操作や透析は全て 4℃で行った。

5.2.2 NMR 測定 (同位体標識サンプル)

同位体標識したプロテアーゼ A の異種核 NMR スペクトルは対称式マイクロ試料管 (シゲミ) を用いて Bruker AMX600 および Bruker AMX500 分光計にて測定した。

NMR サンプルの調製は基本的には 2.2.2 の 2D-NMR サンプルの調製と同一であるが、凍結乾燥したプロテアーゼ A を $200 \mu\text{l H}_2\text{O}/20 \mu\text{l D}_2\text{O}$ に溶かし、NaOH で pH を 4.6 に調製した。試料濃度は約 1 mM で 30°C にて測定した。3D-NMR 測定に先立ち 2D-HMQC または HSQC (Overbodenhausen; Bodenhausen & Ruben, 1980) スペクトルを測定しスペクトル幅等パラメータの設定を行った。パルスプログラムは文献のものを一部変更して用いた。 ^{13}C , ^{15}N のパルス幅は標準サンプルの値を用いた。

^1H - ^{15}N 2 重共鳴 NOESY-HMQC, TOCSY-HMQC (Marion et al., 1989c) は、 ^{15}N 標識サンプルを用いて Bruker AMX600 分光計で測定した。スペクトル幅は $9091\text{Hz}(^1\text{H})$ 及び $3600\text{Hz}(^{15}\text{N})$ に設定し、 $128(\text{t1}) \times 32(\text{t2}) \times 512(\text{t3})$ データポイントから成る FID を得た。測定は 3 軸とも TPPI (あるいは Redfield 法; Redfield, 1975) モードで、混合時間 50ms (NOESY), 45ms (TOCSY) で行った。積算回数は 32 回で、繰り返し待ち時間 0.8s の間の presaturation により溶媒シグナルを消去した。TOCSY のスピロックには DIPSI-2 シークエンス (Shaka et al., 1988) を用い、 ^1H のデカップリングには GARP パルスを使用した。フーリエ変換等のデータ処理は Felix を用い (5.2.5)、ゼロフィル後、最終的に $256(\text{t1}) \times 64(\text{t2}) \times 512(\text{t3})$ ポイントから成る実データマトリックスを得た。

^1H - ^{13}C - ^{15}N 3 重共鳴 HN(CO)CA スペクトル (Bax & Ikura, 1991; Grzesiek & Bax, 1992) は Bruker AMX500 分光計で磁場勾配法にて (グラジエント分光; PFG) 行った。展開時間中の磁化の減衰を抑えるため、t1 を含む ^{15}N の展開時間は一定値になるようにした (constant time version; Powers et al., 1991)。スペクトル幅は $8333\text{Hz}(^1\text{H})$, $6802\text{Hz}(^{13}\text{C})$ 及び $3333\text{Hz}(^{15}\text{N})$ に設定し、 $80(\text{t1}) \times 40(\text{t2}) \times 2048(\text{t3})$ データポイントから成る FID を得た。データ取り込みは、TPPI-States (t1, t2; Marion et al., 1989b) および simultaneous (t3) モードで行い、32 回積算した。繰り返し待ち時間は 0.8s で、溶媒シグナルは磁場勾配法により除去した。 ^1H のデカップリングには GARP パルスを使用した。フーリエ変換等のデータ処理は Felix を用い (5.2.5)、ゼロフィル後、最終的に $128(\text{t1}) \times 64(\text{t2}) \times 1024(\text{t3})$ ポイントから成る実データマトリックスを得た。

HNCA および HNCO スペクトル (Kay et al., 1990) は Bruker AMX600 分光計で行った。スペクトル幅は $9091\text{Hz}(^1\text{H})$, $6802\text{Hz}(^{13}\text{C})$ 及び $3600\text{Hz}(^{15}\text{N})$ に設定し、 $80(\text{t1}) \times 40(\text{t2}) \times 1024(\text{t3})$ データポイントから成る FID を得た。データ取り込みは、

TPPI-States(t1,t2) および simultaneous(t3)モードで行い、64 回積算した。繰り返し待ち時間 0.8s の間の presaturation により溶媒シグナルを消去した。 ^1H のデカップリングには GARP パルスを使用した。フーリエ変換等のデータ処理は Felix を用い (5.2.5)、ゼロフィル後、最終的に 128(t1)x64(t2)x1024(t3)ポイントから成る実データマトリックスを得た。

5.2.3 NMR 測定 (同種核 3 次元)

3D- ^1H NOESY-NOESY(Boelens et al., 1989), TOCSY-NOESY(Oschkinat et al., 1989) スペクトルは、Bruker AM400 分光計にて 40°C で測定した。8mM 90% $\text{H}_2\text{O}/10\%$ D_2O (pH4.6) 溶液を用いて、スペクトル幅 5000~6000Hz、積算回数 16 または 32 回 (繰り返し待ち時間 0.7~0.8s) で TPPI モードで測定した。溶媒シグナルの除去は jump-return(Driscoll et al., 1989)または DANTE(Zuiderweg et al., 1986)パルスにより行い、128(t1)x128(t2)x1024(t3)ポイントの FID を得た。混合時間は 50ms(NOESY), 22ms(TOCSY)で、TOCSY の mixing には MLEV17 または DIPSI-2 シーケンスを用いた。位相サイクルは文献値を一部変更して使用した。フーリエ変換等のデータ処理は全て IRIS ワークステーション上で行い (5.2.5)、最終的に 128(t1)x128(t2)x1024(t3)ポイントの実データマトリックスを得た。

5.2.4 NMR 測定 (natural abundance)

natural abundance による 2D-HMQC(Zuiderweg, 1990) スペクトルは GE OMEGA 500 分光計にて 37°C で測定した。 ^1H - ^{15}N HMQC は、10mM, 90% $\text{H}_2\text{O}/10\%$ D_2O (pH4.6) 溶液を用いて、スペクトル幅 3333Hz(t1), 10000Hz(t2)、積算回数 400 回で測定した。 ^1H - ^{13}C HMQC は、10mM, D_2O (pH4.6) 溶液を用いて、スペクトル幅 18519Hz(t1), 7018Hz(t2)、積算回数 384 回で測定した。両スペクトルともプロトンのデカップリングには WALTZ-16 パルスを用い、States モード (States et al., 1982)で 512(t1)x1024(t2)ポイントのデータを取り込んだ。FID を t1 方向に 2 倍にゼロフィル後フーリエ変換した。なお溶媒シグナルは繰り返し待ち時間 1.0s の間の presaturation により除去した。

5.2.5 データ処理

3D-NMR スペクトルのフーリエ変換は IRIS Elan および Indigo2 ワークステーション上で Felix ソフトウェアを用いて行った。データ処理用のマクロは自作した。ウィンドウ関数は 3 軸ともサイン自乗関数を用いた。

5.3 結果と考察

5.3.1 *A.niger* の培養条件の検討

通常 NMR 試料の同位体標識は大腸菌などの発現系を用いて行いが、5.1 で述べたように本酵素の発現系は NMR 試料の調製用としては不十分であったため、*A.niger* を同位体を含む培地で培養し、培養液から標識試料を直接精製することを試みた。そして本培養に先立ち、非同位体培地を用いて培養条件の検討を行って収率のよい培養、精製条件を探索した。

硫酸培地での培養

A.niger の通常の培養は各種植物抽出物を含む培地を用いて行われているが、これら植物抽出物を全て同位体標識することは不可能であった。また *A.niger* の最少培地は不明である。多くの NMR 試料の ^{15}N 標識は、硫酸アンモニウム（硫酸）、塩化アンモニウム（塩安）等の無機塩により行われており、また経済的にも安価なため、まず *A.niger* を硫酸で培養することを試みた。通常の工場培養の際の窒素を含む培地成分を硫酸に置換して培養を行った。培養日数は通常の培養と同じ 7 日間としたが、経時的な顕微鏡観察により培養が行き過ぎないことを確認した（図 5.2）。この際通常の培地の窒素成分を 100%硫酸に置換するとペレットを形成してカビの生育が阻害されるため、以後 90%置換した培地で培養を行った。しかし 90%置換でもなお収率が悪かったため硫酸培地による培養では、80%置換培地によりまずシード培養を行い、このうち 10%を生産培地に植菌した。すなわち、スラント培養→シード培養→生産培養という数段階の方法をとった。培養上清を SDS-PAGE にかけてプロテアーゼ A の位置にバンドが検出されたが、より正確さを期するため培養の都度、上清の酵素活性測定も併せて行った。1 回に硫酸 10~30g を用いて培養を行ったが、酵素量が微量のためペプスタチンを添加して精製を行ったところ収量が増大した。このため以降の精製ではペプスタチンを添加して行った。最終的に硫酸 30g を用いて培養後、1.4mg のサンプルを精製し、1D-NMR 測定によりプロテアーゼ A であることを確認した。同一条件下で再現性を確認した後同位体培地を用いて本培養を行った。本培養は total 30g の ^{15}N -硫酸を用い、生産培地 200ml を入れた 11 三角フラスコで 3 本分培養した（シード培養は 5.2.1 のスケールで行った）。精製したサンプル(1.0mg)の ^1H NMR スペクトルからプロテアーゼ A であることを確認したが、アミドプロトンの ^{15}N によるカップリングが観測されず、また DEPT 測定でも ^{15}N のシグナルは観測されなかった（図 5.3）。この結果は、*A.niger* が窒素源として 90%置換した硫酸を用いずに、10%の非置換成分を用いて生育していたことを示しており、硫酸中の窒素は *A.niger* に取り込まれないことが

わかった。

カザミノ酸培地等による培養

そこでカビの代謝過程（特に窒素固定化）を考え、アミノ酸混合物であるカザミノ酸を培地として検討した。またこの他にも硝安培地（アカパンカビ最少培地）や KNO_3 培地 (Yee & O'Neil, 1992) 等についても検討を加えた（窒素源として NH_4^+ よりも NO_3^- の方が固定化されやすいと考えたため）。使用した培地の組成は以下の通り。

カザミノ酸培地 ; pH6.0

グルコース 2%

カザミノ酸 10%

K_2HPO_4 0.1%

硝安培地（または KNO_3 培地） ; pH5.8

クエン酸ナトリウム 12.5%

KH_2PO_4 25%

NH_4NO_3 10%（または KNO_3 25%）

グルコース 0.75%

MgSO_4 1%

CaCl_2 0.5%

ビタミンストック液 0.01%

チアミン 2%

ピリドキサル塩酸 2%

パントテン酸 2%

ビオチン 0.2%

イノシトール 100% (w/v)

微量元素溶液 0.5% (v/v)

クエン酸 5%

ZnSO_4 5%

FeCl_3 0.5%

CuSO_4 0.25%

MnCl_2 0.06%

H_3BO_3 0.05%

Na_2MoO_4 0.05%

いずれの培地ともカビの生育が悪かったため、5.2.1 に述べたように培地中にガラスビーズを加えて培養したが、カザミノ酸培地のみ生育した。植菌後経時的に上清

を採取して SDS-PAGE にかけてが、プロテアーゼ A は検出されなかった。また培養後の菌体をプロトプラスト化し破壊後 SDS-PAGE, Western Blotting を行ったが、プロテアーゼ A およびその前駆体は検出されなかった（プロテアーゼ A のポリクローナル抗体は前駆体とも反応する；Kagami et al., unpublished results）。培養開始の pH を中性付近で行ったのは、*A.niger* の場合 pH5 以下ではベレットを形成しやすいからであるが、同じ *Aspergillus* 属の *A.awamori* の場合 pH4.5 で培養を行っており（但し培地は全く異なる；Berka et al., 1990）、中性付近では変性の可能性もあった。このため pH4.5 で *A.niger* の培養を行ったが、結果は同じであった。以上より、カザミノ酸培地の場合カビは生育するが、プロテアーゼ A は産生も分泌もされないことがわかった。硫酸培地の結果も考慮すると、培地が無機物やアミノ酸のみから成り、蛋白性の抽出物が含まれていない場合は、プロテアーゼ A の産生は殆どないと考えられる（但しカビは生育する）。そこでプロテアーゼ A の産生を促すため以下の 2 つの方策を採った。

1 つは培地にプロテアーゼ A の基質または阻害剤を加えて誘導をかけることである。5.4 で述べるように acetyl-Phe-diio-Tyr(APDT)はプロテアーゼ A の活性を若干阻害する。但し元来ペプシンの基質なのでプロテアーゼ B の方の分泌を誘導する可能性があるが、他に特異的かつ安価な誘導剤がなかったので、従来の培地に APDT を加えて培養を行った。分析の結果菌体内外ともにプロテアーゼ A は検出されなかった。

クロレラによる培養

もう 1 つの方法は、同位体標識した蛋白性抽出物(extract)を培地に用いてカビの培養を行うことである。この場合培地自体がプロテアーゼ A の基質となり、分泌を誘導することになる。通常の蛋白工学実験においては、酵母、麦芽などの抽出物（あるいはその加水分解物）が培地成分として用いられることが多いが、ここでは入手が容易だったクロレラを用いて培養条件を検討した。なお生物由来の抽出物を培地に用いる場合、加水分解産物を使用することが多いが、ここではプロテアーゼの分泌を促すため、むしろ加水分解は行わずにクロレラの菌体を物理的に破碎するにとどめた。培養はフラスコ当たりクロレラ 2g を 30ml に溶かして行った。培養上清を経時的に採取し Western Blotting を行ったところ、培養日数 7 日以下のサンプルからプロテアーゼ A が検出された（7 日目以降は液の性状から溶菌が進行していると考えられる）。そこでクロレラ 10g からサンプル 0.4mg を精製し、Western Blotting によりプロテアーゼ A であることを確認したが、その 1D-NMR スペクトルは native 状態とは異なるものであった（比活性も小さかった）。特にこれまでの培地とは異なり、クロレラ培地では培養の進行とともに上清の pH が上昇した（培

養終了時に pH7 以上)。初発 pH を下げたり、培地に 50mM MES を加え pH を保つようにしたが、効果がなかったため pH モニターで pH を一定に保ちながら培養を行った (pH が上昇すると酸を加えて pH を下げる)。pH は培養開始後 2 日ないし 3 日あたりに激しく変動し以降はほぼ一定であった。7 日間培養後精製したが、Western Blotting, ^1H NMR 測定の結果は同一であった。プロテアーゼ A の変性、会合の可能性を SDS-PAGE、ゲル濾過等により検討したが、否定された。このため培養の経時変化を再検討し、培養中 pH を一定に保つことはやめ、pH が閾値を越えたら培養を直ちに止めることにした。このため培養日数は 2~4 日になったが、精製後 native 状態の NMR スペクトルが得られた。工場培養時に比べて培地の栄養分が乏しいため、至適培養日数が短くなったと考えられる。またクロレラ培地においてもカビの菌体自体は 7 日目付近に最大量を示すが、プロテアーゼ A の菌体外への分泌はそれ以前に最大値に達することがわかった。これはプロテアーゼ A が細胞外プロテアーゼであるため、菌体生育途上で最も多量に分泌され、菌体量が最大に達する頃には既に分解され始めていると考えられる。最大値に達する時期のこうしただけは、他のカビの細胞外プロテアーゼでも観察されている (Homma et al., 1993)。最終的にクロレラ 10g を用いて 24mg のサンプルが得られたが、窒素源 1g 当たりの収率を大腸菌の発現系の場合 (Kagami et al., unpublished results) と比較すると、比活性で 1.5~2 倍の値が得られた。再度非同位体培地で再現性を確認した後、 ^{15}N 標識、 ^{13}C , ^{15}N 標識したクロレラを用いて本培養を行った。サンプル精製後 NMR にて同位体標識されたことを確認し、以降の測定に使用した。

5.3.2 NMR スペクトル

図 5.4 に異種核 NMR スペクトルの帰属の手順の一例を示す。5.1 に述べた異種核スピン結合の利点を生かして、化学結合を 1 本 1 本たどることによりシグナルの帰属を行うことが出来る。図 5.5 に $2\text{D-}^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ HSQC スペクトルを、図 5.6 に $3\text{D-}^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ TOCSY-HMQC スペクトルを表す。図 5.5 では 200 個以上の全残基のアミド N-H の cross peak が分離して観測され、 ^{15}N による展開が十分有効であることが期待される。図 5.6 はそのことを示している (図 5.7 に図 5.6 の ω_2 スライスを示した)。図 5.8 はダブルラベル試料を用いた $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ HSQC スペクトルを示しており、C α -H 領域はよく分離していることがわかる。図 5.9 に 3 重共鳴 HN(CO)CA スペクトル、図 5.10 にその ω_2 スライスを示した。個々のシグナルは分離して観測された。なお図 5.5、図 5.8 の HSQC スペクトルは、natural abundance による HMQC スペクトル (図 5.11) とほぼ同一のシグナル分布を与え、同位体標識に問題がなかったことを表している。現在、同種核 $3\text{D-}^1\text{H}$ NMR スペクトルも参照しな

がら、シグナルの系統的帰属を進めている。

5.3.3 プロテアーゼ A の生理的役割

プロテアーゼ A は *A.niger* が菌体外に分泌する蛋白質で、当初その生理的役割はプロテアーゼ B と同様、菌体が寄生する際宿主細胞を分解することであると考えられた。ところが培養時のプロテアーゼ A 活性の経時変化は特異的な傾向を示した(図 5.3.3)。図のようにプロテアーゼ A 活性は培養開始 1 日後から急激に増大し、2 日目付近で最大値に達した後、急激に減少した。培養のある時期に特異的に発現することから、プロテアーゼ A は蛋白質分解を通じて菌体生育に関する特別の役割を果たしていると考えられる。またその活性は最大値に達した後急速に減少するが、溶液の pH が弱酸性であることや、プロテアーゼ A は殆ど自己分解がないこと等から、この活性低下は中性変性や自己分解によるものではなく、他の蛋白質分子によりプロテアーゼ A が特異的に分解されたものと考えられる。以上のようにプロテアーゼ A は分泌の際に菌体の生育に関する特別な役割を果たしていると考えられるが、この働きがプロテアーゼ B と共同しているかどうかは不明である。

5.4 補遺(基質アナログとの相互作用の解析)

酵素分子の構造・機能相関、特に触媒部位や基質認識部位の同定のためには、酵素-基質間相互作用の研究が不可欠である。現在プロテアーゼ A の特異的阻害剤は見つかっていないが、ペプシンの基質である N-acetyl-Phe-diiodoTyr(APDT)はプロテアーゼ A の活性を若干阻害する。またプロテアーゼ A の基質特異性は、酸化 ribonuclease A(Takahashi, unpublished results), 酸化 insulin B 鎖(Ito et al., 1987)を用いて調べられているが、また α_2 -macroglobulin の bait region ペプチドを特異的に切断することも知られている(Tanokura, unpublished results)。図 5.A.1 に bait region のプロテアーゼ A による切断部位と、酵素処理後の HPLC(Hitachi ODS 120T)のパターンを示す。酵素未添加時には単一のピークを与えるが、酵素添加時は切断断片から成る複数のピークが現れている。図 5.A.2 にはさらに APDT を酵素の 5000 倍モル量添加した際の HPLC の結果を示した。APDT は市販のものを用いたが、minor component が若干含まれ、HPLC では複数のピークを与える(下図)。上図の矢印は未切断基質のピークの位置を表し、APDT 添加により基質の切断が阻害されることがわかった。図 5.A.3 に APDT の化学構造と $1D-^1H$ NMR スペクトルを示した(帰属はホモデカップリング実験により行った)。図 5.A.4 はプロテアーゼ A の有無による APDT の $2D$ -NOESY スペクトルである。酵素添加のスペクトル

に負の NOE ピークが観測され、APDT の分子量が 621であることを考慮すると、プロテアーゼ A と APDT との間に化学交換が起こっていることが示唆される。このことは、APDT 単独では規則構造をとっていないが、酵素と相互作用することにより特定の構造をとるものと考えられる。分子内 NOE から APDT の構造を決定する予定である。また他の基質アナログも探索し、同様の実験を行う予定である。

HOHAHA(44ms) 45°C H₂O pH4.6

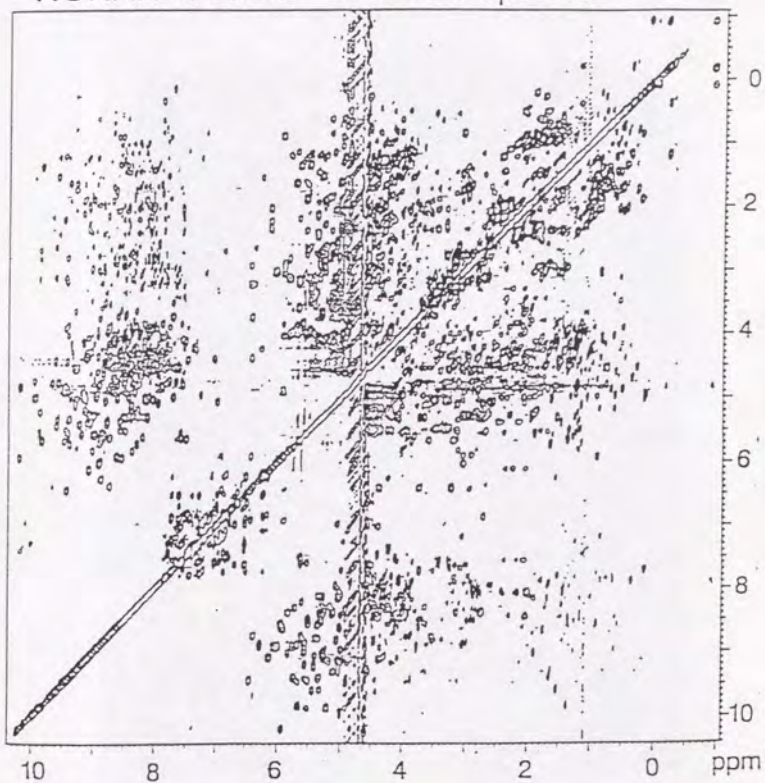
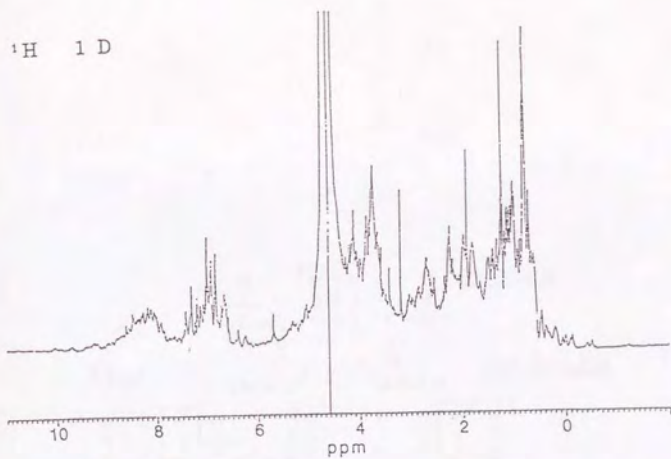


図5.1 プロテアーゼ A の2D-NMRスペクトル



図5.2 *Aspergillus niger* の菌糸 (x 400)



^{15}N DEPT

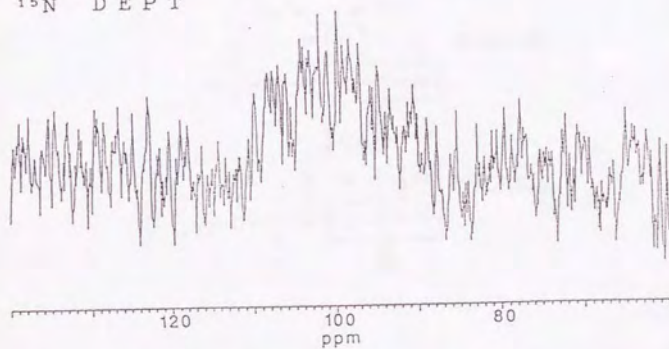


図5.3 硫安培地で培養した試料の ^1H 1DおよびDEPTスペクトル

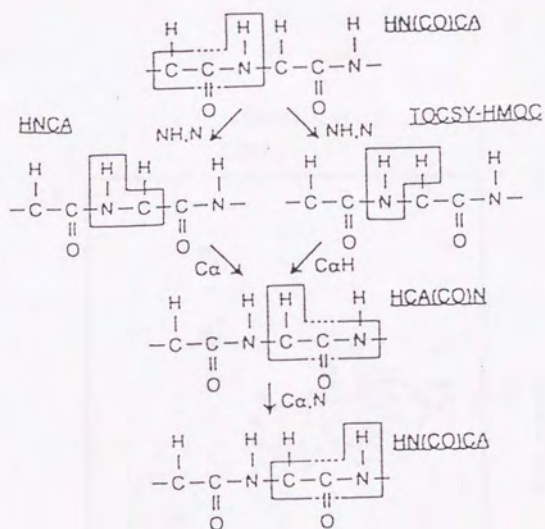


図5.4 異種核多次元NMRスペクトルの帰属の手順

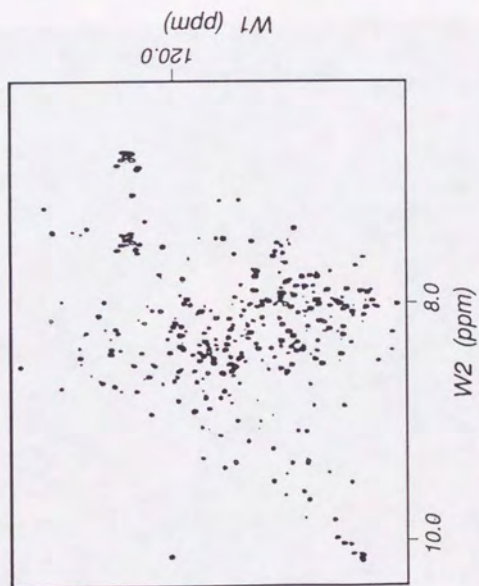


図5.5 プロテアーゼAの ^{15}N - ^1H HSQC スペクトル

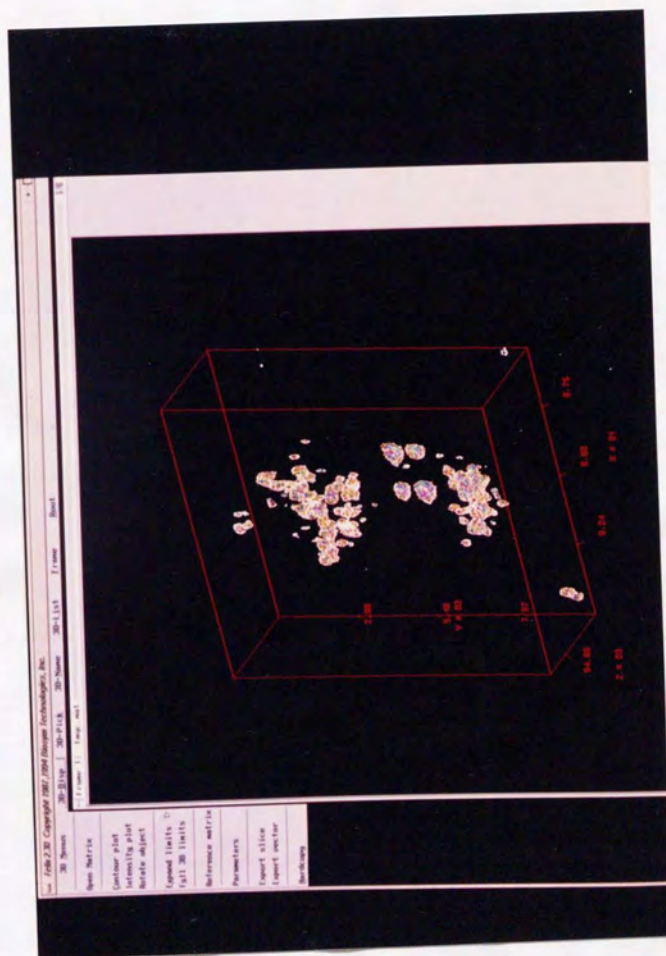


図5.6 プロテアーゼAの ^{15}N - ^1H TOCSY-HMQC スペクトル
D1, D2はHを, D3はNを表す

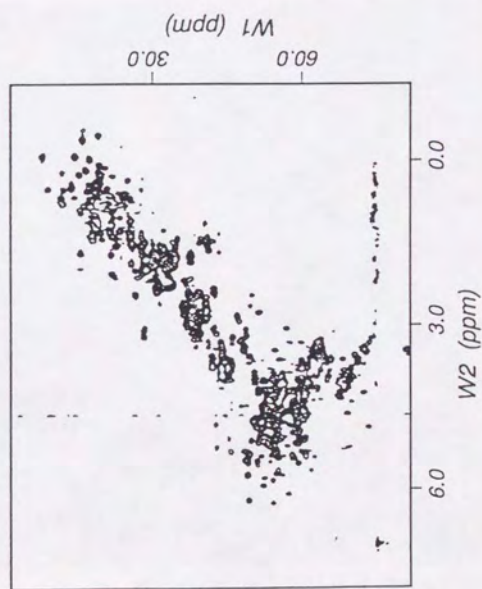


図5.8 グラジエント法によるプロテアーゼAの ^{13}C - ^1H HSQC スペクトル

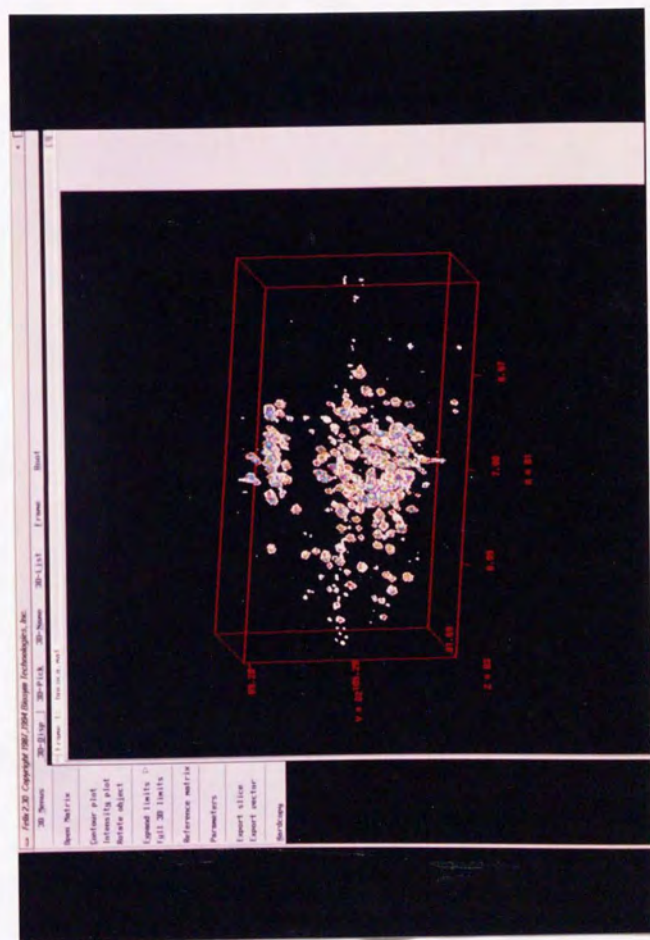


図5.9 グラジエント法によるプロテアーゼAの3重共鳴HN(CO)CAスペクトル

D1はHを, D2はNを, D3はCを表す

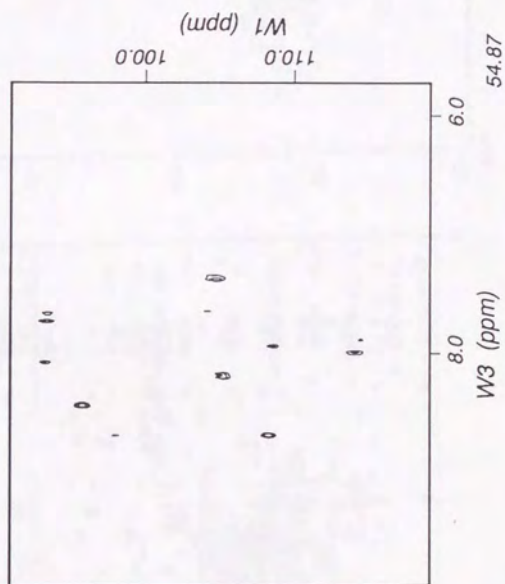


図5.10 グラジエント法によるプロテアーゼAの3重共鳴HN(CO)CAスペクトルの ω_2 断面
 ω_1 はNを, ω_3 はHを表す

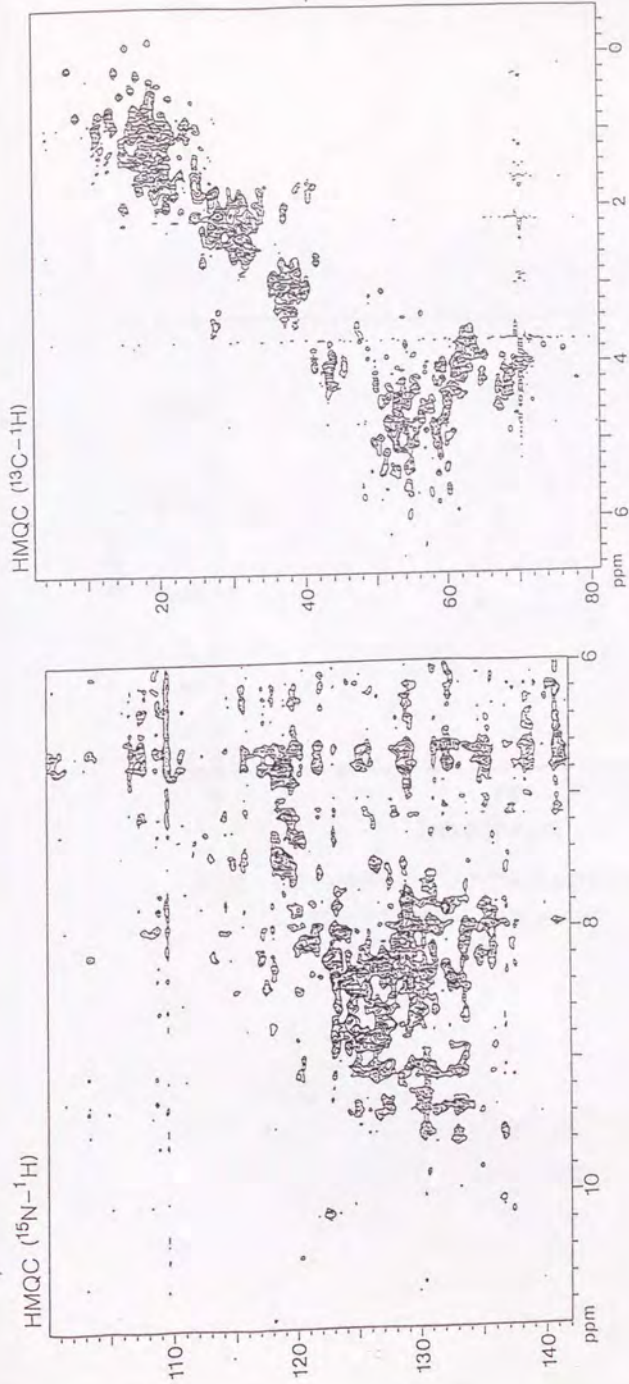


図5.11 プロテアーゼAのHMQCスペクトル(natural abundance)

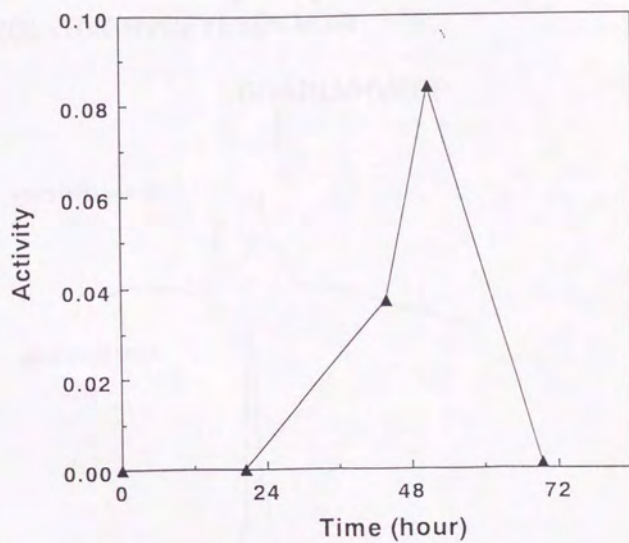


図5.12 *A. niger*培養時のプロテアーゼA活性の経時変化
縦軸は活性を ΔA_{280} の値で示す

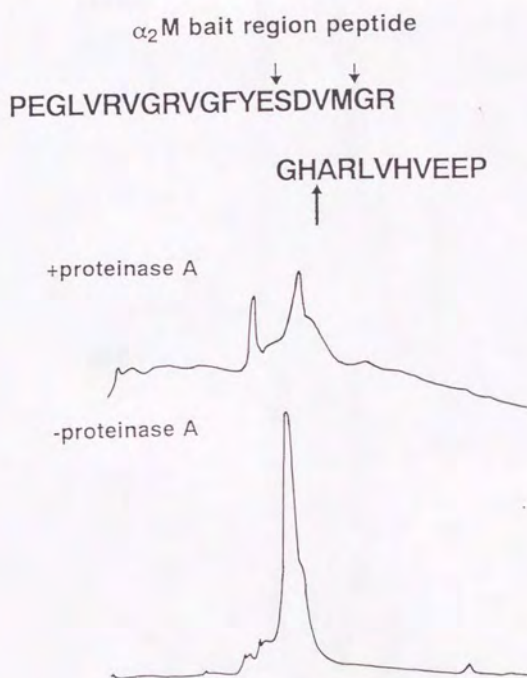


図5.A.1 bait regionのプロテアーゼAによる切断部位と
 酵素処理後のHPLCパターン
 太い矢印はmajor cleavage siteを
 細い矢印はminor cleavage siteを示す

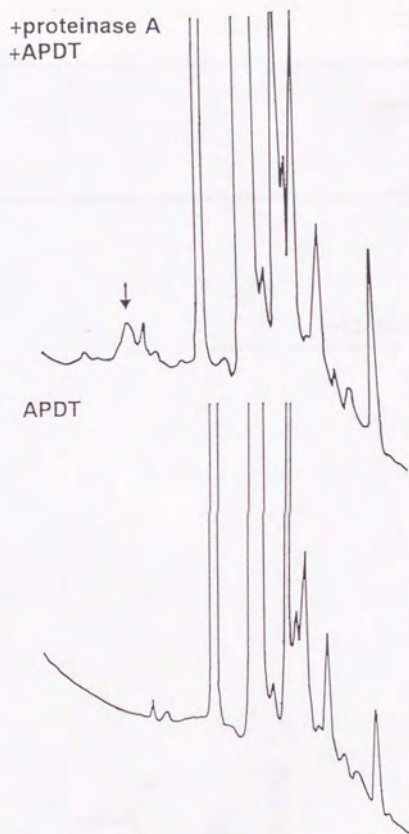
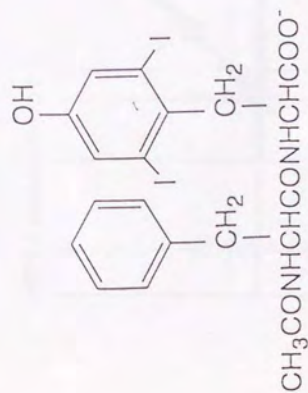


図5.A.2 APDT添加時のbait regionとAPDTのHPLCパターン
矢印は未切断の基質のピークを示す



APDT / proctase A=50 / 1 (molar ratio), 310K

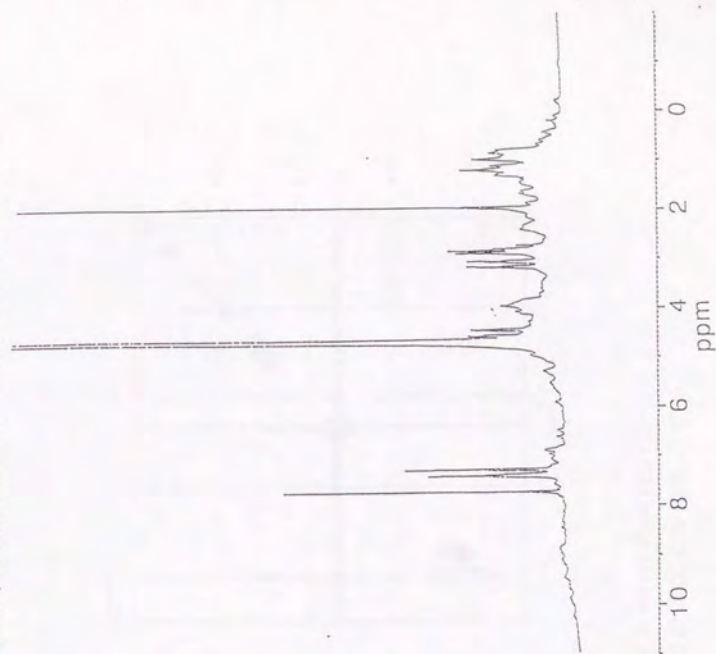
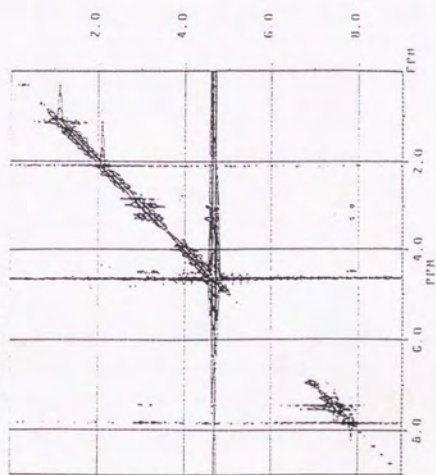


図5.A.3 APDTの化学構造と1D- ^1H NMRスペクトル
NMR測定は10% $\text{DMSO}-d_6$ /90% D_2O 中で行った

APDT / proctase A=10 / 1



APDT

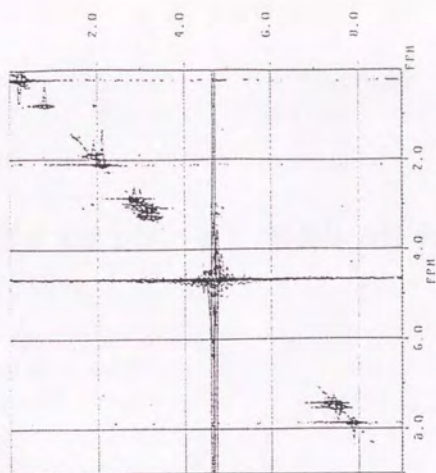


図5.A.4 プロテアーゼAの有無によるAPDTのNOESYスペクトル
測定は310Kで行った。左図の比はモル比を示す

第6章 リボヌクレアーゼT₁変異体の分子動力学計算

6.1 序

本章以下の3章では、RNase T₁に関する構造的諸問題の幾つかを解析した。まず本章では分子動力学計算によるRNase T₁Glu58変異体の立体構造予測とそれに基づく反応機構の解釈について述べる。1.4で述べたように当初はGlu58が一般塩基、His92が一般酸とする反応機構が考えられたが、アミノ酸部位特異的変異の実験によりGlu58をAspやAlaに置換しても活性が若干(Aspで10%, Alaで5%)残ることが示された。これらの結果より別の反応機構、すなわちリボヌクレアーゼA (RNase A)と同様(Richards & Wyckoff, 1971)2つのHis残基(His40とHis92)が一般酸、一般塩基として作用するというモデルが提案され、議論が続いている。Steyaertらは、2重、3重変異体の活性測定結果に基づき、新しい反応機構を提唱した。これは上記2つのモデルの折衷型ともいうべきもので、野生型においてはGlu58が、Glu58Ala変異体においてはHis40が一般塩基として作用する、というものであった。問題解決のためには高次構造の情報が必要であるが、Glu58変異体の立体構造は解明されていない。

一方AnfinsenのリボヌクレアーゼAの変性・巻き戻り実験以来(1973)、蛋白質分子の3次元構造はアミノ酸配列のみによって決定される、と考えられている。現在一次構造の情報のみから分子全体の立体構造を予測することは困難であるが、低分子量蛋白分子のfoldingシミュレーションや構造既知分子の変異体あるいは誘導体の立体構造予測は、ドラッグデザインや分子モデリング等の応用として現在でも可能になりつつある。具体的には、分子動力学法およびモンテカルロ法と呼ばれるこれらの方法は、特定の鋳型となる初期構造をもとにして、分子の動きをシミュレートするものである。但し蛋白質の場合、エネルギー曲面の非等方性のためモンテカルロ法は効率が悪く(但しNogutiとGoの方法はこの欠点を克服している、1985)、運動方程式から軌跡を時間的に追っていく分子動力学法がよく用いられる。分子動力学法の計算自体は古典力学の範囲を出ないが、トラジェクトリ解析と組み合わせることにより現実の運動をかなりの程度再現出来る。また量子論を考慮すれば、電子の動きを追うことにより酵素分子の反応機構も直接シミュレート出来る。

本研究では上記RNase T₁の触媒機構に関する問題を分子動力学計算を用いて解析した。但し量子論的計算は行わず、野生型酵素の構造にアミノ酸置換等の摂動を与え、その効果が緩和していく様子をシミュレートすることにより変異体の立体構造を予測し、得られた構造から反応機構を推定した。結果はSteyaertのモデルを支持するものであった。

6.2 方法

分子動力学およびエネルギー極小化計算はソフトウェア BIOGRAF (Molecular Simulations 社) を用いて IRIS Indigo Elan ワークステーション (Silicon Graphics 社) 上で行った。分子力場は Dreiding-II (Mayo et al., 1990) を使用し、特に断らない限り計算パラメータの値はデフォルト値を用いた。溶液中においてシミュレーションを行うため誘電率を 80 に固定した。非結合性相互作用はカットオフ値を設けず全て考慮した。水素結合は 0.5 nm かつ 90° 以内の相互作用のみ取り込んだが、遠距離においてなめらかに 0 に近づくように spline switching 関数を使用した (デフォルト)。分子動力学計算は Hoover のアルゴリズム (Hoover, 1985) に基づくカノニカルダイナミクス (NVT ダイナミクス) を 300K で行い、速度のリスケリングにより系の温度、体積を一定に保った。動力学計算中、3'-GMP から 1.2 nm 以内の原子は可動にし、他の原子は固定した。数値積分の各ステップの時間幅として 1 fs (10-15 s) を採用し、水素結合のカットオフ近似リストは 50 ステップ (50 fs) 毎に更新した。

野生型酵素・3'-GMP 複合体の初期構造は文献 (Tanokura et al., 1993) と同様の方法で行った。Protein Data Bank (Brookhaven 国立研究所) に登録されている 1RNT ファイルの座標は、X 線結晶構造解析により決定された Lys25 体野生型酵素・2'-GMP 複合体のもの (Heinemann & Sanger, 1982) であるが、Glu102 が Ala で与えられているため、まず座標から溶媒の水分子を除去し 2'-GMP を 3'-GMP に、Lys25 を Gln に、Ala102 を Glu に置換した。Glu58 変異体・3'-GMP 複合体の初期構造はさらに Glu58 を Asp または Ala に置換することにより作成した。

次に 3'-GMP のリン酸基プロトンを除く全極性水素原子を付加し、Gasteiger の方法 (Gasteiger & Marsili, 1980) により各原子に電荷を割り振った。そして共役勾配法 (conjugate gradient method) により、1 次微分ベクトルの大きさが 8.4 kJ/mol・nm になるまでエネルギー極小化を行った。さらに 18 ps の分子動力学計算を実行し、再び全エネルギー値が一定になるまでエネルギー極小化計算を行って最終構造を得た。

3 次元構造の表示は BIOGRAF を用いて IRIS Indigo Elan ワークステーション上で行った。

6.3 結果と考察

6.3.1 変異体の立体構造

RNase T₁ の触媒機構を 3 次元構造に基づいて解明するため、野生型、Glu58Asp 変異体、Glu58Ala 変異体各々と 3'-GMP との複合体に関して分子動力学・エネルギー極小化計算を行った。図 6.1 に示すとおり、得られた構造において、酵素分子中の大部分は、Glu58 の置換によりほとんど変化しなかった。特に基質結合部位 (Tyr42-Glu46, Asn98) に変化が見られないこと (図 6.1 の太線表示部分) は、Glu58Ala や Glu58Asp の K_m 値が野生型とほとんど同じである事実 (Nishikawa et al., 1986; Shirley et al., 1989; Steyaert et al., 1990) とよく合致する。一方 3'-GMP に対する触媒残基の位置には顕著な差が見られる (図 6.1 の棒球表示部分および図 6.2)。

図 6.2 に各構造における触媒残基 (His40, Glu/Asp/Ala58, His92) と 3'-GMP の立体図を、表 6.1 に触媒残基の側鎖原子から 3'-GMP の P または O2' までの距離を示す。側鎖原子は His40, His92 に関しては、各構造とも N3 からの距離が N1 からの距離より短かったため N3 からの距離を、58 番に関しては Glu, Asp がカルボキシル酸素の内近い方、Ala が C β からの距離が示してある。

6.3.2 予想される反応機構

6.1 で述べたように Glu58 が酵素活性に必須であると考えられていたにもかかわらず、Glu58Asp, Glu58Ala 変異体は有意の残存活性をもつ。この現象は、得られた 3 次元構造に基づき以下のように説明できる。

(1) 野生型においては Glu58 が 3'-GMP の 2'-OH の近くに位置する。Glu58 カルボキシル基酸素原子と 3'-GMP の O2' との距離 (0.29 nm) は、Glu58 が酵素・基質複合体中で一般塩基として十分に作用しうる距離である。

(2) Glu58 から Asp への置換により、Asp59 から 3'-GMP の O2' までの距離が長くなり (0.29→0.36 nm)、代わりに His40 と O2' との距離が短く (0.38→0.36 nm) になった。従って Asp58, His40 とともに不十分ながらも一般塩基として作用しうる位置にあり、このため Glu58Asp 変異体は残存活性を有すると考えられる。

(3) Glu58Ala 変異体においては、Ala58 はプロトン解離基を有しないためもはや一般塩基として作用しえないが、His40 と O2' との距離が野生型構造に比してかなり短くなった (Glu58Ala では 0.29 nm, 野生型では 0.38 nm)。このことは Glu58Ala 変異体では Ala58 の代わりに His40 が一般塩基として働きうることを示しており、Glu58Ala の酵素活性の存在を説明できる。

上記(1)と(3)の解釈は Steyaert らが挙げたモデル (Steyaert et al., 1990) によく合致する (図 6.3)。彼らのモデルによれば、野生型においては His40 イミダゾール

基の正電荷が Glu58 カルボキシル基の負電荷を安定化し、Glu58 の一般塩基としての作用を促進する。(図 6.3A)。一方 Glu58Ala 変異体では His40 イミダゾール基は脱プロトン化しており、His40 が一般塩基として直接基質の 2'-OH に作用するというものである(図 6.3B)。

一方(2)の Glu58Asp 変異体に関しては、モデリングの結果で見ると、His40、Asp59 とともに O2'からほぼ等距離にある(表 6.1)。Glu58Asp 変異体の Asp58 の側鎖は、野生型の Glu58 の側鎖より短い。このため主鎖原子の位置が殆ど変わらなければ、野生型に比べて Asp58 カルボキシル基は 2'-OH から遠くに位置し、一般塩基としての作用は Glu58 と比べて不十分になる。一方 Asp への置換により大きくなった酵素-基質間の間隙を埋めるように His40 が基質側に移動し、His40 と 2'-OH との距離が相互作用出来得る程度にまで近づいたと考えられる。8 章に示すように、同様の方法で Glu58 のカルボキシメチル化誘導体(CM-RNase T₁)の分子モデリングも行われている(Tanokura et al., 1993)。カルボキシメチル化により Glu58 の側鎖は、Glu58Asp の場合とは逆に 4 Å長くなっている。この場合は長くなった側鎖は、2'-OH の方向ではなく Arg77 の方向へ延び、Arg77 側鎖の正電荷と相互作用(イオン結合)するようになる(8 章で詳述)。このため負電荷を中和された CM-Glu58 はもはや一般塩基として作用しえず、酵素活性が消失すると考えられる。以上のように Glu58Ala 変異体も含めて、58 番目残基の一般塩基としての活性と側鎖の長さとの間には密接な関係がある。さらに詳細な知見を得るためには、他の誘導体についても分子モデリングを行うことが必要である。

近年 Steyaert と Wyns は 2 重、3 重変異体の活性測定に基づき、図 6.3 を改良したモデルを発表した(1993)。相違点は基質の 3'-リン酸基の酸素原子と His40 との相互作用の有無である。新しいモデルでは、His40 イミダゾール基の正電荷が Glu58 カルボキシル基以外に基質 3'-リン酸基の負電荷をも安定化し、2'-OH のリン原子への求核攻撃を促進する。しかし本研究の結果からは His40 と 3'-リン酸基との相互作用の有無は不明である。このためには、His40 変異体のモデリングが必要である。

表6.1 野生型および変異体RNase T₁ の触媒残基と3'-GMPとの原子間距離^{a)}

	Wild-type	Glu58Asp	Glu58Ala
(a) Distances to P of 3'-GMP			
His40 N ₃	0.45	0.39	0.46
E/D/A58 O _{γ,β} (C _β) ^{b)}	0.61	0.62	0.84
His92 N ₃	0.63	0.60	0.56
(b) Distances to O _{2'} of 3'-GMP			
His40 N ₃	0.38	0.36	0.29
E/D/A58 O _{γ,β} (C _β) ^{b)}	0.29	0.36	0.56
His92 N ₃	0.68	0.61	0.56

a) 距離はnm.

b) E/D/A58は各分子の58番目のアミノ酸を示す. 距離はGluの場合O_γ, Aspの場合O_β, Alaの場合C_βからの値を表す.

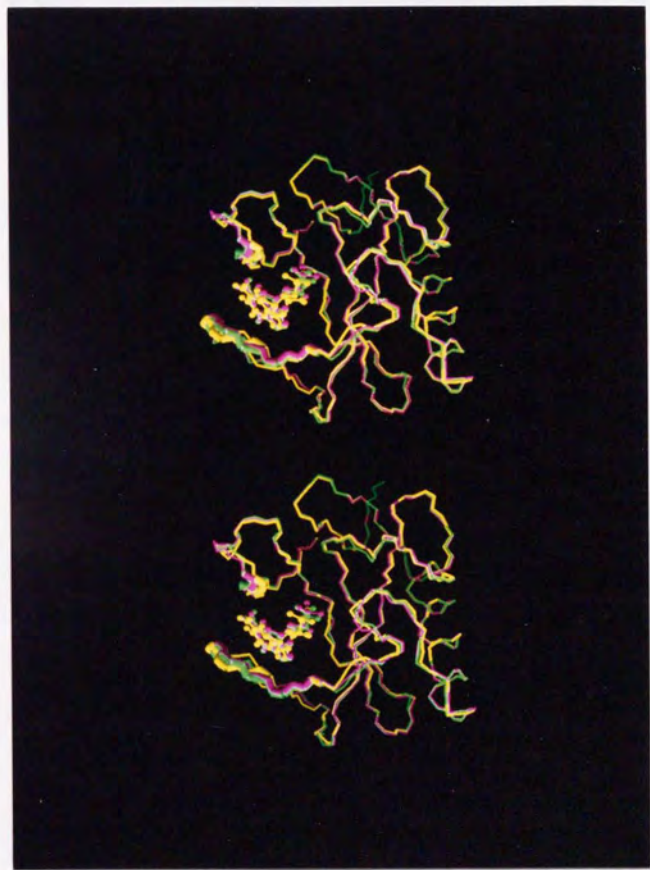


図6.1 野生型（黄）およびGlu58Asp（緑）、Glu58Ala（赤）変異体の3'-GMP複合体の立体構造
 酵素分子は主鎖のみ表示、基質結合部位は太線で、3'-GMPは棒球表示で示す。

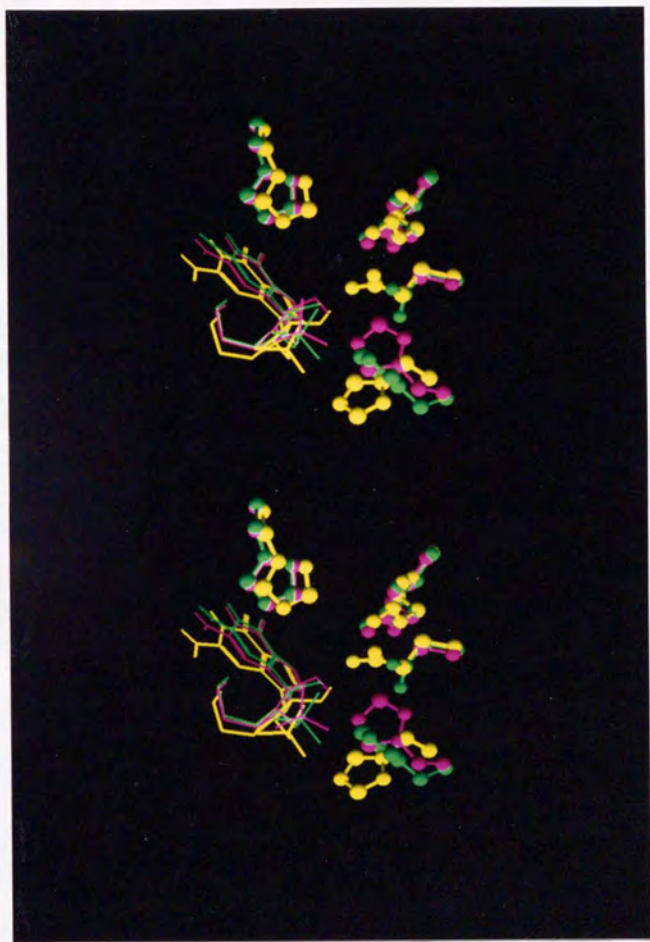
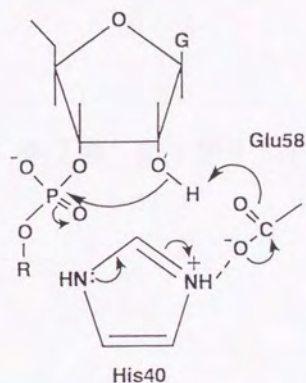


図6.2 野生型（黄）およびGlu58Asp（緑）、Glu58Ala（赤）変異体の3'-GMP複合体の立体構造
酵素の触媒残基（左からHis40, Glu/Asp/Ala58, Arg77, His92）を棒球で、3'-GMPを線で示す。

A



B

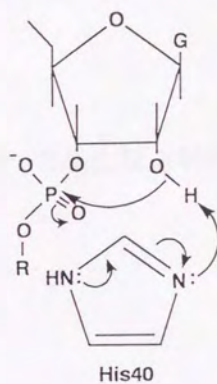


図6.3 野生型(A)Glu58Ala変異体(B)リボヌクレアーゼT₁の反応機構
 Steyaert et al., 1990による。破線はHis40とGlu58の相互作用を示す。

第7章 野生型リボヌクレアーゼT₁の高次構造解析

7.1 序

本章では野生型 RNase T₁ の 2D-NMR スペクトル解析と立体構造計算について述べる。1.4 で述べたように野生型 RNase T₁ には 2 種の isozyme, Lys25 体と Gln25 体が存在し、このうち Lys25 体の 2D-NMR スペクトルについては大部分のシグナルが帰属されている(Hoffmann & Rüterjans, 1988; Schmidt et al., 1991)。(Gln25 体も基質アナログとの複合体について一部帰属がなされている; Shimada & Inagaki, 1990) また両者間で k_{cat} , K_m はほとんど変わらないが、分子構造は Lys25 体の方が 0.9kcal/mol 安定である(Shirley et al., 1989)。アミノ酸置換の効果は X 線結晶構造解析からは識別出来ず(Sugio et al., 1988)、Kiefhaber らはエネルギー極小化計算により Lys25 と Glu28 の塩橋形成の可能性を Lys25 体の安定性の要因として示唆した(1990)。この仮説を実験的に検証するため本研究では Gln25 体の NMR スペクトル解析を行い、Lys25 体と比較した。NOE から推定される二次構造はほとんど差がなく、また構造変化に対しては NOE よりも化学シフトの方が一般に敏感なため各シグナルの化学シフトの値も比較した。一方 Gln25 体の立体構造計算も帰属した距離情報に基づき現在行っている。

7.2 方法

7.2.1 NMR 測定

RNase T₁ は三共(株)より頂いた。NMR サンプルの調製は、乾燥粉末を 90% D₂O/10% H₂O に 2mM、あるいは 99.95% D₂O に 1mM になるように溶解し、少量の acetic acid-*d*₄ で溶液を pH4.4 に合わせるにより行った。

2D-¹H NMR スペクトルは全て Bruker AMX600 分光計を用いて 32°C で測定した。DQF-COSY, TOCSY, NOESY は 2.2.2 と同様 TPPI モードで測定した。スペクトル幅は両周波数軸とも 10000Hz(90% D₂O/10% H₂O)または 8333Hz(D₂O)に設定し、512(t1)x2048(t2)データポイントからなる FID(自由誘導減衰)を得た。積算回数は 64 回で繰り返し待ち時間 1.5s の間の presaturation(選択的照射)により溶媒のシグナルを除去した。混合時間は、30~80ms(TOCSY)または 150ms(NOESY)で測定した。ウィンドウ関数としてサイン自乗関数をかけて t1 方向に 2 倍ゼロフィルした後フーリエ変換し、最終的に 1024(t1)x2048(t2)ポイントからなる複素データマトリックス(スペクトル)を得た。重水素交換の実験は、重水中に各々 0 日, 1 日, 6 日, 12 日放置した試料の NOESY スペクトルを測定することにより行った。

7.2.2 スペクトルの解析

2D-¹H NMR スペクトルのシグナルの帰属は Wüthrich の方法(1986)に従った

(4.2.3 で詳述)。

7.2.3 立体構造計算

距離情報の抽出と立体構造計算についても4章と同様の方法で行った。但し分子量1万以上の本酵素ではシグナルの増加とともに、2D-NMR スペクトル上複数の cross peak が同一の化学シフトを有するようになり、特に全 NOE シグナルを 2D NOESY のみを用いて一意的に帰属することは不可能であった。これら化学シフトの重複の中には、シグナル数の増加によりたまたま重なったため、何らかの方法で立体構造がわかれば(結晶中の構造など)一意的に帰属しうる場合と、例えば同一残基と隣接残基の化学シフトが一致し、2つの NOE が重なったため NOE 強度を2つの距離対に割り振ることが不可能な場合とがある。前者については、帰属の確定した NOE を順次距離情報に加えて多段階の Distance Geometry 計算を繰り返す方法(Hatanaka et al., 1994)を用いた。後者については、モデル構造から緩和行列法により NOE 強度を計算し、実測値と合うまで計算を繰り返す方法を採用した。緩和行列解析では2スピン近似ではなく多スピン近似を行うため、スピン拡散等の影響を考慮せずに NOE をより定量的に評価でき、その結果より精密な立体構造を求め得るという利点もある。以上の方法を組み合わせた全体としての構造計算の手順を図7.1に示す。

NOESY のピーク強度は Felix のピークピッキングルーチンを用いて読み取った。Distance Geometry 計算には EMOSS を使用した。また核間距離と NOE 強度の計算には CORMA 及び MARDIGRAS(UCSF)を用いた。

7.3 結果と考察

7.3.1 シグナルの帰属

シグナルの帰属は4章と同様にして行った。特に本酵素では Lys25 体の $2D-^1H$ NMR スペクトルの帰属が既になされていたため(Hoffman & Rüterjans, 1988)、Lys25 体の値を参照して大部分の帰属を行い、従来とは異なる箇所、不明な箇所について詳細な解析を行った。最終結果を表7.1に示し、以下で具体的な相違点や帰属の際に問題になった点について述べる(なお表7.1中下線を付した値は Lys25 体の値と 0.1ppm 以上異なるものを表す)。

Cys2 は未帰属であったが、Gln25 体の Glu58 カルボキシメチル化誘導体(CM-RNase T_1)の帰属(Miyano et al., unpublished results)との比較およびスピンの解析より新たに帰属した。Tyr4 と Ser12 の β プロトンも未帰属であったが隣接残基と

の NOE や重水中のスペクトルにより新たに帰属できた。Ser8 と Ser14 の α, β プロトンの化学シフトは非常に近く、かつ Lys25 体と値が異なったため、隣接残基を含む連鎖帰属により確定した。Val16 α プロトンと Ser17 アミドプロトン間には NOE が観測されなかったが、他の隣接残基 NOE より決定した。Gln20 γ プロトンの値は大きく異なり、Gln20 と Tyr24 の α プロトンがほぼ重なるため、当初 Tyr24 β プロトンと Gln20 γ プロトンを混同していたが、CM-RNase T₁ との比較および DQF-COSY スペクトルの解析により、正しい帰属を与えることが出来た。Tyr24 および Tyr56 側鎖の芳香族プロトンをスピン系の同定により新たに帰属した。Gln25 は当然のことながら、 α プロトン、側鎖のプロトンともに Lys25 と大きく異なっており、対応する位置の近くに cross peak は見出されなかった。このため Gln25 (α, γ) のピークを Glu46 (α, γ) のピークと混同していたが、CM-RNase T₁ との比較等により正しく帰属を行った。なお Lys25 と比べて Gln25 の 2 つの β プロトンは縮重が解け、かつ γ プロトンと化学シフトの大小が入れ替わっているが、これは DQF-COSY スペクトルにより確認した。Asp29 と Gly30 が連鎖帰属でつながらなかったが、Gly30 と Gly74 の (α, NH) のピークを入れ替えることにより矛盾なく説明できた。なお Asp29 と Glu31 の α プロトンは溶媒シグナルに重なり、判別不可能のため重水中のスペクトルを参照して確認した。Thr32 と His40 の α プロトン、アミドプロトンはともに重なり、Thr32 (α, β) および (α, γ) のピークはともに観測されなかったが、残基内 NOE および (β, γ) のピークにより同定した。Ser35, Asn36, Asn44 は未帰属であったが (Asn36 と Asn41 のアミドプロトンは後に帰属された; Schmidt et al., 1991)、隣接残基との NOE および CM-RNase T₁ との比較により新たに帰属した。Tyr38 α プロトンも溶媒シグナルに重なって、特に Tyr38 β プロトンとのピークが判別不可能であるが、重水中での Tyr38 アミドプロトンとのピークや隣接残基との NOE により帰属できた。Pro39 δ プロトンの値が大きく異なるため、当初 Thr91 β プロトンと混同していたが、スピン系の同定により正しく帰属することが出来た。Lys25 体において、Lys41 側鎖の γ プロトン以降は未帰属であったが、CM-RNase T₁ との比較により新たに帰属することが出来た。Tyr42 β プロトンも、Asn83 β プロトンと混同していたが、スピン系の同定により正しく帰属した。Glu46 と Leu62 の β プロトンは縮重が解けて一方のシグナルを見落としていたが、CM-RNase T₁ との比較により見出し得た。Pro55 と Glu102 の α プロトンは重なるため側鎖の帰属が困難であったが、隣接残基との NOE や Pro 残基の特徴を利用して区別した。Tyr57 と Asp66 の α プロトンは溶媒シグナルに重なって観測できなかったが、重水中のスペクトルより判別した。こうして得られた帰属を全体として見直し、論理的に矛盾がないことを確認した。図 7.2 に DQF-COSY の

fingerprint 領域と連鎖帰属の結果を示す。

Lys25 体の帰属と比べて、Cys2, Tyr4 β , Asn9 α , Ser12 β , Tyr24ring, Ser35, Asn36 α β , Lys41 γ δ ϵ , Asn44 α β , Pro55 δ , Tyr57 β ring, Glu58 β γ , Pro73 α , Arg77 β の各プロトンシグナルを新たに帰属した (逆に Ser63 β は帰属できなかった)。一方 CM-RNase T₁(Gln25 体の誘導体) と比べると Ser17 β の帰属が出来た分、Pro73 β γ δ と Arg77 γ δ の帰属が出来なかった (スペクトル上対応する位置近くにシグナルが存在しなかった)。また Gly70 から Ser72 までは依然として未帰属であるが、この箇所は結晶構造中ループを形成しており、元来シグナルが存在しないと考えられる。

7.3.2 二次構造

連鎖帰属の結果に基づき近位、中位の NOE を抽出した。図 7.3 に NOE connectivity と、それから推測される二次構造を示した。重水素交換実験に基づく非交換性アミドプロトンも同時に記したが、非交換性アミドプロトンの位置は以下の方法で推測した α ヘリックス、 β シートの箇所に一致した。 α ヘリックスは $d_{NN}(i, i+1)$, $d_{\alpha\beta}(i, i+3)$, $d_{\alpha N}(i, i+3)$ および $d_{NN}(i, i+2)$ の connectivity で特徴づけられ、Ser13~Asp29 の箇所がこれに相当する。なお $d_{\alpha N}(i, i+4)$ が Ser12~Glu28 の領域で断続的に観測されるのに対し、 $d_{\alpha N}(i, i+2)$ はヘリックス領域の一部でしか観測されない。これにより RNase T₁ のヘリックスが 3_{10} -ヘリックスではなく、通常の α ヘリックスであることがわかり、結晶構造の場合と合致した。一方 $d_{\alpha N}(i, i+1)$ の強い NOE は β ストランドに特徴的である。またこの領域では $d_{\alpha N}(i, i+1)$ が $d_{\alpha N}(i, i)$ より強い。こうして図 7.3 の 7 つの β ストランドを同定した。これらストランド間の NOE および重水素交換の実験により 2 つの反平行 β シート構造を決定した (図 7.4)。このうち N 端側の 2 つのストランドが 1 つの β シートを、残る 5 つのストランドがもう 1 つの β シートを形成している。得られた二次構造分布は β シートの位置も含めて Lys25 体 (Hoffman & Rüterjans, 1988) と同一であった。但し結晶中の構造においては、N 端側の 2 つの β ストランドは互いに離れており、 β シートを形成していない。

図 7.5A に α プロトンの化学シフトの値をランダムコイル値からのずれで表した。大体 α ヘリックスの領域では高磁場シフト、 β ストランドの領域では低磁場シフトしており、ほぼ予想された結果となった (Wishart et al., 1991)。

RNase T₁ には Pro が 4 残基存在する。このうち Pro73 は Ser72 が未帰属のため X-Pro の帰属は不可能であったが、Pro39, Pro55 は前残基との間に $d_{\alpha\alpha}(i, i+1)$, $d_{\beta\alpha}(i, i+1)$ の NOE が観測され、Pro60 は $d_{\alpha\alpha}(i, i+1)$ の NOE が観測された。この結

果 X-Pro のコンフォメーションが、前者では *cis*、後者では *trans* 配置をとっていることがわかった。この配置は結晶構造と同一であった。

7.3.3 Lys25 体との比較

上述のように二次構造分布において Lys25 体と Gln25 体に差異は見られなかった。一般に化学シフトは NOE などに比べ局所的な構造変化に対して敏感であり、Lys25 から Gln25 の置換の影響を調べるのに適している。帰属した全プロトンに対して、Lys25 体の化学シフトとの比較を行い、0.1ppm 以上差異のあるものについては表 7.1 に下線を付して表した。また主鎖 α プロトンとアミドプロトンに関しては、Lys25 体との差を残基番号順に並べて表示し、一次構造上影響を受けやすい部位を示した (図 7.5B)。

このうち化学シフトの変化が顕著なのは、Lys/Gln25~Gly30 の α ヘリックスの C 端領域、Asn43~Ser51 の基質結合領域、(Thr5, Ser12, Ser13) の N 端側 β シート領域 (図 7.4) の 3 領域であった。その他 Cys103 にも影響が現れているが、これはジスルフィド結合により Cys103 が N 端側 (Cys6) とつながっているためであると考えられる。

α ヘリックス C 端領域の中で、直接影響を受ける Lys/Gln25 近傍は別とすると、Asp29 の化学シフトの変化が大きい。7.1 で述べたように Lys25 体は Gln25 体に比べて若干分子が安定であるが、Kiefhaber らはエネルギー極小化計算により Lys25 と Glu28 の塩橋形成が要因であると結論づけた (1990)。Lys25 の近傍には酸性残基として Glu28, Asp29, Glu31 が存在するが、化学シフトの比較で見ると Glu28 はあまり変化がなく、Asp29 が主鎖側鎖ともに Lys25→Gln の置換の影響を最も受けている。従って化学シフトの比較から判断する限り、Lys25 の架橋の相手は Asp29 であると考えられる。Kiefhaber らが架橋の相手として Glu28 を考えた根拠は明らかにされておらず、また得られた構造においても Lys25-Glu28 の距離のみが言及され (2.7 Å)、Lys25-Asp29, Lys25-Glu31 の距離については触れられていない。このため同様の方法で分子動力学・エネルギー極小化計算を行ったところ、Lys25 側鎖は Glu28 よりむしろ Asp29 および Glu31 の近くに位置する構造が得られた。また conformation search 法により Lys25 が Glu28 近くに位置するコンフォメーションも得られたが、このときのポテンシャルエネルギーは local minimum にあり、エネルギー最小値をとるのは Lys25 が Glu31 近傍に位置する構造であった (Suzuki et al., unpublished results)。従って、Kiefhaber らがエネルギー極小化計算により得た Lys25-Glu28 架橋の構造は local minimum の構造であり、Lys25 の架橋の相手は Asp29 または Glu31 であると考えられる。

一方基質結合部位や N 端 β シート領域も化学シフトに影響を受けるが、これらの領域は柔軟性に富むとされており(Heinemann & Sanger, 1982)、構造的変化はあまりないと考えられる。また His40, Glu58, Arg77, His92 の触媒残基の化学シフトも Lys25→Gln による影響がない。これらは、Lys25 体と Gln25 体とで酵素活性がほとんど同一である(Shiley et al., 1989; Kiefhaber et al., 1990)ことと合致する。

7.3.4 距離情報の抽出と立体構造計算

RNase T₁ の立体構造を決定するため、連鎖帰属により確定した化学シフトの値から NOE ピークを帰属したところ、一意的に決定出来たのは全体の約 8% (全体 900 個のうち 80 個)であった。このため連鎖帰属で用いた残基内及び隣接残基間の NOE は既に確定したものとして、距離制限に加え Distance Geometry 計算を行った (計 292 個の NOE)。収束性がよく violation が少ない構造間では folding の topology が一致した。この構造をもとに再び NOE を帰属し、一意的に決定したものについては新たに距離情報に加えて Distance Geometry 計算を繰り返した (計 330 個の NOE, 2 巡目)。以降図 7.1 に示した手順に基づき構造計算を繰り返しており、4 段階目に入っている。現在得られている構造を主鎖のみ図 7.6 に示した (計 418 個の NOE)。図 6.1 の結晶構造と比較すると二次構造セグメントの配置や folding の topology はほぼ出来上がっているが、細部特に基質結合部位 (図 7.5 上部) の構造が出来上がっておらず、分子全体がより広がっている。

表7.1 Gln25体野生型RNase T₁の化学シフト

下線は本文参照

Residue	Chemical shifts			
	NH	α CH	β CH	Others
Ala1	4.03	1.43		
Cys2	8.56	4.50	2.77,	2.99
Asp3	8.46	4.28	2.45,	2.76
Tyr4	8.37	4.73	2.66,	2.72 C2,6H 6.78; C3,5H 6.62
Thr5	<u>9.09</u>	5.01	4.02	γ CH ₃ 1.01
Cys6	8.95	5.13	3.00,	3.08
Gly7	9.42	3.62,	4.01	
Ser8	8.95	4.40	3.80,	3.87
Asn9	8.04	4.02	1.99,	2.80
Cys10	8.31	4.88	2.88,	3.12
Tyr11	9.22	5.27	2.68,	3.14 C2,6H 6.85; C3,5H 6.36
Ser12	<u>9.40</u>	5.28	4.12,	4.51
Ser13	<u>10.14</u>	4.25	3.94,	3.98
Ser14	8.28	4.40	3.91	
Asp15	8.20	4.40	3.02,	3.43
Val16	7.93	3.42	2.14	γ CH ₃ 0.66, 0.70
Ser17	8.59	4.12	3.96	
Thr18	8.43	3.93	4.24	γ CH ₃ 1.22
Ala19	7.62	4.32	1.64	
Gln20	9.05	3.35	1.91	γ CH ₂ <u>1.69</u> , 2.06
Ala21	8.01	3.84	1.40	

表7.1 (続き)

Ala22	7.11	3.99	1.54	
Gly23	7.28 1.90,	2.00		
Tyr24	8.58	3.37 1.93,	2.25	C2,6H 6.78; C3,5H 6.75
Gln25	<u>7.55</u>	<u>3.67</u> <u>1.93</u> ,	<u>2.06</u>	γCH_2 <u>2.21</u>
Leu26	<u>6.94</u>	3.90	1.42	γCH 1.56; δCH_3 0.80, 0.82
His27	7.79	4.34 2.69,	3.25	C2H 8.21; C4H 6.60
Glu28	8.49	3.49	1.80	γCH_2 1.94
Asp29	<u>7.61</u>	4.67 2.74,	<u>2.88</u>	
Gly30	7.65 3.78,	3.84		
Glu31	7.99	4.72 1.78,	<u>2.29</u>	γCH_2 2.08
Thr32	8.09	5.32	3.93	γCH_3 1.09
Val33	9.75	4.79	2.03	γCH_3 0.98, 1.06
Gly34	8.67 4.18,	4.89		
Ser35	9.17	4.26		
Asn36	8.57	4.84 2.55,	2.75	
Ser37	7.75	3.64 <u>3.86</u> ,	3.97	
Tyr38	8.79	4.77 2.90,	3.40	C2,6H 7.04; C3,5H 6.75
Pro39		5.63	2.67	γCH_2 2.18; δCH_2 <u>4.34</u>
His40	8.08	5.32 3.44,	3.80	C2H 8.14; C4H 7.46
Lys41	9.26	4.21	1.78	γCH_2 1.15, 1.37; δCH_2 1.76; ϵCH_2
2.96				
Tyr42	8.76	4.97 2.37,	<u>2.71</u>	C2,6H 6.92; C3,5H 6.75
Asn43	8.50	4.23 1.82,	1.99	
Asn44	<u>6.04</u>	4.31 1.97,	3.30	
Tyr45	8.50	4.23 2.83,	2.96	C2,6H 7.09; C3,5H 6.80
Glu46	<u>8.85</u>	3.65 0.88,	<u>1.06</u>	γCH_2 <u>2.86</u>

表7.1 (続き)

Gly47	7.30	3.46,	3.58	
Phe48	<u>8.30</u>	4.28	<u>1.51</u> , <u>2.11</u>	C2,6H 7.10; C3,5H 7.24; C4H 6.90
Asp49	8.75	4.67	<u>2.70</u> , 2.90	
Phe50	<u>7.78</u>	5.07	2.96, 3.03	C2,6H 6.66; C3,5H 6.55; C4H 6.50
Ser51	9.29	4.50	3.95, 4.04	
Val52	6.94	4.71	2.14	γ CH ₃ 0.64, 0.82
Ser53	8.97	4.39	3.88, 3.98	
Ser54	8.00	2.91	3.26, 3.60	
Pro55		4.12	1.81, <u>2.20</u>	γ CH ₂ <u>1.89</u> , <u>2.00</u> ; δ CH ₂ 3.55
Tyr56	8.09	5.06	2.81, 3.15	C2,6H 6.80; C3,5H <u>6.70</u>
Tyr57	8.83	4.66	2.71	aromatic 6.41
Glu58	8.83	5.09	1.62, 1.80	γ CH ₂ 2.17
Trp59	8.47	5.28	3.11, 3.34	N1H 9.13; C2H 6.57; C4H 7.45 C5H 7.15; C6H 7.22; C7H 7.63
Pro60		4.19	0.39, 1.91	γ CH ₂ -0.46, -0.90; δ CH ₂ 1.18, 2.48
Ile61	7.15	4.24	1.12	γ CH ₂ 0.47, 1.19; γ CH ₃ 0.20; δ CH ₃ - 0.01
Leu62	8.21	4.82	<u>1.55</u> , 2.18	γ CH 1.43; δ CH ₃ 0.75, 0.85
Ser63	8.99	4.29		
Ser64	7.69	4.29	<u>3.90</u> , 4.03	
Gly65	7.96	3.97,	4.38	
Asp66	7.58	4.60	2.37, 2.63	
Val67	8.59	3.93	1.97	γ CH ₃ 1.00, 1.16
Tyr68	9.26	3.93	2.23	
Ser69	8.19	4.40	3.61, 3.96	
Gly70				

表7.1 (続き)

Gly71				
Ser72				
Pro73	4.07			
Gly74	7.75	3.83,	3.95	
Ala75	8.68	4.51	1.48	
Asp76	8.77	5.48	2.56,	2.99
Arg77	9.52	4.88	1.15	
Val78	9.01	4.40	1.87	γCH_3 <u>0.46</u> , 0.99
Val79	8.22	5.12	1.15	γCH_3 -0.05, 0.28
Phe80	8.20	5.69	2.55,	3.11 C2,6H 7.37; C3,5H 6.75; C4H 6.48
Asn81	8.53	6.09	2.60,	4.23
Glu82	7.74	4.18	2.15,	2.24 γCH_2 2.50, 2.55
Asn83	7.37	4.95	2.48,	3.05
Asn84	8.21	3.73	0.18,	2.61
Gln85	7.94	4.38	1.84,	<u>2.22</u> γCH_2 2.06
Leu86	8.45	3.98	1.61	γCH 1.00; δCH_3 0.62, 0.73
Ala87	9.08	4.20	-0.05	
Gly88	7.07	3.70,	3.72	
Val89	8.03	4.55	1.40	γCH_3 -0.02, 0.64
Ile90	8.76	5.00	1.59	γCH_2 0.18, 0.40; γCH_3 0.20; δCH_3 -
0.87				
Thr91	9.42	5.80	4.08	γCH_3 1.20
His92	9.28	4.91	2.98,	3.41 C2H 7.50; C4H 7.00
Thr93	9.35	<u>3.85</u>	4.02	γCH_3 1.17
Gly94	8.82	3.63,	4.17	
Ala95	7.90	4.51	1.30	

表7.1 (続き)

Ser96	8.40	4.56	3.82	
Gly97	8.60	3.74		
Asn98	8.69	4.61	2.56, 2.86	
Asn99	7.96	4.92	3.12	
Phe100	8.87	5.18	2.75, 3.00	C2,6H 7.12; C3,5H 6.92; C4H 7.17
Val101	9.38	4.85	2.32	γCH_3 0.82, 1.00
Glu102	8.70	4.13	1.66, 2.00	γCH_2 <u>1.74</u>
Cys103	8.70	4.84	2.75, 3.29	
Thr104	8.46	4.40	4.44	γCH_3 1.20

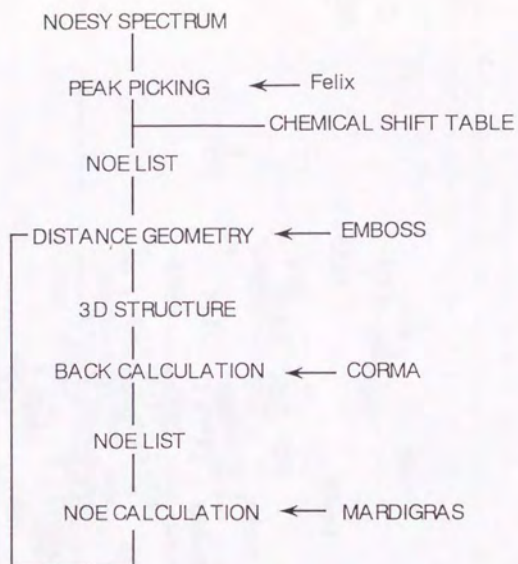


図7.1 立体構造の計算手順

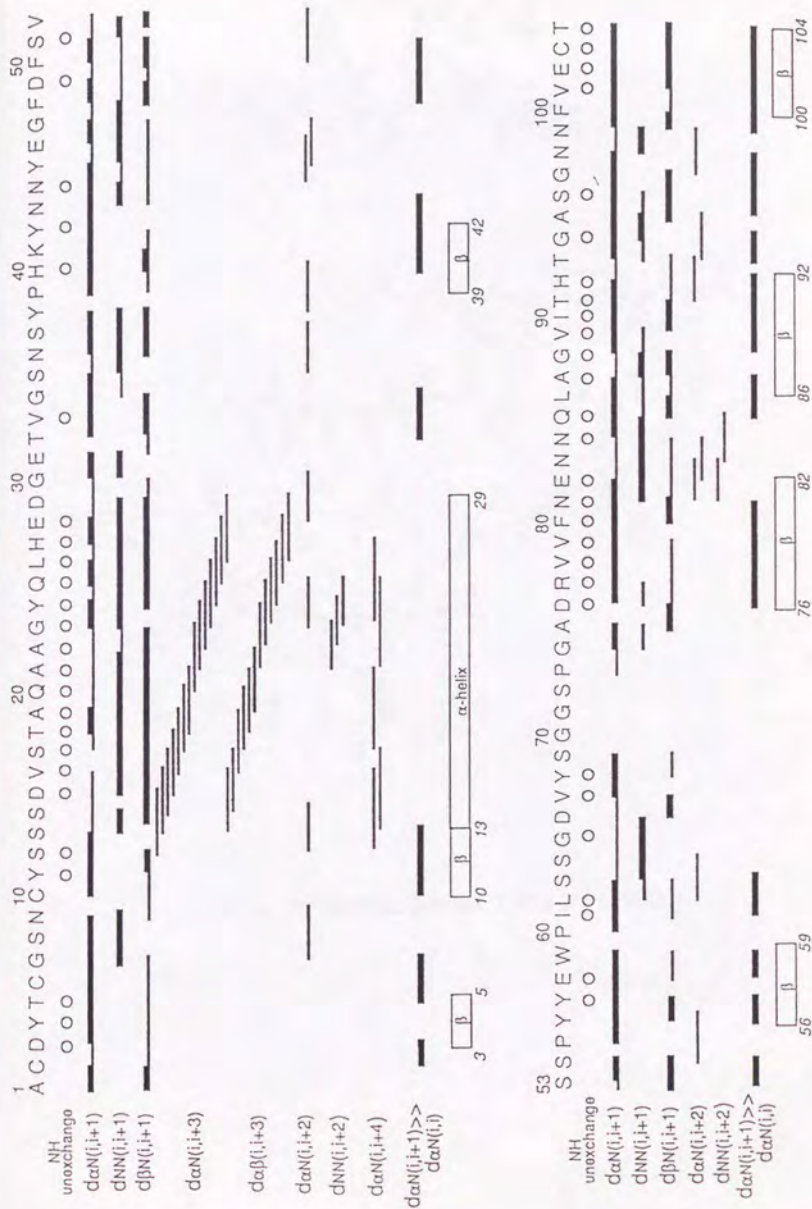


図7.3 野生型Gln25体RNase T₁のNOE connectivityと二次構造
NH unexchangeは32℃で24時間放置しても交換しないアミドプロトンを示す

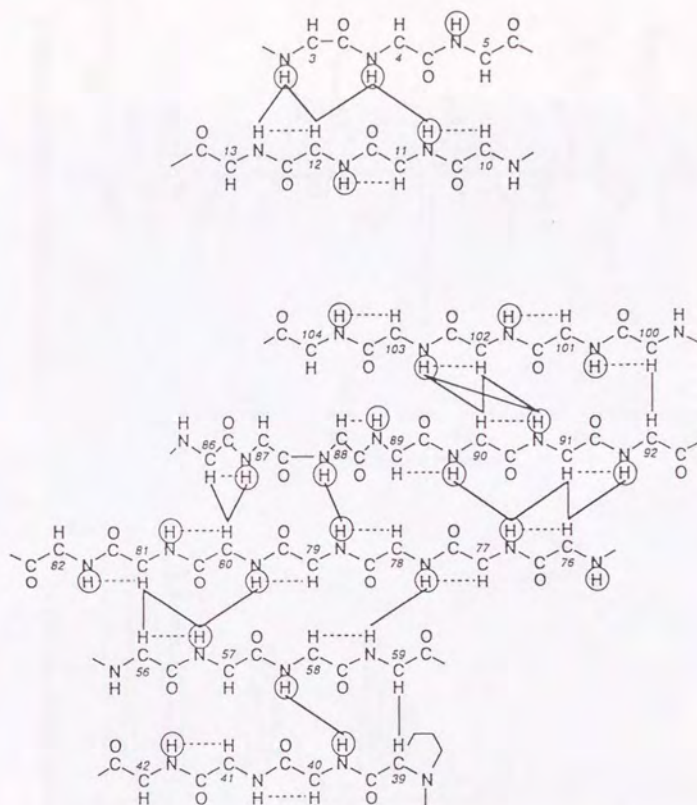


図7.4 野生型Gln25体RNase T₁の β シート構造

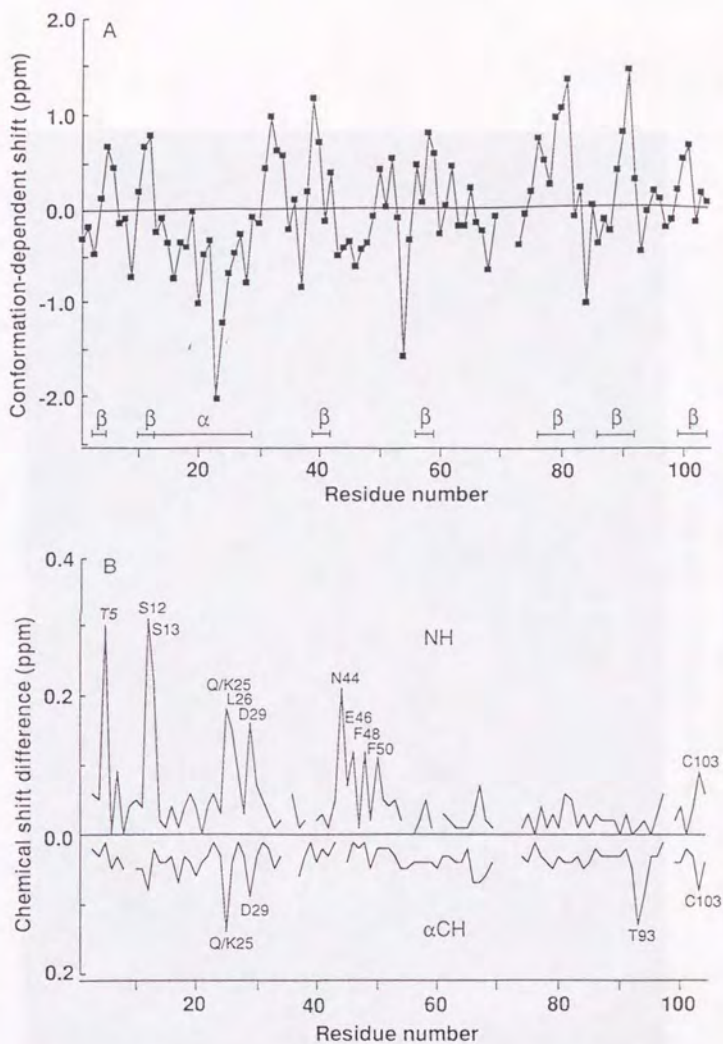


図7.5 (A) 化学シフトの二次構造依存性. 縦軸はアミドおよび α プロトンの各ランダムコイル値(Bundi & Wuthrich, 1979)からの差を示す. (B) Lys25体との比較. 縦軸はGln25体とLys25体(Hoffmann & Ruterjans, 1988)のアミドおよび α プロトンの化学シフトの差を示す.



図7.6 野生型Gln25体RNase T₁の計算経過 (preliminary results)
 418個のNOEをもとにdistance geometryで得た構造を主鎖のみ示す。
 結晶構造は図6.1参照

第8章 カルボキシメチル化リボヌクレアーゼ T_1 の

熱安定性の解析

8.1 序

本章では RNase T₁ とその Glu58-カルボキシメチル化誘導体の熱変性過程の解析について述べる。RNase T₁ をヨード酢酸で処理すると Glu58 の側鎖が特異的にカルボキシメチル化され(Takahashi et al., 1967)、酵素は基質結合能を保ったまま失活する(Takahashi, 1972)。Glu58 のカルボキシメチル化により側鎖は 4 Å 長くなるだけで(-COO⁻→-COOCH₂COO⁻)、電荷分布も含めて一次構造上他の変化はない。失活の機構として CM-Glu58 と Arg77 の側鎖間の塩橋形成が¹³C NMR の pH 滴定により示唆され(Inagaki et al., 1981)、分子モデリングの結果はこの仮説を裏付けた(Tanokura et al., 1993)。

RNase T₁ の変性実験については 1.4 で述べたようにこれまでに CD や蛍光, DSC 等の方法を用いて多くの研究がなされ、熱または変性剤の添加により可逆的に変性すること、変性過程は二状態遷移モデルで熱力学的に記述できることが知られている(Oobatake et al., 1979; Pace et al., 1988; Kiefhaber et al., 1990)。また上記カルボキシメチル化誘導体についても、カルボキシメチル化により変性温度が若干増大することが 278nm の吸光度変化によって報告されている(Thakhashi & Moore; 1982)。これらの実験に用いられた方法はいずれも分子全体のグローバルな情報を提供している。

一方当研究室では、Gln25 体野生型 RNase T₁ (7 章) と同様そのカルボキシメチル化誘導体についても NMR による解析を進めており(Miyano et al., unpublished results)、シグナルの帰属は既に完了している。これら個々のシグナルを追うことにより分子の局所的な構造情報が得られる。本研究では Asn81 αプロトンと Ile90 δメチルプロトンという分子内の離れた 2 点のシグナルをモニターすることにより、RNase T₁ およびそのカルボキシメチル化誘導体の熱変性過程を原子レベルで追跡した。また得られた結果をもとに分子モデリングを行い、カルボキシメチル化に伴う安定性増大の分子論的機構について考察した。

8.2 方法

8.2.1 NMR 測定

RNase T₁ は 7.2.1 と同様にして入手した。CM-RNase T₁ は文献(Takahashi et al., 1967)に従って合成されたものを用いた。NMR サンプルは各 RNase T₁ 乾燥粉末を 99.95% D₂O に 1~2mM になるように調製した。

$1D-^1H$ NMR スペクトルは Bruker AMX600 分光計により種々の温度で測定した。スペクトル幅は 10kHz に設定し、32K データポイントから成る FID を得た。待ち時間 1.0s を置いて 64 回積算した。3Hz の line broadning をかけた後 absolute value モードでフーリエ変換した。化学シフトは DSS のシグナルを基準とした。なおデータ処理とスペクトル表示は IRIS Elan および Indigo² ワークステーション上にて Felix を用いても行った。

8.2.2 データ解析

熱変性曲線は、Asn81 α プロトンと Ile90 δ メチルプロトンのシグナルのピーク面積を測定温度に対してプロットして作成した。これらのシグナルの帰属は $2D-^1H$ NMR スペクトルの解析結果より得た (7 章および Miyano et al., unpublished results)。変性時のエンタルピー変化 ΔH は、下記の van't Hoff の関係式に基づき、絶対温度 T における変性の平衡定数の自然対数を $1/T$ に対してプロットすることにより算出した。

$$\ln K = -\Delta H/RT + \Delta S/R$$

但し R は気体定数で ΔS は変性時のエントロピー変化である。 K の値は native 分子種と変性分子種の比として、熱変性曲線から求めた。変性中点温度とエンタルピー変化の標準偏差 (誤差) は、線形最小自乗法により上式から直接見積もった。

8.2.3 立体構造表示

intact および CM-RNase T_1 の 3 次元構造の構築は 6.2 と同様の方法で行った。但し CM-RNase T_1 については、PDB ファイルより初期構造を作る際さらに Glu58 を CM-Glu58 に置換した。全ての計算は 7 章の実験データに依存せずに独立に行った。計算および 3 次元構造の表示は BIOGRAF を用いて IRIS Elan および Indigo² ワークステーション上で行った。

8.3 結果

8.3.1 NMR スペクトルの特徴

図 8.2 に intact RNase T_1 の native 状態と変性状態および CM-RNase T_1 の native 状態における NMR スペクトルを示す。CM-RNase T_1 の変性状態のスペクトルは

intact RNase T₁ の変性状態のスペクトルと類似していた(データ不記載)。native 状態のスペクトル(図 8.2A,B) 中、Ile90 δメチルプロトンのシグナル(-0.8ppm 付近の矢印)と Asn81 αプロトンのシグナル(-0.8ppm 付近の矢印)は他のシグナルから分離して観測され、また化学シフトの値もランダムコイル状態の値(Ile δメチルは 0.89ppm、Asn αは 4.75ppm; Wuthrich, 1986) からかなりシフトしていた。このためこれらのシグナルは native 状態のプローブとなりうる。図 3 に種々の温度におけるこれらのシグナル付近のスペクトル拡大図を示す。intact RNase T₁ において、Asn81 αプロトンのピーク強度は、温度の上昇とともに Ile90 δメチルプロトンと同様な減衰の仕方をしていた(図 8.3A)。図 8.3A の他のシグナルについても同様であり、このことは intact RNase T₁ の熱変性が非常に協同的であることを示している。CM-RNase T₁ に関しても同様であった(図 8.3B)。

8.3.2 変性曲線と熱力学的解析

変性挙動をより定量的に解析するためこれら種類のシグナルのピーク面積を測定温度に対してプロットした(図 8.4)。ピーク面積は各シグナルの常温における平均値に対して規格化することにより、native 状態にある分子のモル分率を表すようにした。図からわかるとおり、intact および CM-RNase T₁ 各々について、Ile90 δメチルプロトンと Asn81 αプロトンの変性曲線は重なって互いに区別がつかなかった(図 8.4 の●と▲および○と△)。変性中点の温度は intact RNase T₁ において $52.3 \pm 0.3^\circ\text{C}$ であり、この値は他の実験方法によって得られた値(約 55°C) とほぼ一致した(Oobatake et al., 1979; Hu et al., 1992; Yu et al., 1994)。これに対して CM-RNase T₁ の変性中点は $60.8 \pm 0.3^\circ\text{C}$ であり、intact RNase T₁ より約 9°C 高かった。

van't Hoff プロット(図 8.4 挿入)から求めたエンタルピー変化は、intact RNase T₁ で $530 \pm 40 \text{ kJ/mol}$ 、CM-RNase T₁ で $780 \pm 50 \text{ kJ/mol}$ であり、前者については以前他の方法により求められた値(pH5 において $490 \sim 520 \text{ kJ/mol}$) と一致した(Oobatake et al., 1979; Kiefhaber et al., 1990; Hu et al., 1992; Yu et al., 1994)。カルボキシメチル化により ΔH が増大することは、変性がより協同的になることを示している。

8.4 考察

8.4.1 変性過程の特徴

本研究では intact RNase T₁ と CM-RNase T₁ の熱変性過程を詳細に解析するため

Asn81 α プロトンと Ile90 δ メチルプロトンのシグナル強度を使用した。Asn81 α プロトンは主鎖の原子核であり、Ile90 δ メチルプロトンは側鎖末端に存在する。さらに Asn81 と Ile90 は二次構造上異なる β ストランドに属し(Heinemann & Saenger; 1982)、Asn81 α プロトンは Ile90 δ メチルプロトンから3次元構造上離れた位置に存在している(図 8.1A)。従ってこれら2つのシグナルは分子内の異なった部位の挙動を解析するのに適切なプローブである。これらのシグナルの熱変性曲線が合致することから(図 8.4)、intact および CM-RNase T_1 ともに、分子内の主鎖側鎖のほとんど全ての原子について変性が同時に起こると考えられる。

NMRにより得られた intact RNase T_1 の変性温度は従来のカロリーメトリーや蛍光、CD測定により得られた値(Oobatake et al., 1979; Kiefhaber et al., 1990; Hu et al., 1992; Yu et al., 1994)より若干低かった。NMR分光法は局所的な構造変化を原子レベルで観測しうのに対し、他の方法は分子全体のグローバルな性質を反映する。従ってNMRでは他の方法より敏感に低温での構造変化を検出し得たと考えられる。

8.4.2 分子構造との比較

Glu58 のカルボキシメチル化による変性温度の顕著な増大は分子の安定化を意味している。同様の現象は酵素溶液の278nmにおける吸光度の変化によっても観測されている(Takahashi & Moore; 1982)。一方 CM-Glu58 のカルボキシル基を ^{13}C で標識し、化学シフトのpH依存性を解析することにより、CM-Glu58 と Arg77 の側鎖間で塩橋が形成されることが示唆された(Inagaki et al., 1981)。CM-RNase T_1 の分子構造のモデリングはこの仮説を裏付けた(図 8.1B)。CM-RNase T_1 において、CM-Glu58 カルボキシル基の負電荷は Arg77 グアニジニウム基の正電荷と塩橋を形成できる位置(2Åの距離)に存在する。図 8.1B のように RNase T_1 は左右2つのドメインに大きく分けられ、Glu58 と Arg77 は異なったドメインに位置する。そして2つのドメイン間をペプチド主鎖が4回貫通している。CM-RNase T_1 では、CM-Glu58 と Arg77 間の塩橋形成により、ドメイン間にもう1本結合が加わることになり、これが分子の安定性増大の主要因であると考えられる。RNase T_1 の構造が塩により大きく安定化されるという事実(Oobatake et al., 1979; Pace & Grimsley, 1988; Shirley et al., 1989; Kiefhaber et al., 1990; Hu et al., 1992)はこの解釈を裏付けている。

カルボキシメチル化に伴う局所的な構造変化も安定化に寄与していると考えられる。塩橋形成の結果 β ストランドが互いに近づくように β シートの構造が変化している。ストランド間のNOEや重水素交換の実験から CM-RNase T_1 の β シートの中心部が若干堅固になっていることが見出された(Miyano et al., unpublished results)。

さらに CM-Glu58 メチレン基のまわりに疎水性コアが形成されていることがわかっていいる。実際[2- ^{13}C]CM-Glu58-RNase T₁ の ^{13}C -edited NOESY スペクトルより、His40, Tyr42, Phe100 が CM-Glu58 メチレン基により近づくことが示された (Miyano et al., unpublished results)。これら NMR に基づく解釈は、Glu58Ala 変異体が野生型よりも 3.4kJ/mol 不安定であるという事実 (Shirley et al., 1989) と矛盾しない。Glu58 から Ala58 への置換により、表面積減少に伴う疎水性相互作用の減少が、静電的相互作用とともに分子全体の不安定化に寄与していると考えられるからである。

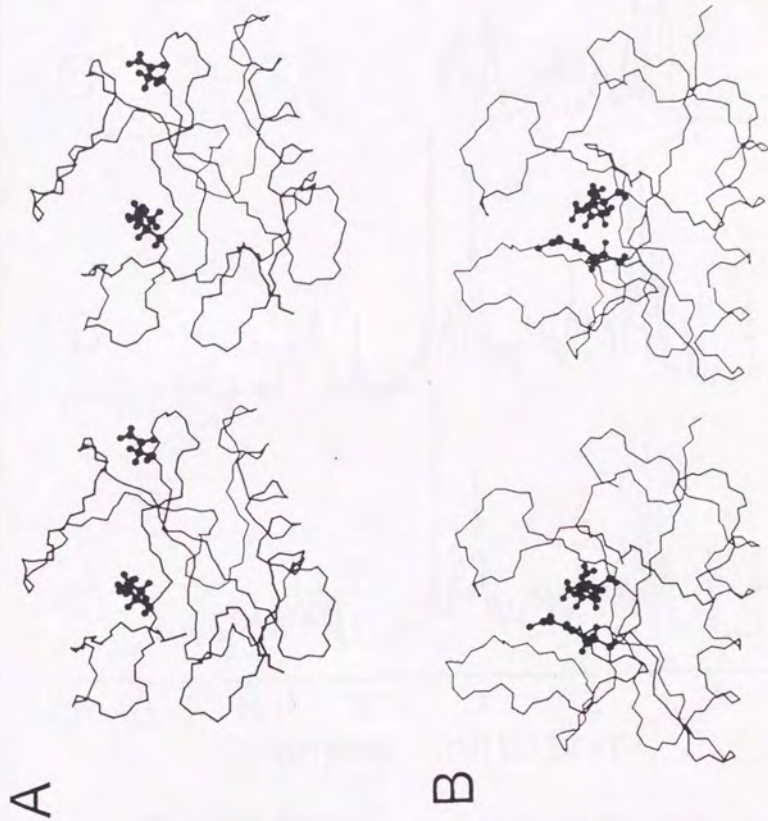


図8.1 A. intact RNase T₁の立体構造. 棒球表示は右側がAsn81, 左側がIle90の側鎖を示す.
B. CM-RNase T₁の立体構造. 棒球表示は右側がArg77, 左側がCM-Glu58の側鎖を示す.

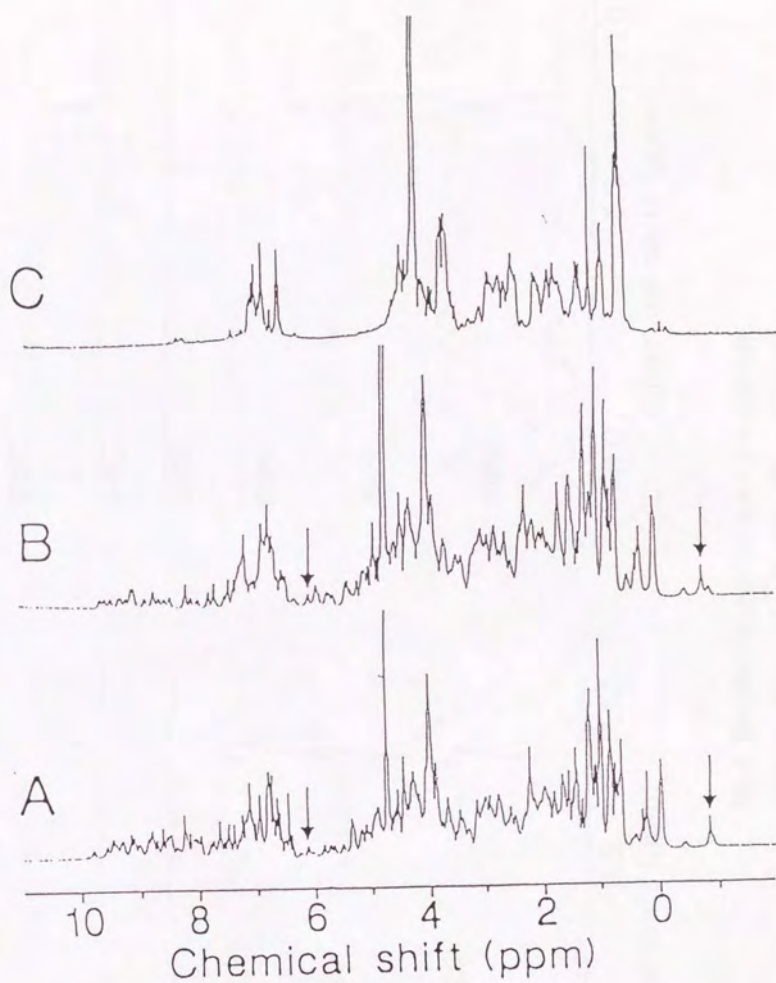


図8.2 30°C におけるintact- (A) およびCM-(B) RNase T_1 の、
 60°C におけるintact- RNase T_1 (C)の ^1H NMRスペクトル
 矢印は本文参照

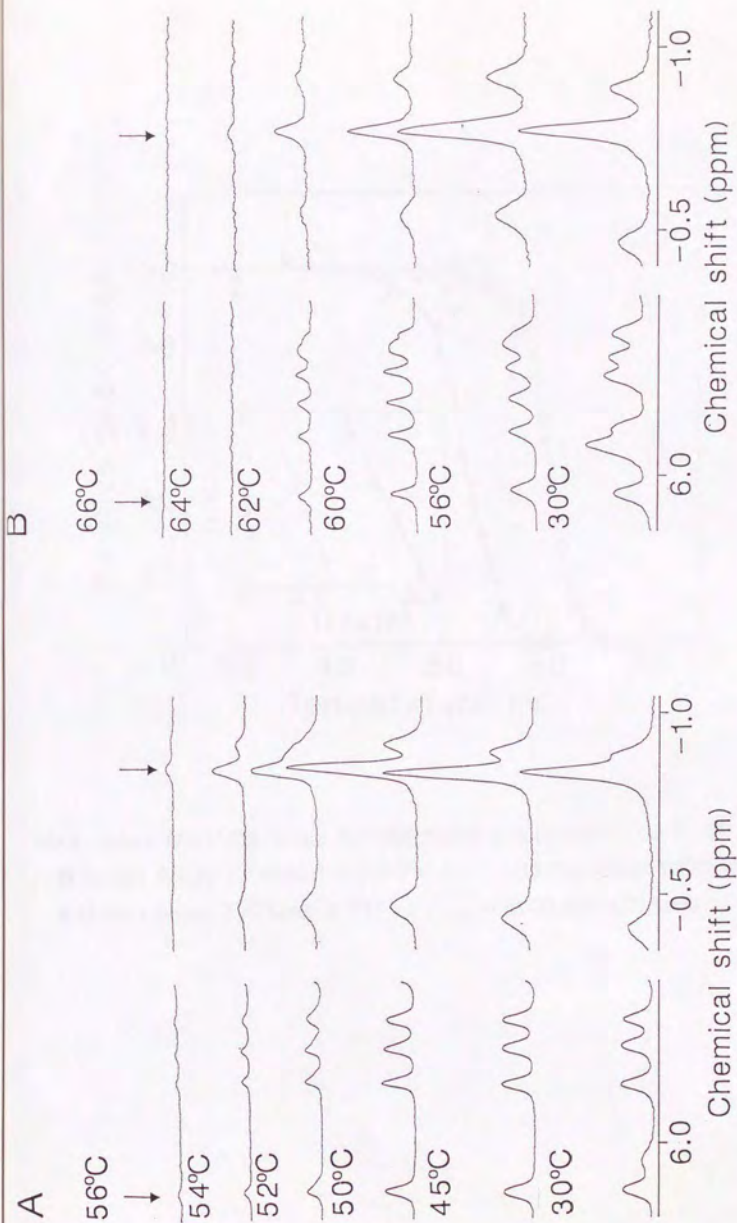


図8.3 図8.2の矢印付近のNMRスペクトル拡大図
Aはintact RNase T_1 を, BはCM-RNase T_1 を示す

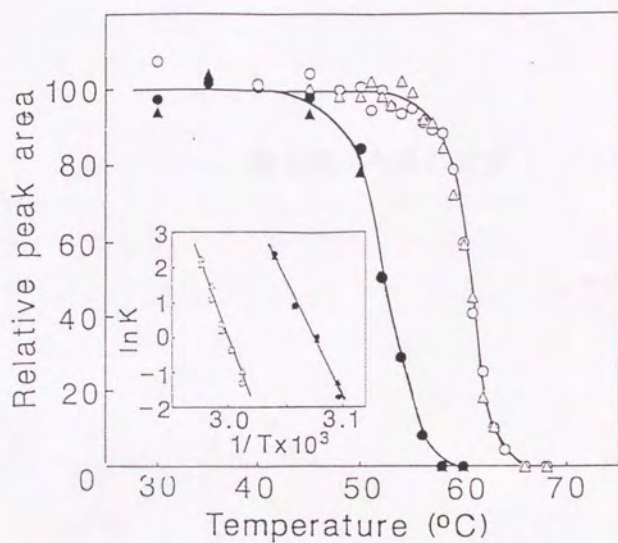


図8.4 intact-およびCM-RNase T_1 の熱変性曲線とvan't Hoffプロット（挿入図）

●はintact RNase T_1 のIle90 δ メチルプロトン, ○はCM-RNase T_1 のIle90 δ メチルプロトンを,
▲はintact RNase T_1 のAsn81 α プロトン, △はCM-RNase T_1 のAsn81 α プロトンを示す.

第9章 今後の展望

9.1 今後の展望

現在プロテアーゼ A の異種核多次元 NMR の帰属を行っている。帰属を終え次第立体構造計算に入る予定である。当研究室では本酵素の X 線結晶構造解析も独立に進めており (Sasaki et al, unpublished results)、得られた構造を結晶中の構造と比較することは興味深い。また種々の pH におけるプロテアーゼ A の $2D-^1H$ NMR スペクトルが測定済みのため、帰属が得られた段階で個々のシグナルの pH 滴定を行い、分子内の電荷分布についても考察する予定である。さらに緩和時間等の測定より分子の動的な性質も解明しうる。最終的に得られた構造から本酵素の非ペプシン型特性を明らかにしたい。

一方 RNase T_1 に関しては現在構造計算中であるが、さらに距離情報を増して精密化している。また 6 章, 7 章で述べたように本酵素は分子動力学解析に適した分子であるが、シミュレーションの結果と実験データとを比較することも必要である。

<<参考文献>>

- Abad-Zapatero, C., Rydel, T. J. & Erickson, J. W. (1990) *Proteins: Struct., Funct., Genet.* 8, 62-81.
- Anfinsen, C.B. (1973) *Science* 181, 223-230.
- Anson, M. L. (1939) *J. Gen. Physiol.* 22, 77-89.
- Arata, Y., Kimura, S., Matsuo, H. & Narita, K. (1979) *Biochemistry* 18, 18-24.
- Archer, S. J., Baldisseri, D. M. & Torchia, D. A. (1992) *J. Magn. Reson.* 97, 602-606.
- Arni, R., Heinemann, U., Tokuoka, R. & Saenger, W. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 15358-15368.
- Arni, R. K., Pal, G. P., Ravichandran, K. G., Tulinsky, A., Walz, F. G., Jr. and Metcalf, P. (1992) *Biochemistry* 31, 3126-3135.
- Athauda, S. B. P., Takahashi, T., Kageyama, T., Takahashi, K. (1991) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 175, 152-158.
- Atkinson, R. A., Saudek, V., Huggins, J. P. & Pelton, J. T. (1991) *Biochemistry* 30, 9387-9395.
- Baum, J., Dobson, C. M., Evans, P. A. & Hanley, C. (1989) *Biochemistry* 28, 7-13.
- Bax, A. & Davis, D. G. (1985a) *J. Magn. Reson.* 63, 207-213.
- Bax, A. & Davis, D. G. (1985b) *J. Magn. Reson.* 65, 393-402.
- Bax, A. & Ikura, M. (1991) *J. Biomol. NMR* 1, 99-104.
- Berka, R. M., Ward, M., Wilson, L. J., Hayenga, K. J., Kodama, K. H., Blundell, T. L., Jenkins, J. A., Sewell, B. T., Pearl, L. H., Cooper, J. B., Tickle, I. J., Veerapandian, B. & Wood, S. P. (1990) *J. Mol. Biol.* 211, 919-941.
- Bodenhausen, G. & Ruben, D. J. (1980) *Chem. Phys. Lett.* 69, 185-189.
- Boelens, R., Vuister, G. W., Koning, T. M. G. & Kaptein, R. (1989) *J. Am. Chem. Soc.* 111, 8525-8526.
- Bovey, F. A. & Yanari, S. S. (1960) in *The Enzymes* (Boyer, P. D., Lardy, H. & Myrbaeck, K., eds.) 2nd ed., Vol. 4, pp. 63-92, Academic Press, Inc., New York.
- Boyd, J., Dobson, C. M. & Redfield, C. (1985) *FEBS Lett.* 186, 35-40.
- Braun, W. & Go, N. (1985) *J. Mol. Biol.* 186, 611-626.
- Brünger, A. T., Brooks III, C. L. & Karplus M. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*

82, 8458-8462.

- Carlomagno, L. P. & Thompson, S. A. (1990) *Gene* 86, 153-162.
- Chang, C. T., Wu, C.-S. C. & Yang, J. T. (1978) *Anal. Biochem.* 91, 13-31.
- Chang, W.-J., Horiuchi, S., Takahashi, K., Yamasaki, M. & Yamada, Y. (1976) *J. Biochem.* 80, 975-981.
- Chen, Y.-H., Yang, J. T. & Martinez, H. M. (1972) *Biochemistry* 11, 412 0-4131.
- Chen, H. M., You, J. L., Markin, V. S. & Tsong, T. Y. (1991) *J. Mol. Biol.* 220, 771-778.
- Clore, G. M. & Gronenborn, A. M. (1982) *J. Magn. Reson.* 48, 402-417.
- Clore, G. M. & Gronenborn, A. M. (1983) *J. Magn. Reson.* 53, 423-442.
- Cooper, J. B., Khan, G., Tickle, I. J. & Blundell, T. L. (1990) *J. Mol. Biol.* 214, 199-222.
- Creighton, T. E. (1990) *Biochem. J.* 270, 1-16.
- Crippen, G. M. (1977) *J. Comp. Phys.*, 24, 96-107.
- Driscoll, P. C., Clore, G. M., Beress, L. & Gronenborn, A. M. (1989) 28, 2178-2187.
- Egami, F., Takahashi, K. & Uchida, T. (1964) *Progr. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.* 3, 59-101.
- Engelhard, R., Rudolph, R. & Jaenicke, R. (1976) *Eur. J. Biochem.* 67, 447-453.
- Foltmann, B. (1981) *Essays in Biochemistry*, 17, 52-84.
- Fukada, H., Sturtevant, J. M. & Quijcho, F. A. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 13193-13198.
- Fujita, S. C. & Imahori, K. (1974) In *Peptides, Polypeptides and Proteins* (Blout, E. R., Bovey, F. A., Goodman, M. & Lotan, N., eds.), pp. 217-229, Wiley, New York.
- Fujita, S. C., Go N. & Imahori, K. (1979) *Biochemistry* 18, 24-28.
- Fushman, D., Weisemann, R., Thuring, H. & Ruterjans, H. (1994) *J. Biomol. NMR* 4, 61-78.
- Gasteiger, J. & Marsili, M. (1980) *Tetrahedron* 36, 3219-3228.
- Gezesiek, S. & Bax, A. (1992) *J. Magn. Reson.* 96, 432-440.
- Glasstone, S., Laidler, K. J. & Eyring, H., *The Theory of Rate Processes*, McGraw-Hill, New York, 1941.
- Greenfield, N. & Fasman, G. D. (1969) *Biochemistry* 8, 4108-4116.

- Griko, Y. V., Privalov, P. L., Venyaminov, S. Y., Kutysenko, V. P. (1988) *J. Mol. Biol.* 202, 127-138.
- Güntert, P., Braun, W. & Wuthrich, W. (1991) *J. Mol. Biol.* 217, 517-530.
- Hakoshima, T., Itoh, T., Tomita, K., Goda, K., Nishikawa, S., Morioka, H., Uesugi, S., Ohtsuka, E. & Ikehara, M. (1992) *J. Mol. Biol.* 223, 1013-1028.
- Hanzawa, H., Haruyama, H., Watanabe, K. & Tsurufuji, S. (1994) *FEBS Lett.* 354, 207-212.
- Hartley, B. S. (1960) *Annu. Rev. Biochem.* 29, 45.
- Hatanaka, H., Oka, M., Kohda, D., Tate, S., Suda, A., Tamiya, N. & Inagaki, F. (1994) *J. Mol. Biol.* 240, 155-166.
- Heinemann, U. & Hahn, U. (1989) In *Protein-Nucleic Acid Interaction* (Saenger, W. & Hoffmann, U., eds.), pp. 111-141, MacMillan, London.
- Heinemann, U. & Sanger, W. (1982) *Nature* 299, 27-31.
- Hernandez-Arana, A., Rojo-Dominguez, A., Altamirano, M. M. & Calcagno, M. L. (1993) *Biochemistry* 32, 3644-3648.
- Hoffmann, E. & Rüterjans, H. (1988) *Eur. J. Biochem.* 177, 539-560.
- Homma, M., Chibana, H. & Tanaka, K. (1993) *J. Gen. Microbiol.* 139, 1187-1193.
- Hoover, W. G. (1985) *Phys. Rev. A.* 31, 1695-1697.
- Horiuchi, S., Honjo, M., Yamasaki, M. & Yamada, Y. (1969) *Sci. Pap. Coll. Gen. Educ., Univ. Tokyo* 19, 127-139.
- Hu, C.-Q., Sturtevant, J. M., Thomson, J. A., Erickson, R. E. & Pace, C. N. (1992) *Biochemistry* 31, 4876-4882.
- Ido, E., Saito, T. & Yamasaki, M. (1987) *Agric. Biol. Chem.* 51, 2855-2856.
- Iio, K. (1978) Ph. D. thesis (University of Tokyo)
- Iio, K. & Yamasaki, M. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 429, 912-924.
- Ikura M., Kay, L. E. & Bax, A. (1990) *Biochemistry* 29, 4659-4667.
- Inagaki, F., Kawano, Y., Shimada, I., Takahashi, K. & Miyazawa, T. (1981) *J. Biochem.* 89, 1185-1195.
- Inoue, H., Kimura, T., Makabe, O. & Takahashi, K. (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 19484-19489.
- Jaenicke, R. (1982) *Biophys. Struct. Mech.* 8, 231-256.
- Jaenicke, R. (1984) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 23, 395-466.
- Jaenicke, R. (1991) *Biochemistry* 30, 3147-3161.
- Jaenicke, R. & Rudolph R. (1986) *Methods Enzymol.* 131, 218-250.

- James, M. N. G. & Sielecki, A. R. (1983) *J. Mol. Biol.* 163, 299-361.
- Jaskolski, M., Miller, M., Rao, J. K. M., Leis, J. & Wlodawer, A. (1990) *Biochemistry* 29, 5889-5898.
- Jeener, J., Meier, B. H., Bachmann, P. & Ernst, R. R. (1979) *J. Chem. Phys.* 71, 4546-4553.
- Jencks, W. P. (1969) *Catalysis in Chemistry and Enzymology*, pp. 605-614, McGraw-Hill, New York.
- Kainosho, M. & Tsuji, T. (1982) *Biochemistry* 21, 6273-6279.
- Kato, K., Matsunaga, C., Nishimura, Y., Waelchli, M., Kainosho, M. & Arata, Y. (1989) *J. Biochem.* 105, 867-869.
- Kay, L. E., Ikura, M., Tschudin, R. & Bax, A. (1990) *J. Magn. Reson.* 89, 496-514.
- Kay, L. E., Ikura, M., Zhu, G. & Bax, A. (1991) *J. Magn. Reson.* 91, 422-428.
- Kiefhaber, T., Quaas, R., Hahn, U. & Schmid, F. X. (1990a) *Biochemistry* 29, 3053-3061.
- Kiefhaber, T., Quaas, R., Hahn, U. & Schmid, F. X. (1990b) *Biochemistry* 29, 3061-3070.
- Kiefhaber, T., Schmid, F. X., Renner, M., Hinz, H.-J., Hahn, U. & Quaas, R. (1990c) *Biochemistry* 29, 8250-8257.
- Kitahara, S. (1982) Ph. D. thesis (University of Tokyo)
- Koaze, Y., Goi, H., Ezawa, K., Yamada, Y. & Hara, T. (1964) *Agric. Biol. Chem.* 28, 216-223.
- Kleywegt, G. J., Vuister, G. W., Padilla, A., Knegt, R. M. A., Boelens, R. & Kaptein, R. (1993) *J. Magn. Reson. B.* 102, 166-176.
- Kohda, D., Kawai, G., Yokoyama, S., Kawakami, M., Mizushima, S. & Miyazawa, T. (1987) *Biochemistry* 26, 6531-6538.
- Kunimoto, S., Aoyagi, T., Morishima, H., Takeuchi, T. & Umezawa, H. (1972) *J. Antibiotics* 25, 251-255.
- Kunitz, M. (1947) *J. Gen. Physiol.* 30, 291-310.
- Kuwajima, K. (1989) *Proteins: Struct. Funct. Genet.* 6, 87-103.
- Kyogoku, Y., Watanabe, M., Kainosho, M. & Oshima, T. (1982) *J. Biochem.* 91, 675-679.
- Lapatto, R., Blundell, T. L., Hemmings, A., Overington, J., Wilderspin, A., Wood, S., Merson, J. R., Whittle, P. J., Danley, D. E., Geoghegan, K. F., Hawrylik, S. J., Lee, S. E., Scheld, K. G. & Hobart, P. M. (1989) *Nature* 342, 299-302.

- Lerner, C. G. & Goldman, R. C. (1993) *J. Gen. Microbiol.* 139, 1643-1651.
- Lin, X. & Tang, T. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 1490-1495.
- Macura, S., Huang, Y., Suter, D. & Ernst, R. R. (1981) *J. Magn. Reson.* 43, 259-281.
- Maita, T., Nagata, S., Matsuda, G., Maruta, S., Oda, K. & Tsuru, D. (1984) *J. Biochem.* 95, 465-475.
- Marion, D. & Wüthrich, K. (1983) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 113, 967-974.
- Marion, D., Ikura, M. & Bax, A. (1989a) *J. Magn. Reson.* 84, 425-430.
- Marion, D., Ikura, M., Tschudin, R. & Bax, A. (1989b) *J. Magn. Reson.* 85, 393-399.
- Marion, D., Driscoll, P. C., Kay, L. E., Wingfield, P. T., Bax, A., Gronenborn, A. M. & Clore, G. M. (1989c) *Biochemistry* 6150-6156.
- Mateo, P. L. & Privalov, P. L. (1981) *FEBS Lett.* 189-192.
- Matsuzaki, H., Iwata, S., Hamaya, T., Takizawa, T., Tanokura, M. & Takahashi, K. (1991) *Proc. Japan Acad.* 67B, 209-212.
- Mayo, S. L., Olafson, B. D. & Goddard III, W. A. (1990) *J. Phys. Chem.* 94, 8897-8909.
- McNutt, M., Mullins, L. S., Raushel, F. M. & Pace, C. N. (1990) *Biochemistry* 29, 7572-7576.
- Meek, T. D., Dayton, B. D., Metcalf, B. W., Dreyer, G. B., Strickler, J. E., Gorniak, J. G., Rosenberg, M., Moore, M. L., Magaard, V. W., Debouck, C. (1989) *Proc. Natl. Sci.* 86, 1841-1845.
- Miller, M., Jaskolski, M., Rao, J. K. M., Leis, J. & Wlodawer, A. (1989) *Nature* 337, 576-579.
- Morishima, H., Takita, T., Aoyagi, T., Takeuchi, T. & Umezawa, H. (1970) *J. Antibiotics* 23, 263-265.
- Murao, S. & Oda, K. (1985) In *Aspartic Proteinases and Their Inhibitors* (Kostka, V., ed.), pp. 379-399, de Gruyter, Berlin.
- Nakai, T., Kidera, A. & Nakamura, H. (1993) *J. Biomol. NMR* 3, 19-40.
- Nakayama, S., Nagashima, Y., Hoshino, M., Moriyama, A., Takahashi, K., Watanabe, T. & Yoshida, M. (1983) *J. Biochem.* 93, 1297-1304.
- Newman, M., Safran, M., Frazao, C., Khan, G., Zdanov, A., Tickle, I. J., Blundell, T. L. & Andreeva, N. (1991) *J. Mol. Biol.* 221, 1295-1309.
- Nilges, M., Gronenborn, A. M. & Clore, G. M. (1988) *FEBS Lett.* 229, 317-324.

- Nishikawa, S., Morioka, H., Kim, H. J., Fuchimura, K., Tanaka, T., Uesugi, S., Hakoshima, T., Tomita, K., Ohtsuka, E. & Ikehara, M. (1987) *Biochemistry* 26, 8620-8624.
- Navia, M. A., Fitzgerald, P. M. D., McKeever, B. M., Leu, C.-T., Heimbach, J. C., Herber, W. K., Sigal, I. S., Darke, P. L. & Springer, J. P. (1989) *Nature* 337, 615-620.
- Noguti, T. & Go, N. (1985) *Biopolymers* 24, 527-546.
- Ogushi, M. & Wada, A. (1983) *FEBS Lett.* 164, 21-24.
- Oobatake, M., Tahahashi, S. & Ooi, T. (1979) *J. Biochem.* 86, 55-63.
- Oschkinat H., Griesinger, C., Kraulis, P. J., Sørensen, O. W., Ernst, R. R., Gronenborn, A. M. & Clore, G. M. (1988) *Nature* 332, 374-376.
- Oschkinat H., Cieslar, C., Holak, T. A., Clore, G. M. & Gronenborn, A. M. (1989) *J. Magn. Reson.* 450-472.
- Pace, C. N. & Grimsley, G. R. (1988) *Biochemistry* 27, 3242-3246.
- Pace, C. N., Shirley, B. A. & Thomson, J. A. (1989) In *Protein Structure: A Practical Approach* (Creighton, T. E., ed.), pp. 311-330, IRL.
- Pace, C. N., Laurents, D. V. & Thomson, J. A. (1990) *Biochemistry* 29, 2564-2572.
- Pfeil, W. & Privalov P. L. (1976a) *Biophys. Chem.* 4, 23-32.
- Pfeil, W. & Privalov P. L. (1976b) *Biophys. Chem.* 4, 41-50.
- Powers, R., Gronenborn, A. M., Clore, M. & Bax A. (1991) *J. Mag. Reson.* 94, 209-213.
- Privalov, P. L. (1982) *Adv. Protein Chem.* 35, 1-104.
- Privalov, P. L. (1979) *Adv. Protein Chem.* 33, 167-241.
- Plivalov, P. L. & Khechinashvili, N. N. (1974) *J. Mol. Biol.* 86, 665.
- Privalov, P. L., Plotnikov, V. V. & Filimonov, V. V. (1975) *J. Chem. Thermodyn.* 7, 41-47.
- Privalov, P. L., Mateo, P. L., Khechinashvili, N. N., Stepanov, V. M. & Revina, L. P. (1981) *J. Mol. Biol.* 152, 445-464.
- Privalov, P. L. & Makhatadze, G. I. (1992) *J. Mol. Biol.* 224, 715-723.
- Provencher, S. W. & Glöckner, J. (1981) *Biochemistry* 20, 33-37.
- Ptitsyn, O. B. (1987) *J. Protein Chem.* 6, 273-293.
- Rao, J. K. M., Erickson, J. W. & Wlodawer A. (1991) *Biochemistry* 30, 4 663-4671.

- Rajagopalan, T. G., Stein, W. H. & Moore, S. (1966) *J. Biol. Chem.*, 241, 4295-4297.
- Rance, M., Sørensen, O. W., Bodenhausen, G., Wagner, G., Ernst, R. R. & Wüthrich, K. (1983) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 117, 479-485.
- Redfield, A. G. & Kunz, S. D. (1975) *J. Magn. Reson.* 19, 255-258.
- Richards, F. M. & Wyckoff, H. W. (1971) *The enzymes* (Boyer, P.D., ed.) 3rd Ed., Vol. 4, pp. 647-806, Academic Press, Inc.
- Sankaram, M. B., Brophy, P. L., Jordi, W. & Marsh, D. (1990) *Biochim. Biophys. Acta* 1021, 63-69.
- Schmid, F. X. (1989) In *Protein Structure: A Practical Approach* (Creighton, T. E., ed.), pp. 251-285, IRL.
- Schmidt, J. M., Thuring, H., Werner, A., Rüterjans, H., Quaas, R. & Hahn, U. (1991) *Eur. J. Biochem.*, 197, 643-653.
- Schonbrunner, E. R., Mayer, S., Tropschug, M., Fischer, G., Takahashi, N. & Schmid, F. X. (1991) *J. Bio. Chem.* 266, 3630-3635.
- Schultz, G. E. & Schirmer, R. H. (1979) *Principles of Protein Structure*, Springer-Verlag.
- Shaka, A. J., Lee, C. J. & Pines, A. (1988) *J. Magn. Reson.* 77, 274-293.
- Shimada, I. & Inagaki, F. (1990) *Biochemistry*, 29, 757-764.
- Shirley, B. A., Stanssens, P., Steyaert, J. & Pace, C. N. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 11621-11625.
- Sielecki, A. R., Hayakawa, K., Fujinaga, M., Murphy, M. E. P., Fraser, M., Muir, A. K., Carilli, C. T., Lewicki, J. A., Baxter, J. D. & James, M. N. G. (1989) *Science* 243, 1346-1351.
- Sielecki, A. R., Fedorov, A. A., Boodhoo, A., Andreeva, N. S. & James, M. N. G. (1990) *J. Mol. Biol.* 214, 143-170.
- Socheva, I. V., Belopolskaya, T. V. & Smirnova O. I. (1985) *Biophysical Chemistry* 22, 323-336.
- States, D. J., Haberkorn, R. A. & Ruben, D. J. (1982) *J. Magn. Reson.* 48, 286-292.
- Steyaert, J., Hallenga, K., Wyns, L. & Stanssens, P. (1990) *Biochemistry* 29, 9064-9072.
- Steyaert, J., Opsomer, C., Wyns, L. & Stanssens, P. (1991) *Biochemistry* (1991) 30, 494-499.
- Steyaert, J. & Wyns, L. (1993) *J. Mol. Biol.* 229, 770-781.

- Sugio, S., Oka, K., Ohishi, H., Tomita, K. & Sanger, W. (1985) FEBS Lett., 183, 115-118.
- Sugio, S., Amisaki, T., Ohishi, H. & Tomita, K. (1988) J. Biochem. 103, 354-366.
- Suguna, K., Bott, R. R., Padlan, E. A., Subramanian, E., Sheriff, S., Cohen, G. E. & Davies, D. R. (1987) J. Mol. Biol. 196, 877-900.
- Szilagyi, L. & Jardetzky, O. (1989) J. Magn. Reson. 83, 441-449.
- Takahashi, K. & Sturtevant, J. M. (1981) Biochemistry 20, 6185-6190.
- Takahashi, K. (1965) J. Biol. Chem., 240, 4117-4119.
- Takahashi, K. (1970) J. Biochem. 67, 833-839.
- Takahashi, K. (1972) J. Biochem. 72, 1469-1481.
- Takahashi, K., Stein, W. H. & Moore, S. (1967) J. Biol. Chem. 242, 4682-4690.
- Takahashi, K. (1985) J. Biochem. 98, 815-817.
- Takahashi, K. & Moore, S. (1982) The enzymes 15, 453-468.
- Takahashi, K., Inoue, H., Sakai, K., Kohama, T., Kitahara, S., Takashima, K., Tanji, M., Athauda, S. B. P., Takahashi, T., Akanuma, H., Mamiya, G. & Yamasaki, M. (1991) J. Biol. Chem. 266, 19480-19483.
- Takahashi, K., Tanokura, M., Inoue, H., Kojima, M., Muto, Y., Yamasaki, M., Makabe, O., Kimura, T., Takizawa, T., Hamaya, T., Suzuki, E. & Miyano, H. (1992) In Structure and Function of the Aspartic Proteinases: Genetics, Structures, and Mechanisms (Dunn, B., ed.), pp. 203-211, Plenum Press, New York.
- Tang, J. (1971) J. Biol. Chem., 246, 4510-4517.
- Tanokura, M., Tasumi, M. & Miyazawa, T. (1976) Biopolymers 15, 393-401.
- Tanokura, M., Tasumi, M. & Miyazawa, T. (1978) Chem. Lett., pp 739-742.
- Tanokura, M., Matsuzaki, H., Iwata, S., Nakagawa, A., Hamaya, T., Takizawa, T. & Takahashi, K. (1992) J. Mol. Biol. 223, 373-375.
- Tanokura, M., Miyano, H., Suzuki, E. & Takahashi, K. (1993) Bioimages 1, 125-128.
- Tirado-Rives, J. & Jorgensen, W. L. (1993) Biochemistry 32, 4175-4184.
- Thomson, J. A., Shirley, B. A., Grimsley, G. R. & Pace, C. N. (1989) J. Biol. Chem. 264, 11614-11620.
- Umezawa, H., Aoyagi, T., Morishima, H., Matsuzaki, M., Hamada, M. & Takeuchi, T. (1970) J. Antibiotics 23, 259-262.
- Velicelebi, G. & Sturtevant, J. M. (1979) Biochemistry 18, 1180-1186.

- Vuister, G. W., Boelens, R. & Kaptein, R. (1988) *J. Magn. Reson.* 80, 176-185.
- Vuister, G. W., Boelens, R., Padilla, A., Kleywegt, G. J. & Kaptein, R. (1990) *Biochemistry* 29, 1829-1839.
- Wagner, G. (1983) *J. Magn. Reson.* 55, 151-156.
- Weismann, R., Ruterjans, H., Schwalbe, H., Schleucher, J., Bermel, W. & Griesinger, C. (1994) *J. Biomol. NMR* 231-240.
- Werner, M. H., Clore, G. M., Gronenborn, A. M., Kondoh, A. & Fisher, R. J. (1994) *FEBS Lett.* 345, 125-130.
- Wishart, D. S., Sykes, B. D. & Richards, F. M. (1991) *J. Mol. Biol.* 222, 311-333.
- Wlodawer, A., Miller, M., Jaskolski, M., Sathyanarayana, B. K., Baldwin, E. T., Weber, I. T., Selk, L. M., Clawson, L., Schneider, J. & Kent, S. B. H. (1989) *Science* 245, 616-621.
- Wüthrich, K. (1976) *NMR in Biological Research: Peptides and Proteins*, North-Holland Publishing Company, Amsterdam.
- Wüthrich, K. (1986) *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, Wiley, New York.
- Yamagata, H., Nakahama, K., Suzuki, Y., Kakinuma, A., Tsukagoshi, N. & Uda, S. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 3589-3593.
- Yee, A. A. & O'Neil, J. D. J. (1992) *Biochemistry*, 31, 3135-3143.
- Yu, Y., Makhatadze, G. I., Pace, N. & Privalov, P. (1994) *Biochemistry*, 33, 3312-3319.
- Zuiderweg, E. R. P., Hallenga, K. & Olejniczak, E. T. (1986) *J. Magn. Reson.* 70, 336-343.
- Zuiderweg, E. R. P. & Fesik, S. W. (1989) *Biochemistry* 28, 2387-2391.
- Zuiderweg, E. R. P. (1990) *J. Magn. Reson.* 86, 346-357.

<<謝辞>>

本研究を行う機会を与えて下さり、卒業研究以来常に暖かい御指導と御配慮を頂きました、東京大学理学部生物化学教室高橋健治教授に心から感謝致します。

また本研究を進めるにあたり、終始数多くの助言と暖かい御指導を賜りました、東京大学生物生産工学センター田之倉優教授に深く感謝致します。

プロテアーゼAの粗酵素粉末からの精製は明治製菓生物科学研究所で行いました。御世話になりました河野敏明、浜谷徹、滝沢登志雄各氏に深く御礼申し上げます。

NMR 測定、CD 測定に際し Bruker AM-400 分光計、Jasco J-600 分光計は理学部生物化学教室横山研究室設置のものを使わせて頂きました。横山茂之教授、武藤裕講師をはじめ横山研究室の方々に感謝致します。

また NMR 測定に際し Bruker AMX-600 分光計は味の素中央研究所設置の機器を使わせて頂きました。鈴木榮一郎、宮野博、水越利巳、大竹亮子各氏に深く御礼申し上げます。また NMR スペクトル測定時に御世話になりました日本ブルカーの Markus Wächli 博士に感謝致します。

DSC の測定は大阪府立大学農学部の高橋克忠、深田はるみ両先生に御願い致しました。CD スペクトル解析用の CONTIN プログラムは東京工業大学の有坂文雄先生から頂きました。また Distance Geometry 計算用の EMBOSS プログラムは蛋白工学研究所の中村春木先生より頂きました。以上の先生方に感謝致します。

最後になりましたが、当研究室助手の井上英史、村松知成両先生をはじめとする研究室のスタッフ学生の皆様には公私を問わず数々の御世話になりました。またアミノ酸組成分析は、当研究室の桜井康子氏に御願い致しました。深く感謝致します。

