蛋白質の圧縮率と立体構造

Compressibility-Structure Relationship of Proteins

月向 邦彦

Kunihiko GEKKO

Protein dynamics is a basis for understanding the principles of constructing three-dimensional structures and the structure-function relationship of proteins. A novel measure of the flexibility of protein in water is compressibility because it is directly linked to the volume fluctuation. It is known that the adiabatic compressibility sensitively reflects the structural characteristics of proteins although it is a thermodynamic quantity. This article is a review of recent studies on the compressibility-structure relationship of native globular proteins.

[*adiabatic compressibility, flexibility, protein structure, cavity, hydration*]

1. はじめに

蛋白質の立体構造のゆらぎは、構造安定性や機能発現と密接に関わっており、蛋白質物理学の重要な研究課題となっている。しかし、測定手段が限られていることもあり、ゆらぎの発現機構についてはまだ多くの謎が残されている。X線構造解析の結果を見ると、蛋白質分子内の原子は有機分子結晶なみに充填されており、かなり固い構造のように思われる。しかし、その充填密度は場所により異なっており、充填密度の低い部分にはキャビティー（空洞）が形成され、分子のゆらぎの場となる。このような原子のパッキング状態は体積に直接反映されるため、構造の圧力応答、すなわち圧縮率をとおして構造の固さとゆらぎについての情報を得ることができる。これまで、水溶液中で多くの球状蛋白質の断熱圧縮率が測定され、種々の構造因子[1-5]、安定性・機能[6-10]、コンホメーション変化[11-15]との関係が調べられてきた。その結果、圧縮率は熱力学量でありながら蛋白質の構造を敏感に反映することがわかってきた。これらの成果についてはいくつかの総説にまとめられているが[16-20]、ここでは、筆者らの最近の研究を中心に、天然状態の蛋白質にしばって圧縮率と構造との関係について述べてみたい。

2. 部分比容と圧縮率

水溶液中における溶質の単位質量当たりの体積は、熱力学的には部分比容 $\bar{v}^{\circ}$ として定義される。蛋白質の場合には、 $\bar{v}^{\circ}$ は構成原子のvan der Waals体積の和 V_c と、それらが完全にパッキングできないために生じるキャビティーの体積 V_{cav} 、それに水和による水の体積変化 ΔV_{sol} （通常負の値）の和として表される（Fig. 1）。

$$\bar{v}^{\circ} = V_c + V_{cav} + \Delta V_{sol} \quad (1)$$

部分比圧縮率 β は $\bar{v}^{\circ}$ の圧力微分として定義されるが、構成原子の体積、原子間共有結合の距離や角度は通常の圧力では圧縮されたり曲がったりすることはないと考えられるため、 V_c への圧力効果は無視でき、観測される β は蛋白質内部のキャビティーと分子表面の水和への圧力効果によって決定されることになる[1,3]。

$$\beta = -(1/\bar{v}^{\circ})(\partial \bar{v}^{\circ} / \partial P) = -(1/\bar{v}^{\circ})[(\partial V_{cav} / \partial P) + (\partial \Delta V_{sol} / \partial P)] \quad (2)$$

ここで P は圧力を示す。キャビティーは加圧により収縮するが（ $\partial V_{cav} / \partial P < 0$ ）、水和水はバルクの自由水に比べて圧縮されにくいいため、高圧力下では水和による体積減少は小さくなる（ $\partial \Delta V_{sol} / \partial P > 0$ ）。こうして、 β に対してキャビティーは正、水和は負の寄与

Fig. 1. Schematic view of protein compression in water. Water of hydration (dotted region), bulk water (lattice), and cavity in protein molecule are compressed depending on the respective compression.

をしており、両者の兼ね合いで β は正にも負にもなりうる。負の圧縮率は一見不思議に思えるが、これは体積として部分 (partial) 量を用いるためである。

圧縮率は、実験条件により断熱圧縮率 β_s または等温圧縮率 β_T として観測される。断熱圧縮率 β_s は、音速 u と密度 d の測定から、Laplaceの式 ($\beta_s = 1/u^2 d$) を用いて求めることができる。実験法の詳細については文献を参照されたい[21,22]。実際には、蛋白質の構造のゆらぎや圧力変性などは等温過程と見なせるため、断熱圧縮率より等温圧縮率が重要となる。等温圧縮率 β_T を求めるためには、静水圧あるいは超遠心力下で部分比容の圧力依存性を測定する必要があるが、比容の圧力係数が小さいうえ、高圧力下では蛋白質の変性や会合、溶媒の選択的吸着などが起こるため、 β_T を実験的に求めることは難しい。しかし、蛋白質の定圧熱容量 C_p 、熱膨張係数 α 、密度 d がわかれば、次式を用いて β_s の値から β_T を見積もることができる。

$$\beta_T = \beta_s + \alpha^2 T / C_p d \quad (3)$$

等温圧縮率 β_T と体積 V の平均値のまわりのゆらぎの二乗平均 δV_{rms} の間には、統計熱力学により次の関係が知られている[23]。

$$\delta V_{rms} = (\kappa T \beta_T V)^{1/2} \quad (4)$$

ここで κ はボルツマン定数、 T は絶対温度である。こうして、圧縮率の測定から体積のゆらぎを知ることができる。体積のゆらぎは、ゆらぎの速さ (タイムスケール) についての情報は与えないが、ゆらぎの大きさ (幅) を視覚的にとらえることができる点で便利である。

3. 球状蛋白質の圧縮率と体積のゆらぎ

これまで50種以上の蛋白質の断熱圧縮率が報告されているが、その多くは筆者らのグループと Saravazyan, Kharakoz, Chalikianらのグループにより測定されたものである[18-20]。それらの一部を部分比容の値とともにTable 1に示す[17,19]。アクチンやミオシンのような繊維状蛋白質は負の β_s を与えるが、ほとんどの球状蛋白質の β_s は正の値となっており、水和効果に比べて分子内部の原子の充填効果が支配的となる。興味あることに、同じ球状蛋白質でも β_s の値はかなり広い範囲にわたって変化しており、圧縮率は蛋白質の立体構造を敏感に反映していることがわかる。例えば、卵白リゾチームと α -ラクトアルブミンは一次構造も三次構造もよく似ているにもかかわらず、前者の方がずっと固い蛋白質である。同じ卵白リゾチームでもシチメンチョウ由来のものはニワトリに比べてずっと固い[8]。(3)式を用いて β_s から求めた β_T の値は、蛋白質によらず β_s より(3~4) $\times 10^{-6} \text{ bar}^{-1}$ だけ大きくなっている。 β_T の実測が難しいだけに、これらのデータは有用なものと思われる。ちなみにリボヌクレアーゼAやウシ血清アルブミンの β_T は実測された値に近くなっている。得られた β_T を用いて(4)式から計算した体積のゆらぎ δV_{rms} をTable 1の最後の欄に示した。 δV_{rms} は蛋白質1モル当たり30~200 cm^3 で、全体積の0.3%程度と見積もられる。 β_T には水和の寄与も含まれているため、蛋白質自身のゆらぎはこれより数10%高い値になるものと推定される。これらのゆらぎがある瞬間にある部分に集

Table 1. Partial specific volume, compressibility, and volume fluctuation of proteins at 25°C.

Protein	$\bar{v}^\circ$ (cm^3/g)	$\beta_s \times 10^6$ (1/bar)	$\beta_T \times 10^6$ (1/bar)	δV_{rms} (cm^3/mol)
Soybean trypsin inhibitor	0.713	0.17	4.44	41.1
Trypsin	0.719	0.92	5.16	46.0
Ribonuclease A	0.704	1.12	5.48	36.2
Lysozyme	0.712	4.67	7.73	44.2
α -Lactalbumin	0.736	8.27	12.4	56.9
β -Lactoglobulin	0.751	8.45	11.8	63.6
Myoglobin	0.747	8.98	13.1	64.1
Bovine serum albumin	0.735	10.5	14.6	135
Hemoglobin	0.745	10.9	15.0	137
Gelatin	0.689	-2.5	1.92	
F-actin	0.720	-6.3 (20°C)		
Myosin	0.724	-18 (20°C)		

中するなら（この確率は少ないかも知れないが）、蛋白質分子の内部に2~11分子の水の体積に相当するチャンネルが形成されることになり、溶媒分子やプローブ分子の侵入も可能となるであろう。こうして、分子内部の水素原子の重水素置換やトリプトファン残基の蛍光の消光など、ゆらぎに基づく諸現象を説明するうえで、ここで得られた体積のゆらぎは充分合理的な値となっている。

4. 圧縮率に影響を及ぼす構造因子

圧縮率は蛋白質の個性を敏感に反映しているものの、実測された圧縮率の値には水和とキャビティの寄与が含まれているため、圧縮率と立体構造との関係を理解することは必ずしも容易でない。しかし、いくつかのアプローチをとおして、圧縮率に及ぼす構造因子を知ることができる[3,19]。

4.1 水和とキャビティの寄与

水和とキャビティの寄与を分離して求めるにはいくつかの仮定が必要であるが、水和量がわかれば(1)式の ΔV_{sol} と(2)式の $(\delta\Delta V_{sol}/\delta P)$ の値を見積もることができる[1,3]。こうして求めたキャビティの体積 V_{cav} は、分子全体積の2~5%で、ほぼ水和による体積減少 ΔV_{sol} により相殺されている。 $(\delta V_{cav}/\delta P)$ は $-(10\sim 20)\times 10^{-6}\text{ cm}^3\text{ g}^{-1}\text{ bar}^{-1}$ で、やはり水和による正の $(\delta\Delta V_{sol}/\delta P)$ により相殺されているが、キャビティの寄与がわずかに勝り、 β_s を正にしている。水と水を除いた蛋白質分子自身の圧縮率 β_p は $(10\sim 30)\times 10^{-6}\text{ bar}^{-1}$ と見積もられている。これは通常の氷の圧縮率 $18\times 10^{-6}\text{ bar}^{-1}$ に近いことから、蛋白質自身の固さは氷と同程度のものと推察される。キャビティ部分の見かけの圧縮率 β_{cav} は $\beta_{cav} = -(1/V_{cav})(\delta V_{cav}/\delta P)$ として計算することができ、数百 $\times 10^{-6}\text{ bar}^{-1}$ 、例えばウシ血清アルブミンでは $(430\sim 530)\times 10^{-6}\text{ bar}^{-1}$ と見積もられている。この値は常温の水の圧縮率 $45\times 10^{-6}\text{ bar}^{-1}$ の10倍以上も大きく、わずかなキャビティも蛋白質の構造を柔らかくする効果があることがわかる。Chalikianらは、蛋白質のX線結晶構造をもとに、溶媒露出表面積 ASA と β_s との相関をとおして、圧縮率に及ぼす水和の寄与を考察している[5]。

これらの結果は、水和の項を見積もることにより得られたものであるが、X線結晶構造からGRASPなどの解析ソフトを用いて V_{cav} を直接計算することもできる。蛋白質分子内に一定サイズの球状プローブ

を転がし、その中心の軌跡によって囲まれた体積としてキャビティが定義される。プローブサイズとしては通常 $1.2\text{ \AA}$ 近傍の値が用いられるが、この方法では小さなキャビティは検出できないため、キャビティ体積は実際の値よりいくぶん少なめに見積もられる。個々のキャビティの大きさは $10\text{ \AA}^3$ から $200\text{ \AA}^3$ に及んでおり、指数関数的に小さいキャビティが増加する。大きいキャビティには水を含んだものも見られる。最近、筆者らはこうして求めた27個の蛋白質のキャビティ体積と β_s の間に正の相関があること、これらのキャビティの平均圧縮率は $450\times 10^{-6}\text{ bar}^{-1}$ で、上述の方法で求めた値に近いことを見出している[未発表]。高圧力下での蛋白質のX線結晶構造は圧力効果を理解するうえで重要であるが、これまで卵白リゾチームの1000気圧下でのデータしか報告されていない[24]。この蛋白質の体積は大気圧下に比べて0.47%減少しており、等温圧縮率は $4.7\times 10^{-6}\text{ bar}^{-1}$ と計算される。この値はTable 1に示した水中での値 $7.7\times 10^{-6}\text{ bar}^{-1}$ よりわずかに小さく、結晶状態ではゆらぎが抑えられていることを反映している。

4.2 統計解析に基づいた構造因子

上述のように、水和とキャビティの寄与を正確に見積もることはかなり難しい。しかし、球状蛋白質の水和量は大体1g当たり0.3g程度で、あまり蛋白質の種類によらない。したがって、蛋白質による圧縮率の違いは主として分子内キャビティの違いによるものと思われる。このような考えのもとに、水和とキャビティの寄与を分離することなく、実測の β_s と種々の構造因子との相関を統計的に解析することにより、以下の関係が見出されている[1,3,19]。

①分子の大きさ

蛋白質の露出表面積 ASA と体積 V および分子量 M の間には、 $ASA/V = 4.96\times M^{0.27}$ の関係があることが知られている[25]。この式からは、蛋白質の分子量が大きいほど分子内部の充填効果が分子表面の水和効果に比べて相対的に大きくなり、 β_s は大きくなるものと期待されるが、 β_s と分子量の間には明確な相関は認められない。これに対し、 $\bar{v}^0$ と β_s の間には非常に高い正の相関 $\beta_s = (172.83\bar{v}^0 - 120.63)\times 10^{-6}\text{ bar}^{-1}$ が見られ、その相関係数は0.82となる。

②疎水性

球状蛋白質の構造を見ると、明らかに分子表面には親水性残基、内部には疎水性残基が局在している。したがって、キャビティーは主としてこれらの疎水性側鎖の不十分なパッキングにより生じているものと予想される。実際、蛋白質の平均疎水エネルギー H_d と β_s の間には正の相関 $\beta_s = (0.0293H_d - 22.37) \times 10^{-6} \text{ bar}^{-1}$ (相関係数 0.70) が認められる。

③二次構造

β -シートとの相関は見られないが、 α -ヘリックス含量と β_s の間には正の相関が認められる。典型的なヘリックス蛋白質であるヘモグロビン、ミオグロビン、ウシ血清アルブミンなどは大きな正の β_s 値を示し、ほとんどヘリックス構造を持たないトリプシン、キモトリプシン、大豆トリプシンインヒビターなどは小さな β_s 値をとる。ヘリックス部分はそれ自身の圧縮率は小さいが、かさばった構造のため蛋白質内部へのパッキングが不十分となり、一つのダイナミックドメインとして働いている可能性が高い。倭らはノーマルモード解析法により、ミオグロビンのヘリックス内部は圧縮されにくい、ヘリックス間が大きく圧縮されることを見出し、等温圧縮率として $9.37 \times 10^{-6} \text{ bar}^{-1}$ という値を報告している [26]。

④アミノ酸組成

23種の球状蛋白質に含まれる20種のアミノ酸残基の体積分率と β_s との相関を調べたところ、Glu、Leu、Phe、His (グループ1) の4残基は β_s を大きくする方向に、Asn、Thr、Ser、Gly (グループ2) の4残基は逆に小さくする方向に寄与しており、残りの12残基はほとんど β_s に影響を与えていないことがわかった。興味あることに、グループ1は疎水性か α -ヘリックス形成能を有するアミノ酸からなり、グループ2には親水性かヘリックス破壊能を有するアミノ酸が多く含まれている。グループ1と2に含まれるそれぞれ4アミノ酸残基群の体積分率の和を独立変数として β_s との重回帰分析を行うと、0.74という高い相関係数が得られる。こうしてアミノ酸組成による解析からも、疎水性とヘリックスは蛋白質の圧縮率を決める重要な因子であることがわかる。

⑤ジスルフィド結合

筆者らは、ジスルフィド結合を有する12種類の蛋白質の解析から、単位質量当たりのジスルフィド結

合の多い蛋白質ほど β_s が小さくなることを見出している [未発表]。このことは、ジスルフィド結合が構造のゆらぎを抑制する方向に寄与していることを示している。

上述のように、蛋白質の圧縮率はいくつかの構造因子とかなり高い相関をもっている。これら以外に、ドメイン構造や補欠分子族などいくつかの因子が関与しているものと思われる。しかし、これらの構造因子の寄与についてはまだ詳細な研究は行われておらず、今後の研究に待たねばならない。

4.3 リガンド結合の影響

蛋白質の圧縮率に及ぼすリガンド結合の影響を調べることは、構造因子の解明だけでなく機能の発現機構を知るうえでも重要である。Fig. 2は、卵白リゾチームに阻害剤であるN-アセチルグルコサミン (GlcNAc) の単量体、二量体、三量体が結合したときの $\bar{v}^\circ$ と β_s の変化を示したものである [9]。一般に蛋白質とリガンドが結合する際には、それぞれの分子の脱水和をとまなうため、 $\bar{v}^\circ$ と β_s の増加が期待されるが、逆に減少している。これは、阻害剤の結合の際に、脱水和の効果を上回る原子のパッキングが起こったことを示しており、主として二つの結合ドメイン間のゆらぎが減少した結果と考えられる。阻害剤の重合度が増すにつれ圧縮率の減少は大きくなっており、体積のゆらぎは、それぞれ3、7、14%程度減少しているものと思われる。これらの結果は、重水素交換速度に及ぼす阻害剤の影響ともよく対応している。

大腸菌のジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR) は、159個のアミノ酸からなるジスルフィド結合を持たない

Fig. 2. Plots of $\bar{v}^\circ$ and β_s of lysozyme against the degree of polymerization (n) of (GlcNAc)_n in water (○) and 25 mM phosphate buffer pH 5.5 (●) at 25°C [9].

単量体酵素で、Fig. 3のような立体構造をもっている。この酵素は、補酵素NADPHを水素供与体としてジヒドロ葉酸 (DHF) をテトラヒドロ葉酸 (THF) に還元する反応を触媒する。その反応は5つの中間複合体、DHFR・NADPH、DHFR・NADPH・DHF、DHFR・NADP・THF、DHFR・THF、DHFR・NADPH・THFを経由して進んでいる[27]。この反応中でDHFR・NADPH・DHFは遷移状態であり、その構造を知ることにはできないが、阻害剤であるメトトリキセート (MTX) との複合体DHFR・MTX・DHFと似た構造であると考えられている。これらのX線結晶構造と各素反応の速度定数をもとに、SawayaとKrautは触媒反応の様子を動画にしており[27]、インターネット上で見ることができる (<http://www-chem.ucsd.edu/Faculty/Kraut/dhfr.html>)。DHFRは酵素としては比較的小さい分子でありながら、かさばったNADPHやDHFを結合しなければならないため、その構造は驚くほど協同的かつ活発に動いている。これらの反応中間体の $\bar{v}^0$ と β_s がわかれば、X線結晶構造と比較することにより、構造のゆらぎや圧力応答についてのミクロな描象を得ることができる。

Table 2にDHFRの各種リガンド複合体の $\bar{v}^0$ と β_s 、X線結晶構造から計算された溶媒露出表面積ASA、分子内キャビティーの総体積 V_{cav} と数を示す[10]。一般に蛋白質とリガンドの結合では、それぞれの脱水和をとまなうため、 $\bar{v}^0$ と β_s の増加が期待されるが、両パラメーターはリガンド結合によって特徴的な変化を示している。反応の初期過程であるNADPHの結合では、体積は変化しないものの圧縮率は減少している。一方、DHFR・MTX・DHFは最も大きな $\bar{v}^0$ と β_s をもっており、遷移状態であるDHFR・NADPH・DHFはこの反応系で最もゆらぎの大きい構造をとっているものと考えられる。しかし、NADPHからDHFへ水素が転移すると体積も圧縮率も大きく減少し、形成されたDHFR・NADP・THF複合体はこの反応経路中で最もゆらぎの小さい状態となっている。こうして、この酵素反応ではリガンドの結合・反応・解離によって構造のフレキシビリティーが大きく変化していることがわかる。言うまでもなく、 $\bar{v}^0$ が増加する素反応は高圧力下では抑制され、 $\bar{v}^0$ が減少する素反応は促進される。しかし、高圧力下では酵素のフレキシビリティーの変化により律速過程が変わる可能性もあり、常圧下での素反応の体積変化だけから全体の酵素反応に及ぼす圧力効果を予測することは難しい。

Table 2. Partial specific volume, adiabatic compressibility, accessible surface area (ASA), and total cavity volume (V_{cav}) of DHFR-ligand complexes at 30°C.

Ligand	$\bar{v}^0$ (cm ³ /g)	$\beta_s \times 10^6$ (1/bar)	ASA (Å ²)	V_{cav} (Å ³)
Apo-DHFR	0.741	8.1	8350	250 (17)
NADPH	0.741	7.3	8397	224 (22)
NADP	0.743	8.0	7982	283 (19)
DHF	0.754	8.7	8105	262 (17)
DHF・NADP	0.739	8.9	-	-
THF	0.736	8.0	8138	152 (15)
THF・NADP	0.733	6.6	7871	264 (21)
MTX	0.754	9.7	7870	255 (16)
MTX・NADPH	0.754	9.8	7979	341 (26)

The values in parentheses represent the number of cavities.

このようなリガンド結合による $\bar{v}^0$ と β_s の変化はどこから生じているのだろうか？この要因を知ることは、蛋白質への圧力効果を理解する上で重要である。(1)と(2)式から、 $\bar{v}^0$ と β_s はASAが減少するにつれ、また V_{cav} が増すにつれ増加することが期待されるが、実際、両パラメーターとASA、 V_{cav} の間にはそれぞれ負および正の相関が見られる。しかし、ASAは最大でも6%程度しか変化しないのに対し、 V_{cav} は±40%も変化している。これらの結果は、リガンドの結合が分子表面の水和よりも分子内の原子のパッキング状態に大きく影響することを示している。Fig. 3にアポ型DHFRと比較して、NADPHおよびDHF複合体のX線結晶構造を示す。リガンドの結合によりキャビティーの分布が変わったことがわかる。DHFの結合では、キャビティーの数は変わらないが V_{cav} は増加しており(Table 2)、 β_s が増加することと符合している。逆に、NADPHの結合では、キャビティーの数は増加するものの V_{cav} は減少しており、 β_s の減少をもたらしている。このように、キャビティーのわず

Fig. 3. Structure and cavity distribution of apo-type, DHF and NADPH complexes of *E. coli* dihydrofolate reductase.

かな変化が、圧縮率に敏感に反映されている。 V_{cav} をキャビティーの数で割って得られたキャビティー1個当たりの平均体積と β_s の間には正の相関が見られ、大きいキャビティーほど圧縮率を増加させる効果も大きいものと思われる。

4.4 アミノ酸置換の影響

近年の遺伝子組み換え技術の発展により蛋白質の部位特異的アミノ酸置換が可能となり、蛋白質の構造と機能について多くの解明がなされてきた。その結果わかったことは、わずか一つのアミノ酸を置換しただけでその安定性や機能が大きく変化することである。このことは、アミノ酸置換により蛋白質分子のゆらぎが変化することを示唆しており、圧縮率に及ぼすアミノ酸置換の影響に興味もたれる。圧縮率測定に必要な量の変異蛋白質を作製することは容易ではないが、最近、筆者らは大腸菌由来の二種の酵素について一連の変異体の圧縮率測定に世界で初めて成功した[28,29]。アスパラギン酸アミノ転移酵素(AspAT)の39位での変異体の圧縮率をTable 3に示す。これらの結果はピリドキザルリン酸を結合したホロ酵素について得られたものであるが、野生型の β_s は卵白リゾチームの値に近く、かなり固い構造と考えられる。アミノ酸置換により β_s は大きく変化しており、一アミノ酸置換により構造のゆらぎが変化したことがわかる。この酵素の基質に対する k_{cat}/K_m 値(k_{cat} は触媒反応速度定数、 K_m はMichaelis定数)を β_s に対してプロットすると、Fig. 4に示すように正の良好な相関が見られ、この部位ではゆらぎを大きくする変異ほど酵素機能を上昇させることが期待される。

Table 3. Partial specific volume and adiabatic compressibility of AspAT and DHFR mutants.

Mutant	$\bar{v}^\circ$ (cm ³ /g)	$\beta_s \times 10^6$ (1/bar)
AspAT (holo) (25°C)		
Wild	0.731	4.3
V39A	0.729	4.5
V39L	0.732	5.3
V39F	0.721	1.1
V39Y	0.735	5.2
DHFR (apo) (15°C)		
Wild	0.723	1.7
G67A	0.721	-0.1
G67V	0.721	1.1
G67D	0.724	3.0
G121S	0.721	0.7
G121Y	0.724	-0.7
A145G	0.726	3.1
A145H	0.728	3.8

Fig. 4. Plots of k_{cat}/K_m as a function of β_s of AspAT and DHFR [28,29].

前述のジヒドロ葉酸還元酵素の異なるループ上に存在するGly67、Gly121、Ala145位を、種々のアミノ酸に置換した変異体の $\bar{v}^\circ$ と β_s の測定例をTable 3に示す[29]。この場合も一アミノ酸置換により両パラメーターは大きく変化しており、原子のパッキング状態とゆらぎが変化したことがわかる。 $\bar{v}^\circ$ と β_s の間には正の相関が見られるが、体積の大きいアミノ酸を導入することにより、むしろ圧縮率は減少する傾向が見られる。 k_{cat}/K_m の値を β_s に対してプロットすると、Fig. 4のように両者の間には正の相関が見られ、ゆらぎを大きくする変異は活性の上昇をもたらすことがわかる。このような活性の上昇は、基質(DHF)との親和性の増加(K_m の減少)よりもむしろ触媒反応速度 k_{cat} の上昇によりもたらされている。置換部位67、121、145位は、それぞれ活性中心であるAsp27から29.3、19.0、14.4Åも離れており、直接触媒反応に関与することはないと考えられるため、これらの部位での変異は、構造のゆらぎの変化をとおして機能に影響を及ぼしたものと推測される。最近、筆者らはこれらのDHFR変異体のX線構造解析を行い、置換部位から遠く離れた部位でキャビティー分布が変化しており、 β_s の大きい変異体ほどキャビティー体積が大きいことを見出した[30]。このことは、アミノ酸置換による局所的な構造変化が、原子の連鎖的な再配置(長距離相互作用)をとおして分子全体のダイナミクスに影響を及ぼすことを裏付けている。アミノ酸置換により安定性や酵素機能が大きく変化するにもかかわらず、X線構造解析において明確に立体構造の変化が確認された例が少ないだけに、これらの結果は、蛋白質の機能発現にゆらぎがどのように関わっているかを解明するための糸口を与えるものと思われる。

5. おわりに

蛋白質の圧縮率は、高圧力下での蛋白質の挙動を理解するためだけでなく、構造のゆらぎについて重要な情報を提供する。圧縮率は巨視的な熱力学量でありながら、主として分子内キャビティーの変化をととして蛋白質の立体構造の固さとゆらぎを敏感に反映している。圧縮率といくつかの構造因子の間には高い相関が見られ、それらの回帰式を使って未知の蛋白質の圧縮率を推定することができる。圧縮率に及ぼすリガンド結合やアミノ酸置換の影響をX線結晶構造と比較することにより、ゆらぎや機能の発現機構をミクロな視点から理解できる可能性も出てきた。本稿では省略したが、圧縮率は蛋白質の変性状態やモルテングロビュール状態のコンパクトさについても新たな情報を提供しており[11-15]、フォールディング機構の研究手段としても有効である。高圧生物科学の発展とともに、蛋白質の圧縮率データは益々その重要性を増すものと期待される。

参考文献

- [1] K. Gekko, H. Noguchi: J. Phys. Chem., **83**, 2706 (1979).
- [2] B. Gavish, E. Gratton, C. J. Hardy: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **80**, 750 (1983).
- [3] K. Gekko, Y. Hasegawa: Biochemistry, **25**, 6563 (1986).
- [4] D. P. Kharakoz, A. P. Sarvazyan: Biopolymers, **33**, 11 (1993).
- [5] T. V. Chalikian, M. Totrov, R. Abagyan, K. J. Breslauer: J. Mol. Biol., **26**, 588 (1996).
- [6] S. Ya. Nikitin, A. P. Sarvazyan, N. A. Kravchenko: Mol. Biol. (Mosk), **18**, 831 (1984).
- [7] K. Gekko, Y. Hasegawa: J. Phys. Chem., **93**, 426 (1989).
- [8] K. Gekko, K. Yamagami: J. Agric. Food Chem., **39**, 57 (1991).
- [9] K. Gekko, K. Yamagami: Chem. Lett., 839 (1998).
- [10] T. Kamiyama, K. Gekko: Biochim. Biophys. Acta, in press.
- [11] Y. Tamura, K. Gekko: Biochemistry, **34**, 1878 (1995).
- [12] T. V. Chalikian, S. V. Gindikin, K. J. Breslauer: J. Mol. Biol., **250**, 291-306 (1995).
- [13] D. P. Kharakoz: Biochemistry, **36**, 10276 (1997).
- [14] D. P. Kharakoz, V. E. Bychkova: Biochemistry, **36**, 1882 (1997).
- [15] T. Kamiyama, Y. Sadahide, Y. Nogusa, K. Gekko: Biochim. Biophys. Acta, **1434**, 44 (1999).
- [16] 月向邦彦: 生物物理, **24**, 91 (1984).
- [17] K. Gekko: Adv. Exp. Med. Biol., **302**, 753 (1991).
- [18] A. P. Sarvazyan: Annu. Rev. Biophys. Chem., **20**, 321 (1991).
- [19] 月向邦彦: 蛋白質・核酸・酵素, **41**, 2025 (1996).
- [20] T. V. Chalikian: Curr. Opin. Struct. Biol., **8**, 657 (1998).
- [21] 野口肇, 月向邦彦: 高分子電解質 (共立出版, 1979) p.269.
- [22] 月向邦彦: 熱分析ハンドブック (丸善, 1998) p.325.
- [23] A. Cooper: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **73**, 2740 (1976).
- [24] C. E. Kundrot, F. M. Richards: J. Mol. Biol., **193**, 157 (1987).
- [25] T. E. Creighton: in *Proteins, Structure and Molecular Properties* (Freeman, New York, 1993), p. 229.
- [26] T. Yamato, J. Higo, Y. Seno, N. Go: PROTEINS: Structure, Function, and Genetics, **16**, 327 (1993).
- [27] M. R. Sawaya, J. Kraut: Biochemistry, **36**, 586 (1997).
- [28] K. Gekko, Y. Tamura, E. Ohmae, H. Hayashi, H. Kagamiyama, H. Ueno: Protein Sci., **5**, 542 (1996).
- [29] K. Gekko, T. Kamiyama, E. Ohmae, K. Katayanagi: J. Biochem., in press.
- [30] 片柳克夫, 佐藤健大, 松尾光一, 渡邊修一, 大前英司, 月向邦彦: 生物物理学会第37回年会予稿集, 2PA017, 2PA018, S105 (1999).

[2000年3月15日受理]