極限環境下の蛋白質の構造と機能[†]

北 原 亮* 赤 坂 一 之**

Protein Structure and Function under Extreme Conditions

by

Ryo KITAHARA* and Kazuyuki AKASAKA**

Key words : Pressure, Protein, NMR, Conformation, Thermodynamics

1 はじめに

蛋白質は、20 種類のアミノ酸が数十から数百結合したポリペプチド構造を持つ。その特徴は、アミノ酸の並び方(配列)で様々な立体構造を形成できる点であり、その構造の多様性が機能の多様性を生み出していると考えて良い。重要な点は、溶液中の蛋白質の立体構造は、小分子のコンフォメーション平衡と同様に熱力学的に制御されていることである。つまり蛋白質も、熱力学的に設計された分子である。蛋白質構造の古典的見方は、Fold 構造(立体的に折れ畳まり機能することができる)と Unfold 構造(構造が壊れ変性している)の2状態モデルであるが、近年のX線結晶構造解析法や核磁気共鳴法(NMR法)など原子分解能で蛋白質構造を解析できる技術が発展すると、Fold 状態の中にも基底構造(いわゆる天然構造)の他に準安定構造など熱力学的に異なる状態が複数存在する場合があることが分かってきた。^{1)~4)}つまり蛋白質は、本質的には、基底構造やそれを逸脱した準安定構造、変性構造などとの複雑なコンフォメーション平衡にある。蛋白質に見られる多様な立体構造と複雑なコンフォメーション平衡が、蛋白質の緻密に制御された機能を生み出していると考えられる。温度と圧力は、物質の熱力学的状態すなわち構造や物性を規定する環境因子であり、広い温度、圧力領域の研究から蛋白質の持つ複雑なコンフォメーション平衡の全貌が明らかにできる。^{5)~8)}本稿では、広い温度と圧力領域でのNMR測定に基づいて、極限環境下における蛋白質の構造と機能をコンフォメーション平衡の観点で論ずる。蛋白質のコンフォメーション平衡は、“分子センサー”や“分子スイッチ”といった分子デバイスへの応用が可能な性質であり、材料というテーマに適している。

2 蛋白質のコンフォメーション平衡

蛋白質のコンフォメーション平衡は、生命現象の様々な場で利用されている。例えば、グロビン4量体からなるヘモグロ빈は、酸素分圧の変化に対して、T構造とR構造のコンフォメーション平衡を変化させ、酸素分子の解離と会合を制御している。また細胞間や細胞内信号

伝達を行う蛋白質群の多くは、ホルモンなど情報伝達分子との相互作用により、その機能が活性化し効率的に情報伝達を行う。しかし基底状態を逸脱した準安定状態や変性状態の蛋白質構造は、生理条件下では熱力学的に不安定である($\Delta G^0 \sim 30 \text{ kJ/mol}$)。ギブス自由エネルギー差(ΔG)と平衡定数(K)は指数関数の関係にあり($\Delta G = -RT \ln K$)、僅かなエネルギー差が、分布率の変化につながるため、通常は準安定構造を分光学的に捉えることは困難である。実際、既存のNMR法や結晶構造解析法で原子座標の決定がされた例は少ない。興味深い一例として、ジヒドロ葉酸還元酵素の場合、結晶化条件の違いにより、基質結合部位が「閉じた構造」と「開いた構造」が別々に構造解析され、基質結合部位に位置するループの開閉運動が明らかになった(図1)。¹⁾

或いは、ミオグロビンでは、異なるpHにより、配位子の出入りを可能にする開いた状態の結晶構造が明らかになった。⁹⁾準安定構造は基底構造と比較的近いエネルギー準位($\sim 10 \text{ kJ/mol}$)にあるため、環境因子などの変化により希に分布率の逆転が生じ結晶化するようだ。近年、緩和NMR法や筆者らによる可変圧力NMR法により、準安定構造の機能的意義や立体構造が解明されると、蛋白質のコンフォメーション平衡研究の重要性が一段と高まった。

図1 ジヒドロ葉酸還元酵素の結晶構造。閉じた構造(左 PDB: 1rx7)と開いた構造(右 PDB: 1rd7)

[†] 原稿受理 平成 20 年 10 月 10 日 Received Oct. 10, 2008 ©2009 The Society of Materials Science, Japan

* 正 会 員 立命館大学薬学部薬学科 〒525-8577 草津市野路東, College of Pharmaceutical Sci., Noji-higashi, Kusatsu, 525-8577

** 近畿大学先端技術研究所高圧力蛋白質研究センター 〒649-6493 紀の川市西三谷, High Pressure Protein Res. Center, Inst. of Advanced Tech., Nishimitani, Kinokawa, 649-6493

3 可変圧力 NMR 法

NMR 法は、溶液中での蛋白質の立体構造やその変化を原子分解能で観測できる唯一の手段である。山田と赤坂は、耐圧性に優れた NMR セルを開発し、広い圧力と温度領域での NMR 測定を可能にした。耐圧 NMR セルの製作方法および可変圧力 NMR システムは、文献に詳しく説明されている。^{10), 11)}耐圧 NMR セルは、天然または合成石英管から作られる、4–5cm ほどのセルボディの上部はフレキシブルなキャピラリー状構造をしている。内径 1–1.5mm/外径 3.5–4.0mm で、検出感度に関わる試料量は通常の 5 mm NMR セルの 1/10–1/15 程度となり、通常の NMR 測定に比べ 1/10–1/15 の感度しか得られない。しかしながら、近年の NMR 法の技術革新、すなわち超伝導磁石の高磁場化 (～950MHz) と NMR 検出器の高感度化 (極低温検出器) により、十分な感度での多次元 NMR 測定が可能になった。基本的には通常行えるあらゆる NMR 測定が、可変圧力 NMR でも可能である。耐圧 NMR セルを含むセルの全体部分は、ステンレス管により圧力発生装置 (圧力ポンプ) に繋がれている。ポンプを押すことにより、圧力媒体を通して耐圧セル上部に設けられたフリーピストンが蛋白質試料の入った試料管内部を加圧する。セル外部は、破損時に備えてテフロン管を装着しており NMR 検出器を保護している。セル形状やテフロン管による磁場の不均一性は十分補正できる範囲である。このシステムでは、分光器、NMR マグネット、NMR 検出器等に特別の改造を必要としないため、基本的にはあらゆる NMR 装置に設置可能である。現在までに、可変圧力 NMR システムは、理化学研究所播磨研究所の 500MHz と 800MHz NMR 装置 (Bruker Biospin 社)、近畿大学高圧力蛋白質研究センターの 600 MHz NMR 装置 (Bruker Biospin 社) に設置され、国内外のグループとの共同研究が多数行われている (理化学研究所 800MHz の可変圧力システムは 2008 年 3 月に閉鎖された)。

耐圧性能は、セル個々に異なるが蛋白質測定の場合は、これまでに 3700 気圧の測定に成功している。⁵⁾内外径比を変えることにより 5000 気圧程度の測定も可能である。水溶液の場合、水の凝固点が 2000 気圧では -23℃ 付近まで降下することから、-20℃ 付近から 100℃ 付近までの温度領域で測定が可能である。筆者は、山田から耐圧 NMR セルの製作技術を習得し、広い圧力と温度領域の NMR 測定により、蛋白質の高温、低温、高圧下での立体構造の変化やコンフォメーション平衡の研究を展開した。

4 蛋白質の圧力応答

蛋白質の水溶液に圧力を加えると、系の体積は減少しなくてはならない。後述するように、水の体積は加圧により減少するが、ここで注目するのは、水和した蛋白質の構造変化に伴う体積減少である。この章では、蛋白質の加圧による 2 つの応答と溶媒である水の物性変化について述べる。蛋白質の圧力応答の 1 つは、力学的な応答、すなわち蛋白質分子自身の圧縮に伴う立体構造変化である。もう 1 つは、熱力学的な応答、すなわち部分モル体

積の大きな Fold 状態からより小さな Unfold 状態への、異なる熱力学状態間での転移である。

4・1 圧力応答 1 – 力学的応答

高度に折り畳まれた蛋白質は、原子の熱振動により、その立体構造は Fold 状態内で揺らいでいる。ここで定義する力学的応答とは、加圧による立体構造の変化が、その状態における構造揺らぎの範囲内にある場合を指す。一般に、これらの構造揺らぎは、ピコ秒～ナノ秒レベルの相対的に速い時間スケールで起こる。線形応答理論が成り立つ揺らぎの範囲では、巨視的な圧縮率と体積揺らぎとの間には式 (1) で表される関係があり、大きな圧縮率をもつ分子は、その体積揺らぎも大きい。¹²⁾

$$\langle(\delta V)^2\rangle = k_B TV \beta_T \quad (1)$$

$\langle(\delta V)^2\rangle$ は体積揺らぎの 2 乗平均、 k_B はボルツマン定数、 V は蛋白質の体積、 β_T は等温圧縮率係数、 T は絶対温度である。

近年、我々のグループを中心とした可変圧力 NMR 法により、20 近くの蛋白質についてその圧力応答が原子レベルで明らかになった。^{13), 14)}NMR の化学シフトは、観測する核周辺の電子環境を敏感に反映するため、微細な立体構造変化を議論する良い指標となる。蛋白質を加圧すると、一般には、1000 気圧程度までは化学シフト変化は圧力に対して直線的な変化を示す。これは、その圧力範囲では、蛋白質の構造は圧力に対して線形的な応答をすることを意味する。一方、変化量は部位毎に大きく異なる。このような分子内での圧力応答の違いは、部位毎に水素結合や二面角の応答が異なることを意味する。興味深いことに、Unfold した蛋白質においては、圧力応答はほぼ一様であるのに対して、Fold した蛋白質では、分子内キャビティの近傍で圧力応答が顕著に大きい。この事実、微視的にも、体積揺らぎと圧縮率の間に相関があることを示唆している。

4・2 圧力応答 2 – 熱力学的応答

溶液中の蛋白質は Fold 構造から Unfold 構造までの熱力学的平衡状態にある。すなわち、各状態間の相対的な安定性により、その分布率は支配されている。この分布率は圧力・温度などの環境条件により変化する。一般に蛋白質は、高温、¹⁵⁾低温、¹⁶⁾高圧²⁾などの極限条件下では、Unfold 状態へ転移する。2 状態間のギブス自由エネルギー差 (ΔG) を圧力・温度の 2 次項まで展開すると式 (2) のようになる。

$$\Delta G = \Delta G^\circ - \Delta S^\circ(T - T^\circ) - \Delta C_p \left[T(\ln T/T^\circ - 1) + T^\circ \right] + \Delta V^\circ(p - p^\circ) - \frac{1}{2} \Delta \kappa (p - p^\circ)^2 + \Delta \alpha (p - p^\circ)(T - T^\circ) \quad (2)$$

ここに ΔS° , ΔC_p , ΔV° , $\Delta \kappa$, T , p , α は、それぞれ状態間のエントロピー差、熱容量差、部分モル体積差、圧縮率差と絶対温度、圧力、熱膨張係数を示す。温度軸での実験 (等圧) においては、 ΔS° , ΔC_p が平衡を左右する。温度軸での蛋白質の熱力学については、Privalov らによる優れた総説を参考にしていきたい。¹⁵⁾

一方、圧力実験 (等温) では、式 (3) に示すように、 ΔV° , $\Delta \kappa$ が平衡を左右する。

$$\Delta G = \Delta G^0 + \Delta V(p - p^0) - \frac{1}{2} \Delta \kappa (p - p^0)^2 \quad (3)$$

一般に、圧縮率差 ($\Delta \kappa$) を含む項は、数千気圧以内の比較的低压領域では体積差 (ΔV^0) の項に比べて、その寄与は小さいと考えられる。¹⁷⁾

蛋白質の部分モル体積 (V) は、ファンデルワールス体積 (蛋白質を構成する原子の体積)、空洞体積 (或いはキャビティー：原子パッキングが不完全な体積)、水和体積変化量 (水和状態や水和量の変化による水和体積変化) の総和として定義される。一般に、変性が進んだ構造は、分子内キャビティー (空洞) の消失や水和の変化により総和として部分モル体積が小さくなる。よって、蛋白質の部分モル体積は、構造が壊れるほど減少すると考えてよい。我々はこれを「蛋白質の体積原理」(図2)¹⁸⁾と呼び、高温や数千気圧以上の高压を除いて一般的に成り立つ原理だと考えている。この原理に従うと、加圧により、部分モル体積差 (ΔV^0) を利用して、部分モル体積の大きな Fold 構造から小さな Unfold 構造までの広い構造空間を探索することが可能となる。

4・3 圧力下の水の物性

圧力下の水の物性変化が、蛋白質の力学応答や熱力学応答に与える影響について考察する。水の構造の圧力依存性については、既に多くの文献がある。承知のように水は何かと特異的な物性を持つことが知られているが、それは身の丈の割にはかさ高い水素結合ネットワークを持つことで説明される。水分子 H-O-H は他の 4 分子と四面体構造の水素結合ネットワークを形成し、氷から水、水蒸気になるほどそのネットワークが小さく動きやすくなる。水は他の液体、例えばアルコールや油などの有機溶媒に比べ、その圧力依存性も特異的である。例えば、水の粘度は、20℃では、1000 気圧近傍で極小を持つ。すなわち、加圧と伴にいったんその粘度は僅かに減少し、1000 気圧を境に増加に転ずる。低温ほどその曲率は顕著で、30℃付近では極小は見られなくなり、それ以上の温度では他の有機溶媒同様に、加圧と伴に粘度は直線的に

増加する。この水の粘度の特異的な圧力依存性も、水の水素結合ネットワークに原因があると考えられている。このかさ高い四面体構造の水素結合ネットワークは、加圧と伴により体積の小さな様式に変化し、粘度の減少、水分子の回転・並進拡散の増加につながると考えられる。しかしながら、これまでの NMR 実験から 3000 気圧程度の範囲では水の水素結合ネットワークの変化および粘性変化による蛋白質回転運動への影響は僅かと考えられる。⁶⁾

一方、蛋白質の周りの水分子は、様々な形状や極性分布をもつ蛋白質表面と相互作用しており、加圧による水和構造の変化の解釈は一樣ではない。例えば、常圧下で正負の荷電基が塩橋を形成している場合、荷電基への水和は、静電収縮によりバルクの水よりも体積が小さくなるため、加圧下では 2 つ荷電基が解離し水和した状態が安定化される (イオン対あたり $\Delta V \sim -20 \text{ ml/mol}$)。疎水表面に形成されるいわゆる疎水性水和については、その寄与は複雑である。澤村らは、複数の疎水性アミノ酸の加圧下の精密な溶解度測定から、加圧による溶解度の変化は僅かであるが、アミノ酸タイプによりかなり異なることを示した。¹⁹⁾ 疎水性有機溶媒の水への溶解度は温度に大きく依存することも考慮すると、蛋白質全体として疎水性水和に伴う体積変化を定量的に予測することは現段階では困難である。一方、分子内に存在するキャビティーの水和は必ず体積の減少を伴うため、加圧下ではキャビティーが露出し水和した変性構造が安定化されることは確かである。

5 極限環境下のコンフォメーション平衡

5・1 ジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)

ジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR) は、159 アミノ酸残基からなり、ジヒドロ葉酸と補酵素 NADPH と結合し、ジヒドロ葉酸の還元を行う。図 3a には、異なる圧力と温度における 2 次元 NMR スペクトル ($^1\text{H}/^{15}\text{N}$ HSQC) の Val13 の信号を示す。²⁰⁾ 30 気圧 (15℃) においては、1 つの信号が観測され、1 つのコンフォメーションをとっていることを意味する。興味深いことに、加圧に伴い、もともとの信号強度が減少し、近接する位置に信号が観測された。1 つの原子から 2 つの信号が観測されたのは、2 つの異なる状態間を NMR の観測時間より十分遅く ($\gg$ ミリ秒) 構造変化しているためである。図 3b は、結晶構造解析により解明された DHFR の「閉じた構造」(灰色) と「開いた構造」(黒色) の重ね合わせ図である。¹⁾ 補酵素 NADPH 結合部位に存在する M20 ループの配向が大きく異なるのが分かる。溶液中で 2 つのコンフォメーションをもつ部位は、M20 ループやヘリックスの根元部分 (図 3b 丸印) であり、それらの部位が蝶つがいの役割を渡すことにより、補酵素結合部位の開閉運動が生じると考えられる。溶液中では、この 2 つの構造をダイナミックに構造転移していると考えられる。

5・2 ユビキチン

ユビキチンは、中性 pH では、熱変性温度が 100℃を超えるほど安定であり、熱や変性剤変性による研究では、準安定構造の存在は知られていない。筆者は、広い圧力

図2 蛋白質構造の体積原理。立体構造の秩序性と部分モル体積の相関関係。空洞部分は、分子内キャビティーを示す

図3 (a) 可変圧力 NMR 法により測定したジヒドロ葉酸還元酵素 DHFR の $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ HSQC スペクトル, VAL13 の信号のみ表示, (b) DHFR の閉じた構造 (灰色 PDB: 1rx7) と開いた構造 (黒色 PDB: 1rd7) の重ね合わせ¹⁹⁾

(1 ~ 3700 気圧) と温度 (-21 ~ 90°C) 領域の NMR 実験により, ユビキチンは 2 つの準安定状態を含む少なくとも N_1 - N_2 -I-U の 4 つのコンフォメーション間の化学平衡状態にあることを発見した^{5), 6), 21)}

図 4a は, 0°C で 30 気圧から 3700 気圧までの NMR スペクトルを示す. 1 つ 1 つのスポットは, 主鎖アミド NH の相関信号を示す. プロリンと N 末端アミノ酸以外の 2-76 番まで全てのアミノ酸からの信号が検出された. 加圧により幾つかの信号で大きな化学シフト変化が観測された.²²⁾例えば, Val70 (図 4a 矢印) は 3700 気圧の加圧により ^{15}N 核軸では約 8ppm, ^1H 核軸では約 0.3ppm と大きく高磁場シフト (低周波数側) した. 化学シフト変化が非線形で典型的なシグモイド様であったことから, 基底構造 (N_1) から準安定構造 (N_2) への構造転移と考えられた. Val70 の化学シフト変化をもとに, 2 つの構造, すなわち基底構造 (N_1), 準安定構造 (N_2), の自由エネルギー差 ΔG^0 を見積もると, 20°C で 4.2kJ/mol となり, 常圧下でさえ N_2 が約 15% 存在 (N_1 , ~85%) していることが分かった. ユビキチンの N_2 構造については, 3000 気圧の条件下 (N_1 が ~23%, N_2 が ~77% 存在下) で, 原子間距離情報と二面角情報を下に, NMR 立体構造解析に成功した (図 4b).⁶⁾溶液中では化学平衡状態にあるため, いずれの圧力でも N_1 と N_2 構造が共存した状態であるが, 30 気圧と 3000 気圧では, その分布率からもおおよそ “純粋” な N_1 , N_2 構造に近い構造と考えてよい. N_2 構造では, 活性部位 Gly76 を含む C 末端ストランドと α ヘリックスの配向が大きく変化し, C 末端側が大きく開いた構造になっているのが分かる. このように可変圧力 NMR 法により, 基底構造から変性構造に到るはるかに広い構造空間で揺れ動く蛋白質の構造を直接観測し, NMR 立

体構造解析が可能となった. これは NMR により揺れ動く蛋白質構造をあたかも “スナップショット” を撮るように表現が可能となったことを示す.

さらに高圧下では, 幾つかの残基の信号強度が選択的に減少し, それに伴い典型的な変性構造に由来する NMR 信号がスペクトル上に現れた (^1H : 8.3–9.0ppm/ ^{15}N : 110–130ppm).⁵⁾図 4c は各信号の圧力に対する強度変化を示している. NMR 信号強度は, 蛋白質内の各アミノ酸が立体構造を形成した状態にあるのか, 良く水和し変性した状態にあるのかを直接示す量であり, 分布率に対応する. よって, 幾つかの信号でみられた信号強度の減少は, それらの残基が局所的に変性状態に転移したことを意味する. 早く転移するグループ (灰線) と遅く転移するグループ (黒線) に分けられる. 早く転移する残基は, 8, 33–42 番で, 蛋白質の C 末端側に集中している (図 4d). また 70 番以上の C 末ストランドは, $\text{N}_1 \leftrightarrow \text{N}_2$ 転移に伴いその配向が大きく変化していることも考えると (図 4b), 加圧により蛋白質の C 末端側全体が大きく構造変化した局所変性構造が安定化されたことを意味する. 続いて起きる転移 (黒線) は, 分子全体が変性状態に転移したことに対応する. スペクトル変化は, 圧力に対して完全に可逆的であり, 局所変性構造 (I), 変性構造 (U) が, 基底構造 (N_1), 準安定構造 (N_2) とともに, 熱力学的な平衡状態にあることを意味する. また加圧に伴う信号強度変化 (図 4c) から, Fold 構造 (N_1 , N_2) に対する局所変性構造, 変性構造の ΔG^0 と ΔV^0 を見積もった.⁵⁾

図 5 は, 2000 気圧で 35°C から -21°C の NMR スペクトルを示す.¹⁶⁾圧力下と同様に, まず C 末端側の数残基で選択的な信号強度減少が生じ, 続いて全ての信号に強度減少が生じた. それに伴い典型的な変性構造に由来する

図4 (a) 可変圧力 NMR 法により測定したユビキチンの $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ HSQC スペクトル。⁵⁾ (b) 30 気圧 (左) と 3000 気圧 (右) におけるユビキチンの立体構造。⁶⁾ (c) NMR 信号強度の圧力依存性。それぞれの転移曲線は、各信号の強度変化を示す。早く転移するもの (灰線) と遅く転移するもの (黒線) に分類できる。⁵⁾ (d) ユビキチンの局所変性構造。構造が壊れている部位 (c) で早く転移したアミノ酸残基と C 末端領域) を、常圧のユビキチンの立体構造 (PDB: 1ubq) 上に示した。⁵⁾

NMR 信号がスペクトル上に現れた (^1H : 8.3–9.0 ppm/ ^{15}N : 110–130 ppm)。-21 °C におけるスペクトルは、pH2, 8M 尿素条件下で高度に変性した状態のスペクトルとよく似ていることから、低温下でも同程度に変性した状態であることが分かる。これらのことから、低温下でも N_1 – N_2 – I – U のコンフォメーション平衡は存在し、低温下では I や U が安定化されることが分かる。

図6は、可変圧力 NMR 測定により明らかになったユビキチン構造の全体像と自由エネルギー差 (分布率)、構造転移の速さを示す。常温常圧下では、 N_1 構造の分布率が支配的であり、通常は N_2 や I 構造など高エネルギー構

図5 可変圧力 NMR 法により測定したユビキチンの $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ HSQC スペクトル。2000 気圧における温度依存性と pH2, 8M 尿素条件下での HSQC スペクトル (文献 16 図 2 改変)

造を分光学的に捉えることは困難である。特に、構造変化が局所的である場合は、NMR など原子分解能の分光法が必要となる。可変圧力 NMR 法は、広い圧力と温度領域で NMR 測定を可能にする技術であり、原子分解能であるが故に蛋白質の構造空間を詳細に探索可能にする有効な手法である。

5・3 準安定構造の機能的意義

準安定構造は、基底構造にくらべ、分子との相互作用を円滑に行なうことが可能な高活性状態と考えられないだろうか。このような準安定構造は、この他にも複数の方法で確認されており、蛋白質構造のもつ共通の性質と理解されつつある。準安定構造の熱安定性は、蛋白質により異なるが、基底構造に比べ $\sim 10\text{kJ/mol}$ 程度不安定なだけであり、生理条件下で $\sim 10\%$ 程存在する場合もまれではない。近年の NMR による蛋白質ダイナミクス研究からは、蛋白質–蛋白質 (又は基質) 相互作用などの分子認識は、「コンフォメーション選択」であるという見方が強まっている。^{3), 22)} これは、蛋白質の複雑なコンフォメーション平衡の中に、標的分子との相互作用に必要な

図6 ユビキチンのコンフォメーション平衡とギブス自由エネルギーダイアグラム

(高活性な)構造, すなわち準安定構造が既に含まれているという考えである。また分子間相互作用を通して、必要に応じてその分布率を変えることで効率的に機能する場合もあるだろう。

では何故準安定構造が基底構造にならなかったのか? 変性構造と同様に準安定構造も, disorder 領域を含むため, プロテアーゼの標的になると考えると, 蛋白質はそれらを準安定に設計し分布率を下げることで, できるだけ分解から保護する必要がある。さらに, 蛋白質により細胞内で機能するタイミングや代謝時間も関係していると考えられる。実際に, 準安定構造など高エネルギー構造を多く含む蛋白質 (または条件) では, 圧倒的にプロテアーゼによる加水分解を受けやすい^{7), 8)}

本稿で紹介した蛋白質のコンフォメーション平衡や解離・会合平衡は, 圧力, 温度など環境因子により制御可能である。特に圧力は, 温度と異なり系全体に均一に加えることができる。コンフォメーション平衡は, 小分子から高分子に至るまでの一般的な性質なので, 目的に応じたコンフォメーション平衡を選択することにより, 物質輸送や信号調節などを目的とした, 分子デバイスへの応用も期待できる。

参 考 文 献

- 1) M. R. Sawaya and J. Kraut, "Loop and subdomain movements in the mechanism of Escherichia coli dihydrofolate reductase : Crystallographic evidence", *Biochemistry*, Vol.36, pp.586-603 (1997).
- 2) K. Akasaka, "Highly fluctuating protein structures revealed by variable pressure NMR", *Biochemistry*, Vol.42, pp.1875-1885 (2003).
- 3) D. D. Boehr, D. McElheny, H. J. Dyson and P. Wright, "The dynamic energy landscape of dihydrofolate reductase catalysis", *Science*, Vol.313, pp.1638-1642 (2006).
- 4) K. Sugase, H. J. Dyson and P. E. Wright, "Mechanism of coupled folding and binding of an intrinsically disordered protein", *Nature*, Vol.447, pp.1021-1025 (2007).
- 5) R. Kitahara and K. Akasaka, "Close identity of a pressure-stabilized intermediate with a kinetic intermediate in protein folding", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol.100, pp.3167-3172 (2003).
- 6) R. Kitahara, S. Yokoyama and K. Akasaka, "NMR snapshots of a fluctuating protein structure : ubiquitin at 30 bar-3 kbar", *Journal of Molecular Biology*, Vol.347, pp.277-285 (2005).
- 7) R. Kitahara, Y. Yamaguchi, E. Sakata, T. Kasuya, K. Tanaka, K. Kato, S. Yokoyama and K. Akasaka, "Evolutionally conserved intermediates between ubiquitin and NEDD8", *Journal of Molecular Biology*, Vol.363, pp.395-404 (2006).
- 8) R. Kitahara, C. Zhao, K. Saito, S. Koshiba, M. Inoue, T. Kigawa, S. Yokoyama and K. Akasaka, "Basic folded and low-populated locally disordered conformers of SUMO-2 characterized by NMR spectroscopy at varying pressure", *Biochemistry*, Vol.47, pp.30-39 (2008).
- 9) J. B. Johnson, D. C. Lamb, H. Frauenfelder, J. D. Muller, B. McMahon, G. U. Nienhaus and R. D. Young, "Ligand binding to heme proteins. VI. Interconversion of taxonomic substates in carbonmonoxymyoglobin", *Biophysical Journal*, Vol.71, pp.1563-1573 (1996).
- 10) H. Yamada, K. Nishikawa, M. Honda, T. Shimura, K. Tabayashi and K. Akasaka, "Pressure-resisting cell for high-pressure, high-resolution nuclear magnetic resonance measurements at very high magnetic fields", *Review of Scientific Instruments*, Vol.72, pp.1463-1471 (2001).
- 11) K. Akasaka and H. Yamada, "On-Line Cell High Pressure Nuclear Magnetic Resonance Technique : Application to Protein Studies", *Methods in Enzymology*, Vol.338, pp.134-158 (2001).
- 12) A. Cooper, "Thermodynamic fluctuations in protein molecules", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol.73, pp.2740-2741 (1976).
- 13) Y. O-Kamatari, R. Kitahara, H. Yamada, S. Yokoyama and K. Akasaka, "High pressure NMR spectroscopy for characterizing folding intermediates and denatured states of proteins", *Methods*, Vol.34, pp.133-143 (2004).
- 14) K. Akasaka, "Probing conformational fluctuation of proteins by pressure perturbation", *Chemical Reviews*, Vol.106, pp.1814-1835 (2006).
- 15) P. L. Privalov, "Thermodynamic problems of protein structure", *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry*, Vol.18, pp.47-69 (1989).

- 16) R. Kitahara, A. Okuno, M. Kato, Y. Taniguchi, S. Yokoyama and K. Akasaka, "Cold denaturation of ubiquitin at high pressure", *Magn. Reson. Chem.* Vol.44, pp.S108-S113 (2006).
- 17) H. Seemann, R. Winter and C. Royer, "Volume, expansibility and isothermal compressibility changes associated with temperature and pressure unfolding of staphylococcal nuclease", *Journal of Molecular Biology*, Vol.307, pp.1091-1102 (2001).
- 18) R. Kitahara, H. Yamada, K. Akasaka and P. E. Wright, "High pressure NMR reveals that apomyoglobin is an equilibrium mixture from the native to the unfolded", *Journal of Molecular Biology*, Vol.320, pp.311-319 (2002).
- 19) H. Matsuo, Y. Suzuki and S. Sawamura, "Solubility of α -amino acids in water under high pressure : glycine, L-alanine, L-valine, L-leucine, and L-isoleucine", *Fluid Phase Equilibria*, Vol.200, pp.227-237 (2002).
- 20) R. Kitahara, S. Sareth, H. Yamada, E. Ohmae, K. Gekko and K. Akasaka, "High pressure NMR reveals active-site hinge motion of folate bound *Escherichia coli* dihydrofolate reductase", *Biochemistry*, Vol.39, pp.12789-12795 (2000).
- 21) R. Kitahara, H. Yamada and K. Akasaka, "Two folded conformers of ubiquitin revealed by high-pressure NMR", *Biochemistry*, Vol.40, pp.13556-13563 (2001).
- 22) O. F. Lange, N. Lakomek, C. Fares, G. F. Schroder, K. F. A. Walter, S. Becker, J. Meiler, H. Grubmuller, C. Griesinger and B. L. Groot, "Recognition dynamics up to microseconds revealed from an RDC-derived ubiquitin ensemble in solution", *Science*, Vol.320, pp.1471-1475 (2008).