


 解説

蛋白質の構造安定性にジスルフィド結合が及ぼす 熱力学的影響

萩原 義久

(受取日：2010年1月25日，受理日：2010年3月1日)

Thermodynamic Effects of Disulfide Bonds on the Structural Stability of Proteins

Yoshihisa Hagihara

(Received Jan. 25, 2010; Accepted Mar. 1, 2010)

Disulfide bond has been believed to stabilize the proteins structure by restricting a freedom of the unfolded chain. To examine if this notion is true or not, I prepared the trypsin inhibitor and immunoglobulin fold domain mutants lacking or introducing the disulfide bonds. Thermodynamic analysis of these mutants indicates that the effects of disulfide bond on the stability of protein structure include conformational entropy of the native state and intramolecular interaction, in addition to the restriction of the unfolded chain.

Keyword: Disulfide bond, Protein folding, Structural stability, Circular dichroism, Differential scanning calorimetry

1. ジスルフィド結合と蛋白質の構造安定性

ジスルフィド結合は2つのシステインのチオール基が酸化的に共有結合し形成される。また還元剤存在下などの還元的な条件では可逆的に再開裂する。一般的にジスルフィド結合を有する蛋白質を還元すると、その立体構造の安定性が大幅に低下することから、ジスルフィド結合は立体構造を大きく安定化すると考えられている。

蛋白質の機能的立体構造の安定性は、立体構造を有する天然状態 (N状態) と立体構造を失ったアンフォールディング状態 (U状態) との自由エネルギー差 (ΔG) により決定される。ジスルフィド結合はU状態のポリペプチド鎖の自由度を制限する、すなわちU状態の構造エントロピーを減少させるため、蛋白質の立体構造を安定化すると考えられていた。U状態ではポリペプチド鎖の構造はランダムで

あり、その分布がガウス関数に従うとして、ジスルフィド結合の有無がU状態のエントロピーに及ぼす影響 ($\Delta S_{U,loop}$) は以下の式で表される。¹⁾

$$\Delta S_{U,loop} = -R (3/2 \ln n + A) \quad (1)$$

R は気体定数であり、 n はジスルフィド結合によって形成されるループのアミノ酸の数である。 A は定数であるが、3.47,¹⁾ 1.06²⁾ との報告がある。後者の値を取るとして、20残基のループでは $\Delta S_{U,loop}$ は $-46 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ となり、室温付近ではアンフォールディングの自由エネルギー (ΔG_U) に換算して立体構造を約 14 kJ mol^{-1} 安定化することとなる。

一方で、上記の様にU状態のエントロピー減少のみでジスルフィド結合の安定化効果を説明することに対しては異論もある。Doig と Williams³⁾ は熱力学的な解析が進んでい

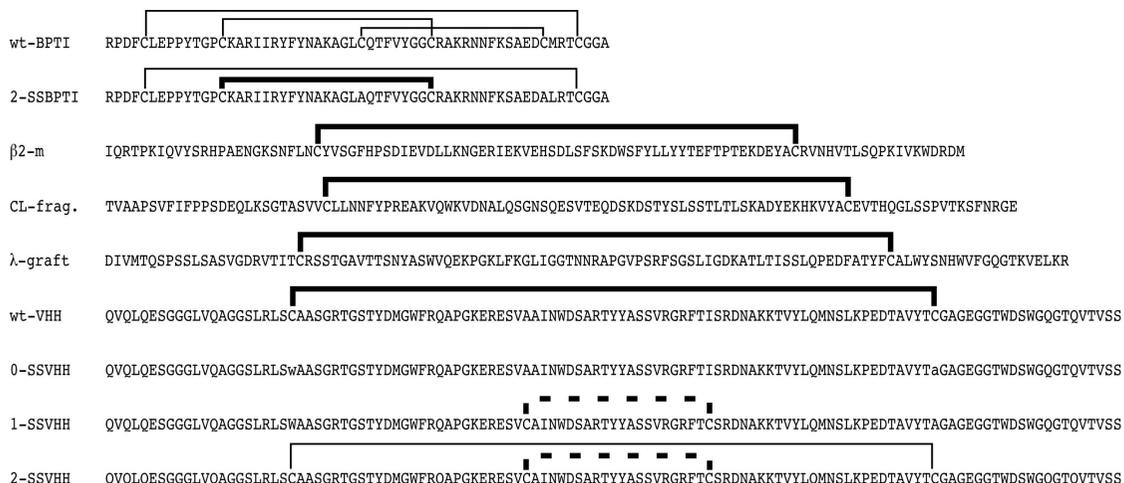


Fig.1 Amino acid sequences of proteins discussed in this article. Solid lines indicate disulfide bonds and thick lines among them correspond to the disulfide bonds which were replaced by random mutagenesis. Broken lines show the introduced artificial disulfide bonds.

るジスルフィド結合を有する蛋白質を例に解析を行った。これらの蛋白質の変性に伴うエンタルピー変化 (ΔH_U)、エントロピー変化 (ΔS_U) をアミノ酸残基数で割った値を、残基あたりのジスルフィド結合の数でプロットし、ジスルフィド結合の増加に伴い残基あたりの ΔH_U と ΔS_U が共に増加することを示した。つまりジスルフィド結合はエントロピーではなく、エンタルピー的に蛋白質の立体構造を安定化していることを示唆する。U状態の水和量はN状態のそれを上回っていると考えられており、アンフォールディングに伴う水合のエントロピー変化は負であり、この効果は蛋白質の構造を安定化する。ジスルフィド結合によりU状態の水和が減少 (U状態の水和のエントロピーが増加し、アンフォールディングに伴う水合のエントロピー変化の絶対値は減少) する効果が上記のポリペプチド鎖の構造エントロピーの減少分を上回ると仮定すれば、ジスルフィド結合はエントロピー的には蛋白質の立体構造を不安定化する。すなわちジスルフィド結合による安定化はエンタルピーに帰せられる。

これら2つのジスルフィド結合についての考え方は相矛盾するものである。ジスルフィド結合が及ぼす蛋白質構造の安定化効果はエントロピー的なのか? それともエンタルピー的であるのか? これを調べるためには、ジスルフィド結合を欠失または付加し、その効果を検討する必要がある。ジスルフィド結合の欠失は、還元条件下でジスルフィド結合を開裂させる、或はジスルフィド結合を形成するシステインを部位特異的アミノ酸変異で置換する、ことで可能となる。ジスルフィド結合の欠失による影響のみを取り出すことのできる実験手法が理想的であるが、何れの欠失方法

でもアミノ酸の性質の変化、則ち還元の場合にはシステイン (2個のシステインがジスルフィド結合を形成している状態の2個のアミノ酸) とシステインでは疎水性が顕著に異なる事が知られており、⁴⁾ 部位特異的アミノ酸置換を利用した場合ではシステインと他のアミノ酸との諸性質の違いに由来する影響を避ける事は出来ない。加えてジスルフィド結合を還元した場合、実験途中での再酸化により、精密な熱力学的パラメーターの測定が困難となる可能性がある。そこで筆者はウシ膵臓トリプシンインヒビター (BPTI)、続いて免疫グロブリンフォールド (Ig) ドメインを用いて蛋白質の構造安定性にジスルフィド結合が及ぼす熱力学的影響を、システインの部位特異的アミノ酸変異を利用して調べた。以下に、その結果を解説する。

2. BPTI のジスルフィド結合置換

BPTIは古くから蛋白質の構造、とりわけジスルフィド結合と蛋白質の構造形成の関連を探る研究の題材として用いられて来た。BPTIは58アミノ酸残基、分子量は6,500の小さな蛋白質であるが、分子内に3本のジスルフィド結合を持つ。3つのジスルフィド結合はそれぞれ5位と55位 (5:55)、30位と51位 (30:51)、14位と38位 (14:38) のシステインを架橋している (Fig.1)。これらのうち14:38のジスルフィド結合は蛋白質表面に露出している。筆者はこの14:38のジスルフィド結合 (Fig.2) に着目し、システインのアミノ酸置換によりこの結合を欠失させた場合、どのようなアミノ酸ペアによる置換が安定性の低下を最小限に抑えるのかをスクリーニング法により検討した。ここではジスルフィド結合を置換するとは「ジスルフィド結合

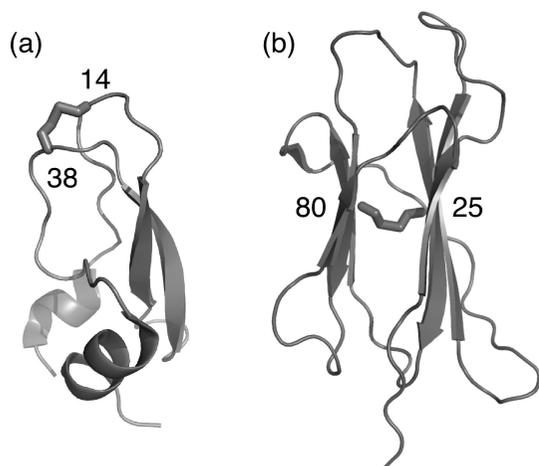


Fig.2 Crystal structures of BPTI (a) and human β 2-m (b). Disulfide bonds removed were indicated by sticks and positions of cystein residues were also indicated by numbers. The figures of BPTI and human β 2-m were drawn by PyMol¹⁷⁾ using PDB data of 7PTI¹⁴⁾ and 1HHG¹⁸⁾, respectively.

無しで酵母の生育温度 (30℃付近) で安定な立体構造の形成を許容する」と定義する。また、ジスルフィド結合を欠失した変異体の変性の熱的性質を調べ、ジスルフィド結合の熱力学についての考察を行った。⁵⁾

天然型のBPTIは極めて安定な蛋白質であり、中性での変性の中点温度 (T_m) は100℃以上である。⁶⁾ 30:51のシステインをアラニンに置換し、このジスルフィド結合を欠失させた変異体 (ジスルフィド結合を2本持つため2-SSBPTIと称す: Fig.1) の T_m は64℃である。また、30:51, 14:38のシステインをアラニンに置換して、5:55のジスルフィド結合のみを持つ変異体 (1-SSBPTI) では T_m は35℃となる。^{5,7,8)} 測定の容易さなどを考慮して、30:51をアラニンに置換した変異体をベースに、14:38のアミノ酸をランダムに置換した変異体ライブラリーを作製し、『細胞の品質管理機構スクリーニング』によりフォールディングしている変異体の探索を行った。本実験で用いたライブラリーサイズは約2万であり、スクリーニングは約8000個の酵母コロニーより行った。ジスルフィド結合を欠失するアミノ酸ペアは399種類であるから、ライブラリーサイズ及び検索コロニー数はほぼ全てのアミノ酸ペアを網羅するのに十分な数である。しかしスクリーニング系では、強いシグナルを発するクローンから、数十から100個程度と数を限り、順に選択するため、全てのフォールディング可能な変異体を選択している訳では無いと考えられる。

『細胞の品質管理機構スクリーニング』についての詳細は

Table 1 Mutations in isolated clones, T_m at pH 7.4, and inhibition of trypsin.⁵⁾

Groups	Mutations at positions 14/38 (mutation at another position)	T_m^a	% Inhibition of trypsin at 1:1 molar ratio at 37 °C ^b
C38V group	L/V	48	4
	M/V	49	3
	M/V(A16T)	50	3
	I/V	49	0
	V/V	47	3
C14G group	G/L	51	112
	G/M(A27V)	52	115
	G/V	52	107
	G/Q	49	83
	G/A ^c	47	100
Ctrl	A/V	41	54
	L/L	42	8
1-SS BPTI	A/A	35	63
2-SS BPTI	C/C	64	118

a. In this work, the thermocouple was soaked in the cell to measure the temperature of the solution more precisely. Therefore, the T_m values differ from those in previous work.

b. The error is roughly $\pm 5\%$ in the linear extrapolation of measurements to stoichiometric ratios.

c. Ref.7.

筆者による文献⁷⁾をご参考頂き、本稿では以下に概略のみ記す。筆者は、『細胞の品質管理機構』と呼ばれる細胞機能を利用することで、多数の配列、変異体の中から生理条件下で正常にフォールディングできる蛋白質のスクリーニング技術を独自に開発してきた。細胞は、分子シャペロンを使うことで、ミスフォールディングを起こした蛋白質を排除したり再構築するユニークなシステム、すなわち蛋白質生産に於ける『細胞の品質管理機構』を備えている⁹⁾。とりわけ、この機構は真核生物の蛋白質分泌系で詳しく調べられており、この機構によって正常にフォールディングした蛋白質が選択、分泌される一方、フォールディングできない配列は細胞内に留め置かれ、最終的には分解されることが知られている。この蛋白質分泌系の『品質管理機構』を利用すれば、未知配列のライブラリーを分泌系に導入し、それらの中から正常に細胞外に分泌されるものを選択することで、正常にフォールディングするアミノ酸配列をスクリーニングして行くことができる。これが『細胞の品質管理機構』スクリーニングである。本スクリーニングにより得られる変異体は室温付近で十分に安定な立体構造を持つ。

14:38のアミノ酸のランダム変異ライブラリーよりスク

リーニングされたジスルフィド結合を欠失した変異体及び、その T_m とトリプシンの阻害活性を**Table 1**に示す。 T_m の測定は円偏光二色性を利用し、二次構造の温度による変化を指標にpH 7.4で行った。得られた変異体は T_m が47℃以上であり、室温付近では安定にフォールディングしていた。しかし14:38に天然型のジスルフィド結合を持つ2-SSBPTIは T_m が64℃であり、得られた変異体の T_m は2-SSBPTIより12~17℃低下していた。すなわち、当たり前のことではあるが、天然に見られる様に14-38位にはシステインが存在し、これによりジスルフィド結合が形成される場合が、BPTIの立体構造は最も安定となる。また、円偏光二色性スペクトルから判断すると変異体は天然型と同程度の二次構造を持つ。興味深いことにこれら変異体は2つのグループに分けられた。1つは14位のシステインがグリシンに変異したグループ(C14Gグループ)、もう1つは38位がバリンに変異したもの(C38Vグループ)である。後者のグループでは14位には疎水的なアミノ酸が観察された。コントロールとしてC14A:C38V, C14L:C38Lの2つの変異体を作製し、その T_m を調べた結果、これらの T_m はスクリーニングによって得られた変異体より5℃以上低いことが明らかとなった。このことはC38Vグループの高安定性には14位の疎水性の高いアミノ酸と38位のバリンが必須であることを示している。C14Gグループは天然型に匹敵する阻害活性を有していたが、C38Vグループでは顕著な阻害活性は観察されなかった。BPTIの阻害中心は15位のリジンであり、C38Vグループの14位の疎水性アミノ酸が活性に悪影響を与えているものと想像される。

続いてこれらの変異体の熱力学的パラメータ、とりわけ変性のエンタルピー ΔH_U を決定するための実験を行った。測定は円偏光二色性を利用し、pHを変化させて複数の熱変性曲線を取得、これらのデータをまとめて解析することで37℃に於ける各変異体の変性のエンタルピーを見積もった(**Fig.3**)。興味深いことにC14Gグループの ΔH_U の平均は $221 \pm 7 \text{ kJ mol}^{-1}$ 、C38Vグループでは $180 \pm 7 \text{ kJ mol}^{-1}$ であり、両グループの37℃に於ける ΔH_U の値には顕著な差が見られた。これらの ΔH_U はCDの熱変性カーブより導き出されたが、示差走査型熱量計による測定でも同程度の差が計測された。また、2-SSBPTIの37℃に於ける ΔH_U は 208 kJ mol^{-1} であり、C14Gグループより僅かに小さい値であった。さらに37℃、pH 7.4に於ける変性のエンタルピー(ΔS_U)を見積もるとC14G, C38Vグループではそれぞれ平均で $683 \pm 20 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ 、 $559 \pm 21 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ となった。また2-SSBPTIではこの値は $616 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ である。この結果から2-SSBPTIは14-38位のジスルフィド結合を欠損させたC14Gグループに比較してエンタルピー的に安定化されていると言える。しかし、2-SSBPTIはもう

一方のC38Vグループよりも顕著に大きな変性のエンタルピー値を有し、2-SSBPTIはC38Vグループと比較した場合にはエンタルピー的に安定化されていると考えられた。

3. Igドメインのジスルフィド結合置換

上記実験では分子表面に露出しているBPTIの14:38のジスルフィド結合を取り扱った。それでは、分子内部に埋もれて溶媒とは相互作用しにくいジスルフィド結合のシステインを他のアミノ酸で置換する場合はどのような現象が観察されるであろうか?そこで、筆者はIgドメインの分子内部のジスルフィド結合についてBPTIと同様にランダムなアミノ酸置換と「細胞の品質管理機構スクリーニング」を組み合わせて、アミノ酸ペア探索を行った。一般にIgドメインは分子内部に埋もれた1本のジスルフィド結合を持つ(**Fig.2**)。また二次構造的には β シートからなる100から130アミノ酸残基のドメインであり、免疫グロブリンを構成している。実験はラクダ抗体の重鎖可変ドメイン(VHH)、ヒト化マウス抗体の軽鎖可変ドメイン(λ graft)、ヒト軽鎖定常ドメイン(CL fragment)、ヒトクラス1組織適応性抗原の軽鎖である $\beta 2$ ミクログロブリン($\beta 2$ -m)の4種類のIgドメインを用いて行った。¹⁰⁾ **Fig.1**にそのアミノ酸配列とジスルフィド結合の位置を示す。この研究で用いた4種の変異Igドメインライブラリーサイズは13,000~480,000、スクリーニングした酵母のコロニー数は4,000から79,000であった。

スクリーニングの結果を**Table 2**に示す。BPTIの場合同様に円偏光二色性を指標に T_m の測定も行っている。置換されたアミノ酸ペアの顕著な傾向として、バリンとアラニンを使ったペアが複数回登場している(**Table 2**)。他にもアラニンとイソロイシン、グリシンとロイシン、フェニルアラニン、バリンの組み合わせも4ドメインの内2種類のドメインで見られた。また全体的に疎水的なアミノ酸による置換が多いことも明らかである。これはIgドメインのジスルフィド結合が疎水的な蛋白質内部に包埋されているためであると考えられる。得られた変異体の中で最も安定なもの T_m をジスルフィド結合を還元した天然型ドメインと比較すると、VHHではC22W:C96A(W/A)で T_m は+4℃、 $\beta 2$ -mではC25V:C80Vで+6℃、CL fragmentではC26A:C86Vで+5℃、 λ graftではC23A:C91Yで-1℃であった。このことからVHH、 $\beta 2$ -m、CL fragmentではジスルフィド結合を還元した場合には、システインよりも構造を安定化する、つまりIgドメインの構造によりうまく適合するアミノ酸ペアが存在することが明らかとなった。

また本研究では1種類のドメインでしか見られないが興味深い変異も得られた。VHHでは22位と96位のシステインがそれぞれトリプトファンとプロリンに変異(W/P)し、

Table 2 Comparison of the thermal stabilities of the obtained mutants and control proteins.¹⁰⁾

Ig fold domain	Amino acid pair for replacing S-S bond ^a	T_m (°C)
VHH	C/C (Oxidized)	61
	C/C (Reduced)	41
	V/V (Ctrl)	32
	W/A	45
	A/A	42
	W/P G10Db	42
	A/V	41
	W/G	40
	S/A G97V	39
	A/I	39
	A/F	39
	G/V	38
	G/L	38
	V/A	37
	A/S	37
	G/F	36
	S/S	36
G/I	35	
G/A	35	
A/L	34	
β 2-m	C/C (Oxidized)	63
	C/C (Reduced)	37
	A/A (Ctrl)	37
	V/V	43
	V/A	42
A/V	41	
C _L fragment	C/C (Oxidized)	57
	C/C (Reduced)	32
	V/A (Ctrl)	29
	A/A (Ctrl)	23
	A/V	37
	A/I	36
	V/V	35
	G/F	29
	G/L	26
G/V	24	
λ graft	C/C (Oxidized)	54
	C/C (Reduced)	45
	A/A (Ctrl)	39
	A/Y	44
	A/V	40
	L/G	40
	V/A	39
	F/L W94R	32
	V/V	not cooperative
	I/V	not cooperative
	F/Y	not cooperative
	W/V	not cooperative
	W/I V17D	insoluble

a We have represented the amino acid pairs replacing the S-S bonds as one-letter amino acid code combinations, such as A/V. In this representation, the first letter indicates the mutated amino acid at the position of the first Cys, that is Cys 22 (VHH), 25 (β 2-m), 26 (C_L fragment), or 23 (λ graft). The second amino acid corresponds to the mutation at the position of the second Cys, that is Cys 96 (VHH), 80 (β 2-m), 86 (C_L fragment), or 91 (λ graft).

b The third mutation, G10D, did rather destabilize the protein. W/P without the third mutation showed a higher T_m (44 °C) than W/P G10D.

さらに10位のグリシンがアスパラギン酸 (G10D) に置換されたものがスクリーニングされた。付加的なG10Dの変異はむしろ構造を不安定化し、W/Pの変異のみでは T_m は44°Cであった。ジスルフィド結合を還元した天然型VHHの T_m は41°Cであり、W/P変異体はそれより T_m で3°C分安定である。プロリンは β シートを破壊することが知られており、何故W/P変異体が安定な構造を形成するのか不明である。さらにトリプトファン、プロリンともにシステインより大きな側鎖を有し、W/P変異体では置換場所周辺のアミノ酸がかなりの規模で再配置されているはずである。また、VHHドメインでは最も安定な変異体はW/Aであり、22位のトリプトファンの変異はVHHの構造安定性に有利に働くものと考えられる。

4. Igドメインへの新規ジスルフィド結合導入

上記3の研究から特定のアミノ酸の組み合わせ、例えばアラニンとバリン、が複数のIgドメインのジスルフィド結合を置換し得ることを示した。そこで、今度は逆に蛋白質内部の近接したアミノ酸のペアをシステインに置換して人工的に新規ジスルフィド結合が導入可能であるのかを調べた。¹¹⁾ 具体的には (1) 分子内部に埋もれていること、(2) β 炭素間の距離が4.5 Å以内であること、(3) 上記の実験で複数回見られたアミノ酸ペアである (グリシンを利用したものは側鎖の方向が分からないので除外した) ことを条件に、上記研究でも利用したIgドメインの1つであるVHH内でジスルフィド結合を導入する場所を探索した。(2)の条件は一般にジスルフィド結合を形成したシステイン間の β 炭素間の距離が3.5から4.5 Åであることによる。その結果、49位のアラニンと70位のイソロイシンの組み合わせが全ての条件に適合し、この部位 (49:70) をシステインに置換した。導入したシステインは酸化的に架橋されジスルフィド結合を形成し、またこれにより T_m が10°C程度向上することが明らかとなった。上記3の研究で得られたW/A変異体 (0-SSVHH)、これに新たにジスルフィド結合を導入した変異体 (1-SSVHH)、及び天然型のVHH (wild-type VHH) の3種 (Fig.1) の蛋白質について、その熱力学的性質を検討した。天然型に新規ジスルフィド結合を導入した変異体 (2-SSVHH) については、2本のジスルフィド結合が酸化架橋されていない分子が少数混入していたため、詳細な解析は行わなかった。なおVHHドメインは単独で抗原に結合することが知られており、全ての変異体について抗原結合を調べ、これらが天然型VHHと同程度の抗原結合能を有することも確認している。

天然型VHH, 0-SSVHH, 1-SSVHHの変性の熱力学的パラメータは蛋白質溶液のpHを変化させ、円二色性分散計と示差走査型熱量計を用いて変性曲線を測定、これを解析

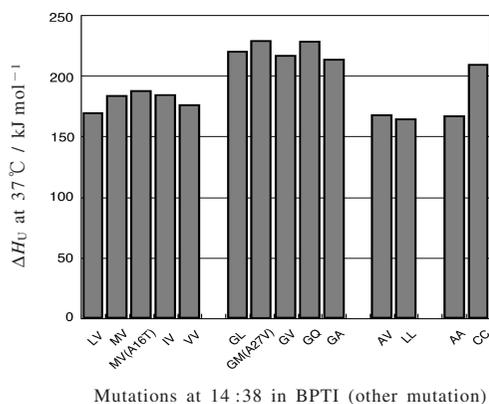


Fig.3 Enthalpy of unfolding of mutants, 1-SS BPTI, and 2-SS BPTI at 37°C.⁵⁾ The enthalpy values of unfolding (ΔH_U) at 37°C were calculated from the thermal unfolding curves for each mutant at different pHs using a global fitting method. Because more than six curves were used for curve fitting, the errors in ΔH_U at 37°C were very small (< 1%). Averaged ΔH_U at 37°C for the C38V group and the C14G group were 180 ± 7 kJ mol⁻¹ and 221 ± 7 kJ mol⁻¹, respectively.

することで決定した (Fig.3, Table 3)。まずエンタルピーについてであるが、3種の変異体の全てで T_m が45°C付近の変性曲線が得られたため、45°Cの値を基準として各変異体を比較した。45°Cに於ける0-SSVHHの ΔH_U はジスルフィド結合を有するVHHより顕著に大きかった。天然型及び1-SSVHHと比較すると、それぞれ、熱量測定では50, 30 kJ mol⁻¹、円偏光二色性では80, 50kJ mol⁻¹程度、0-SSVHHの ΔH_U は大きい。一方で変性に於ける比熱の変化 ($\Delta C_{p,U}$) は各変異体に顕著な差は見られなかった。ジスルフィド結合の存在により、天然型と1-SSVHHは0-SSVHHと比べて小さな ΔS_U を示した (Table 3)。CDの実験から求めた天然型と1-SSVHHの ΔS_U と0-SSVHHの同一pH, 45°Cでの ΔS_U 差の平均は、それぞれ-328, -205 J mol⁻¹ K⁻¹, DSCの実験からは-203, -133 J mol⁻¹ K⁻¹と見積もられた (Table 3)。一方、AをそれぞれPoland & ScheragaとPaceらの値として上で述べた式により $\Delta S_{U,loop}$ を計算すると、天然型では-83, -63 J mol⁻¹ K⁻¹、1-SSVHHでは-67, -47 J mol⁻¹ K⁻¹となり、 ΔS_U は計算された $\Delta S_{U,loop}$ よりも2倍以上大きいことが明らかとなった。

5. ジスルフィド結合形成の熱力学的効果

BPTI及びIgドメインを利用した研究から、まずジスル

Table 3 Thermodynamic parameters of VHHs.¹¹⁾

VHHs	Methods	ΔH_U at 45°C ^a (kJ mol ⁻¹)	$\Delta C_{p,U}$ ^a (kJ mol ⁻¹)	Average difference in ΔS_U at 45°C ^b (J mol ⁻¹ K ¹)
0-SSVHH	CD	360 ± 7	5.4 ± 0.7	
	DSC	342 ± 5	4.8 ± 0.4	
wild-type	CD	275 ± 6	5.3 ± 0.5	-328
	DSC	295 ± 5	4.8 ± 0.3	-203
1-SSVHH	CD	309 ± 3	5.3 ± 0.7	-205
	DSC	312 ± 5	5.2 ± 0.4	-133

a ΔH_U and $\Delta C_{p,U}$ were calculated by global fitting of CD data and linear fitting of ΔH_U s obtained from individual DSC data, respectively.

b The ΔS_U s of wild-type and 1-SSVHH were subtracted by ΔS_U of 0-SSVHH at the same pHs and these values were averaged.

フィド結合を除去するためのアミノ酸置換には多様なアミノ酸の組み合わせが存在することが明らかとなった。BPTIではC14G, 及びC38Vという二つの明確なパターンが見られた。一方でIgドメインではBPTIの様に特定のアミノ酸変異のみが見られる訳では無く、アラニンやバリン, グリシン, イソロイシンなどの数種のアミノ酸の組み合わせが多く見られるのみであり、またこれらのアミノ酸を使わない例外もあった。その原因は不明であるが、研究対象となったジスルフィド結合がBPTIの場合は溶媒に露出, Igドメインでは分子内に埋もれているという、周辺環境の違いがアミノ酸変異パターンの違いとなって現れているのかも知れない。導入した変異周辺のアミノ酸の再配置による構造最適化について想像を働かせてみる。蛋白質表面の親水性アミノ酸の疎水的な分子内部への移行はエネルギー的な障壁が高いため、蛋白質表面への変異導入により引き起こされる構造変化は分子表面に限られる、つまりアミノ酸の二次元的再配置が中心になるであろう。一方、分子内部では三次元的に疎水性アミノ酸の再配置が可能のため、分子表面での置換に比べ構造変化の余地が大きい。この説明では蛋白質を極めて単純化し、親水的な殻に覆われた疎水的な物質であると想定している。しかし、この考え方で分子表面の置換 (BPTI) にくらべ分子内部の置換 (Igドメイン)の方が置換するアミノ酸の種類に対する許容度が高いことが説明できる。

ジスルフィド結合の形成に伴う熱力学的パラメータの変化は、置換するアミノ酸ペアに依存することも明らかにな

った。システインを置換するパターンがC14Gグループの場合と比較した場合、BPTIの14:38のジスルフィド結合の形成はエンタルピー的にはやや不安定化、エントロピー的には大きく安定化に寄与している。エントロピーの値を細かく見ると37℃に於けるC14Gグループと2-SSBPTIの ΔS_U の差は $-67 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ である。 $\Delta S_{U,loop}$ はそれぞれPoland & Scheraga, Pace *et al* のAの値により $-69 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ と $-49 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ と計算され、実験値に近い値となっている。そのため、この場合、ジスルフィド結合はループエントロピーにより安定化されている、すなわち「ジスルフィド結合はU状態のポリペプチド鎖を拘束し、ために蛋白質の立体構造をエントロピー的に安定化する」というモデルに適合する。また最近、東京農工大の黒田のグループはC14G及びC14G:C38V変異体のX線結晶構造、及びこれら変異体についての詳細な熱力学的研究成果を発表した。^{12,13)} この報告によれば14:38のジスルフィド結合の除去により14位と38位のアミノ酸の α 炭素の位置が0.3から0.7 Å近接するという。すなわち、ジスルフィド結合による構造的な歪みが解消されたものと考えられる。これに伴い14, 38位近傍の複数のアミノ酸間の距離が減少し、また14:38近傍の原子間のパッキングが増加した(文献12, Table III)。Islamらはこれらによるvan der Waals相互作用の増強を示唆した。¹²⁾ van der Waals相互作用は ΔH_U を増加させると考えられており、C14Gグループの2-SSBPTIよりも若干大きな ΔH_U は変異によるパッキングの増加により説明できる。

一方、C38Vと2-SSBPTIの比較はジスルフィド結合による構造安定化機構は複雑であり、単純にU状態のエントロピーだけでは説明できないことを物語っている。C38Vグループとの比較では14:38のジスルフィド結合は立体構造をエンタルピー的に安定化、エントロピー的には不安定化する。この現象は、ジスルフィド結合の形成によるフォールディングに於ける水和量の変化の減少、またはvan der Waals相互作用や水素結合等の分子内部の相互作用の増加、さらには相互作用の増加に伴う立体構造の運動性の変化(この場合はジスルフィド結合形成により立体構造がより拘束される)を示唆している。局所的には14:38のジスルフィド結合は溶媒に露出していることから、¹⁴⁾ 14:38の周辺ではU状態の水和量とN状態の水和量に顕著な差は無いと考えられるため、変異の水和に及ぼす影響はさほど大きくないと思われる。そのため、C38Vグループと2-SSBPTIでは立体構造には差異があると想定されるが、残念ながら疎水的アミノ酸を有するC38Vグループの立体構造は未知である。黒木らの先駆的な研究でもヒトリゾチームの77:95のジスルフィド結合においてC38Vグループと同様の熱力学的効果が観察されている。¹⁵⁾ この報告では、C77A、及び

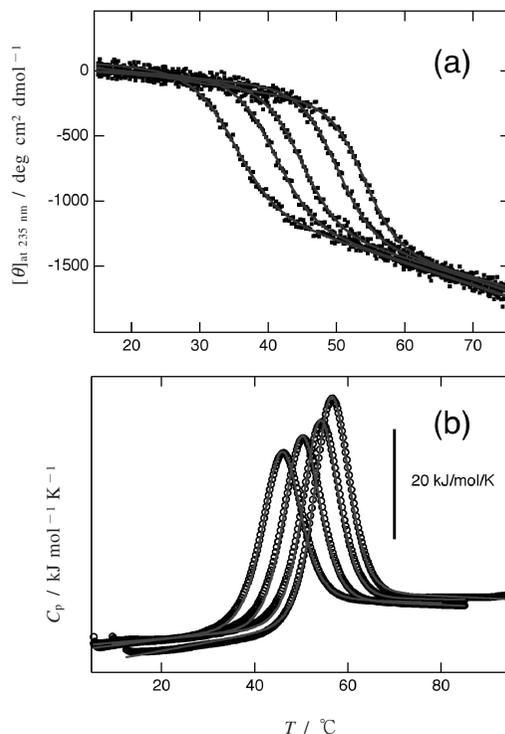


Fig.4 Thermal denaturation of VHHs at different pHs.¹¹⁾ Unfolding curves of 1-SSVHH measured by CD at pH 3.9, 3.5, 3.2, 2.9, and 2.6 (a) and by DSC at pH 4.1, 3.6, 3.3, and 3.0 (b). Gray continuous lines indicate the curves drawn by the parameters obtained in global (a) and individual (b) fitting methods.

C77A:C95A変異体の ΔH_U は天然型に比較して、57℃でそれぞれ 24 kJ mol^{-1} 、 41 kJ mol^{-1} 減少していた。一方でジスルフィド結合の欠失に伴い ΔS_U は減少した。天然型と比較するとC77A、及びC77A:C95A変異体の ΔS_U はそれぞれ $15 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ 、 $65 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ 低い値であり、計算された $\Delta S_{U,loop}$ ($-62 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$)を考慮すると、ループエントロピーの効果を除いたエントロピーの減少分は $77 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ 、 $128 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ となる。2-SSBPTIとC38Vグループの ΔS_U の差は $57 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ であり、Poland & Scheragaの値を利用して計算した $\Delta S_{U,loop}$ ($-69 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$)を考慮するとループエントロピーの効果を除くエントロピーは $126 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ となり、後者の値に近い。彼らは上記の熱力学的性質、及び基質結合の熱力学的解析から、リゾチームのC77A:C95A変異体では天然型に比較して立体構造の運動性がより高く、ジスルフィド結合は蛋白質の立体構造そのものを強固に保持することを示唆した。

VHHを用いた実験では天然型及び新規に導入したジスル

フィド結合により、 ΔH_U 及び ΔS_U は大きく低下した。また ΔS_U の低下は $\Delta S_{U,loop}$ 、つまり変性状態のポリペプチド鎖の拘束だけでは説明できない。BPTIのC14G変異体の結晶構造解析からその存在が示唆されたジスルフィド結合による構造的な歪みが、VHHドメインではより大規模に存在し、分子内の相互作用が減少するために ΔH_U が大きく低下したのかも知れない。また、N状態の分子内相互作用の減少は、同時にその自由度を上昇（構造エントロピーを減少）させるため、 ΔS_U の減少も説明可能である。また、 ΔH_U 及び ΔS_U にはU状態とN状態の水和の違いも影響する。 $\Delta C_{p,U}$ はアンフォールディングに於ける水和量の変化の良い指標だと考えられており、¹⁶⁾ VHHの場合では $\Delta C_{p,U}$ には顕著な差が観察されなかったことから、ジスルフィド結合の形成は水相には大きな影響は無い可能性がある。

BPTIのC38Vグループと2-SSBPTIの比較から $\Delta S_{U,loop}$ はジスルフィド結合による蛋白質安定化の主要な因子である。しかしVHHやBPTIのC38Vグループの研究から示された通り、ジスルフィド結合形成に伴う構造変化が大きい場合には、 $\Delta S_{U,loop}$ の効果を上回るエンタルピーやエントロピーの変化が構造安定性に影響を及ぼす。つまり、ジスルフィド結合が形成されることによる立体構造変化が安定性に強く関与する。また、蛋白質によっては水和の変化を考慮する必要があるかもしれない。蛋白質の安定性に於けるジスルフィド結合の熱力学的効果は、結合形成前と形成後の $\Delta S_{U,loop}$ 、N状態の構造エントロピー、分子内相互作用等の種々の熱力学的要因の状態変化の総和として考えるべきである。

文 献

- 1) D. G. Poland and H. A. Scheraga, *Biopolymers* **3**, 379 (1965).
- 2) C. N. Pace, G. R. Grimsley, J. A. Thomson and B. J. Barnett, *J. Biol. Chem.* **263**, 11820 (1988).
- 3) A. J. Doig and D. H. Williams, *J. Mol. Biol.* **217**, 389 (1991).
- 4) N. Nagano, M. Ota and K. Nishikawa, *FEBS Lett.* **458**, 69 (1999).
- 5) Y. Hagihara, K. Shiraki, T. Nakamura, K. Uegaki, M. Takagi, T. Imanaka and N. Yumoto, *J. Biol. Chem.* **277**, 51043 (2002).
- 6) E. Moses and H. J. Hinz, *J. Mol. Biol.* **170**, 765 (1983).
- 7) Y. Hagihara and P. S. Kim, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 6619 (2002).
- 8) J. P. Staley and P. S. Kim, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 1519 (1992).
- 9) L. Ellgaard and A. Helenius, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **4**, 181 (2003).

- 10) Y. Hagihara, T. Matsuda and N. Yumoto, *J. Biol. Chem.* **280**, 24752 (2005).
- 11) Y. Hagihara, S. Mine and K. Uegaki, *J. Biol. Chem.* **282**, 36489 (2007).
- 12) M. M. Islam, S. Sohya, K. Noguchi, S. Kidokoro, M. Yohda and Y. Kuroda, *Proteins* **77**, 962 (2009).
- 13) M. M. Islam, S. Sohya, K. Noguchi, M. Yohda and Y. Kuroda, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 15334 (2008).
- 14) C. Eigenbrot, M. Randal and A. A. Kossiakoff, *Protein Eng.* **3**, 591 (1990).
- 15) R. Kuroki, K. Inaka, Y. Taniyama, S. Kidokoro, M. Matsushima, M. Kikuchi and K. Yutani, *Biochemistry* **31**, 8323 (1992).
- 16) P. L. Privalov, *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **18**, 47 (1989).
- 17) W. L. DeLano, *The PyMOL Molecular Graphics System*, DeLano Scientific, Palo Alto, CA, USA (2002).
- 18) D. R. Madden, D. N. Garboczi and D. C. Wiley, *Cell* **75**, 693 (1993).

要 旨

システインが酸化的に架橋され形成されるジスルフィド結合は蛋白質の立体構造安定性に強く寄与している。ジスルフィド結合は変性状態に於けるポリペプチド鎖を拘束するため、エントロピー的な効果で蛋白質の構造を安定化すると考えられて来たが、これは果たして真実であろうか？ 筆者は、この問いに答えるべく、ジスルフィド結合を有する代表的な蛋白質として知られるトリプシンインヒビターや免疫グロブリンフォールドドメインを利用した研究を行った。まず部位特異的のアミノ酸変異によりこれら蛋白質の天然型ジスルフィド結合の欠失や新規ジスルフィド結合の導入を行った。作製したジスルフィド結合変異体の安定性解析から、ジスルフィド結合が蛋白質の立体構造に及ぼす熱力学的効果は、ポリペプチド鎖の拘束の効果だけでは説明できず、天然状態の構造エントロピーの変化や分子内相互作用等の種々の熱力学的要因の状態変化の総和であることを明らかにした。



萩原義久 Yoshihisa Hagihara
 独立行政法人 産業技術総合研究所 (AIST), National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), E-mail: hagihara-kappael@aist.go.jp
 研究テーマ：抗体分子科学, 抗体工学