

京都大学教育研究振興財団助成事業  
成 果 報 告 書

令和3年 4 月 20 日

公益財団法人京都大学教育研究振興財団

会 長 藤 洋 作 様

所 属 部 局 複合原子力科学研究所

職 名 助教

氏 名 喜田 昭子

助 成 の 種 類	令和2年度 ・ 研究活動推進助成			
申請時の科研費 研究 課 題 名	タンパク質変性における開裂部位の構造基盤の解明			
上記以外で助成金 を 充 当 した 研 究 内 容	なし			
助成金充当に関 わる共同研究者	(所属・職名・氏名) なし			
発表学会文献等	(この研究成果を発表した学会・文献等) 喜田昭子・森本幸生 (京大複合研)「ニワトリ卵白リゾチームを使った、重水内変性/再生試料の中性子線結晶構造解析」日本結晶学会令和2年度年会; 喜田昭子・森本幸生 (京大複合研)「変性/再生部位を重水素ラベルしたタンパク質の中性子線結晶構造解析」京都大学複合原子力科学研究所第55回学術講演会			
成果の概要	研究内容・研究成果・今後の見通しなどについて、簡略に、A4版・和文で作成し、添付して下さい。(タイトルは「成果の概要／報告者名」)			
会 計 報 告	交付を受けた助成金額	1,000,000	円	
	使用した助成金額	1,000,000	円	
	返納すべき助成金額	0	円	
	助成金の使途内訳	費 目	金 額	
		プラスチック器具他消耗品	461,318	
		結晶化用試薬類	433,921	
		ガラス器具	7,254	
		PC記憶媒体	62,360	
文具		735		
他(学会参加費等)	34,412			
合計	1,000,000			
当財団の助成につ いて	(今回の助成に対する感想、今後の助成に望むこと等お書き下さい。助成事業の参考にさせていただきます。) 科研費が採択されず非常に厳しい状況だったのですが、貴財団のご支援のおかげでコロナ禍においても研究を進めることができました。また貴財団のご支援は精神的にも大きな支えになりました。どうもありがとうございました。			

## 成果の概要 / 喜田昭子

### 研究内容

生体分子であり高機能触媒でもある酵素は、基質に対しての高選択性反応だけではなく安全面や衛生面からも、非常に利用価値が高い。しかし、酵素はタンパク質であるために、熱や pH などの環境変化により変性しやすいことが弱点である。道具としての酵素に耐変性能力を持たせることができれば、その産業・医薬品への利用の可能性を格段に広げることができる。そのため、タンパク質の変性機序に関する研究は大きな意義を持つ。しかし変性してしまったタンパク質は凝集して不可逆的に不溶性沈殿になることが多く、また変性から再生したタンパク質は元の構造に戻るため、その過程で何が起きているかは、これまでにほとんど明らかになっていない。

我々は、モデル試料としてニワトリ卵白リゾチーム(分子量約 14kDa)を使い、重水中で熱や pH 変化などでタンパク質を変性させ、その後変性要因を除外して構造を再生させたときに、その質量の有意な増加を確認した。これは変性部位の水素が重水素置換された事を意味している(1)。このとき、変性要因によって重水素置換数が有意に違っていたことから、各変性部位が異なっていることが示唆された。その後、重水内で変性/再生を行った試料の大型結晶を作製し、中性子線回折実験で重水素化位置の決定に成功した。この実験では、試料を溶液状態で変性/再生させているために、得られた重水素化位置は結晶内の分子間接触の影響は受けておらず、変性要因による影響のみの知見を得ることができる。Control 結晶(2)との重水素位置の比較により、変性操作により特異的に重水素化を受けた部位を特定できた。すなわち可逆的変性においてどの部位が影響を受けたかを直接可視化でき、この「重水内でのタンパク質分子の変性/再生と、その中性子線結晶構造解析」による手法が、タンパク質変性の研究に利用できることが判った。しかしリゾチームは小さい分子であるため、タンパク質表面のどの部位の開裂が分子内部の重水素化に帰結したかの一義的な決定は困難であった。そこで、リゾチームよりも大きなタンパク質分子を使って重水内での変性/再生操作による重水素化位置を決定し、分子内部の変性につながる分子表面の開裂部位を明らかにすることを計画した。本研究期間においては当該試料の変性/再生条件の決定と、非変性および変性/再生タンパク質の中性子線回折実験に供するための結晶化条件の検討を行った。

### 研究成果

本研究においては、均一な品質の試料の入手が容易で、分子量がリゾチームの 2 倍近いタンパク質である Proteinase K を対象に選んだ。このタンパク質を重水に溶解してから pH を

変化させ、その後 pH を中性に戻すことで変性/再生が達成しているかどうかを、質量分析で確認した。このとき、塩基性試薬を加えた後 pH を戻した場合にコントロール試料からの有意な質量増加が確認できた。

次に、この変性/再生操作でタンパク質が再生しているかどうかを、非変性試料と同じ条件で結晶が得られるかどうかを指標として確認した。タンパク質試料に対して様々な比率で塩基性試薬を加え、低温で静置させた後に、酸性試薬を加えて pH を中性に戻した。その後、透析でタンパク質の溶媒を置換してから、結晶化を行った。このとき、タンパク質試料に対して、2mmol/L になるよう NaOH を加えて変性/再生させたときに、コントロール試料と同じ条件で結晶を得ることに成功した。これよりも高濃度の NaOH で変性させたときは結晶を得ることができなかった。タンパク質に酸性試薬を加えた後に pH を戻した試料で同じ操作を行った時には、酸性試薬濃度に関わりなく容易に結晶が得られたことより、塩基性変性/再生試料で結晶を得ることが困難であったのは変性によりタンパク質構造が壊れてしまうことが原因と考えられた。ここで得られた可逆変性条件は、「構造が不可逆変性に至る一歩手前の状態」、と考えることができる。この重水素化位置を決定することで、このタンパク質の塩基性変性における、不可逆的に変性が進むきっかけとなる変性箇所＝変性起点の候補となる箇所の構造を明らかにできると考えられる。

変性/再生実験に並行して、結晶化条件の再検討を行った。変性の影響による正確な重水素化位置を知るためには、全ての過程においてタンパク質以外の試薬に重水素化物を用いる必要がある。高価な重水素化試薬のコストを少しでも抑えるために、なるべく汎用的で入手容易な重水素化試薬を用いることを考えた。このタンパク質では、クエン酸緩衝溶液を使用した結晶化条件が既に明らかになっており、前述の変性/再生状態を確認するための結晶化もこの条件で行ってきたが、条件検討の結果、重水素化試薬の入手が比較的容易な酢酸系緩衝溶液でも結晶が得られることが判った。本タンパク質では結晶化試薬には水素が含まれていないため、この条件で重水内変性/再生結晶を作製し、中性子線構造解析を行えば、コントロールと比較することで、変性操作の結果としての重水素化位置を検出できる。現在、新しい条件で中性子線結晶解析に適した大きな結晶を得るために、結晶化条件検討を進めている。

(1) [A. Kita](#) and Y. Morimoto, *Mol. Biotechnol.*, **58**, 130-136 (2016).

(2) [A. Kita](#) and Y. Morimoto, *J. Appl. Cryst.*, **53**, 837-840 (2020).