

氏名(本籍)	ひらの 平野	あつし 篤(静岡県)
学位の種類	博士(工学)	
学位記番号	博甲第5286号	
学位授与年月日	平成22年3月25日	
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当	
審査研究科	数理解物質科学研究科	
学位論文題目	Thermodynamic Stability of Protein and Nucleic Acid in Salt and Amino Acid Solutions (塩およびアミノ酸溶液中のタンパク質と核酸の熱力学的安定性)	
主査	筑波大学教授	理学博士 青木 貞雄
副査	筑波大学教授	工学博士 長崎 幸夫
副査	筑波大学准教授	理学博士 野口 巧
副査	筑波大学准教授	博士(工学) 長谷 宗明
副査	筑波大学准教授	博士(理学) 白木 賢太郎

論文の内容の要旨

細胞内にはタンパク質や核酸などの生体高分子が多数存在している。生体高分子は一般的な合成高分子と異なり、生理的条件下で固有の立体構造を形成することで生物学的な機能を担っている。細胞内の生体高分子の安定性を明らかにするためには、塩やアミノ酸といった細胞内に多数存在する低分子化合物と生体高分子の相互作用の理解が不可欠である。そこで、本研究では塩およびアミノ酸の存在下でのタンパク質と核酸の熱安定性を熱力学的に評価し、さらにその背後にあるメカニズムの解明を試みた。

第一章では、塩存在下でのタンパク質の熱安定性と熱凝集速度の関係を調べた。熱安定性および熱凝集速度は添加した塩のモル表面張力増加率に従って高くなったが、アンモニウム塩は例外的に熱安定性に関わらず熱凝集速度を抑制した。そこで、アンモニウム塩はタンパク質の疎水性領域のみと相互作用することで、会合中間体の活性化エネルギーを増加させることを想定した。次に、トランス-シクロヘキサジアミンを含有した溶液中でのタンパク質の熱凝集速度を調べた結果、これらの化合物によるタンパク質凝集抑制効果は、タンパク質の疎水性領域との相互作用だけでなく、アミノ基の荷電状態にも依存することを示した。

第二章では、アルギニンおよび塩化ナトリウム存在下でのDNAの熱安定性を調べた。低濃度のアルギニンおよび塩化ナトリウムはDNAの熱融解温度を増加させたが、高濃度のアルギニンはDNAの熱融解温度を低下させた。核酸塩基の溶解度実験によって、アルギニンが核酸塩基の溶解度を高め、核酸塩基を溶液中で安定化させることを示した。したがって、高濃度のアルギニンによるDNAの熱融解温度の低下はアルギニンと核酸塩基の相互作用に帰着された。

第三章では、生体高分子に対する塩およびアミノ酸の作用を難水溶性薬剤の可溶化に応用することを目指した。その結果、塩の中ではカオトロープが溶解度を向上させた。アミノ酸の中では、アルギニンが芳香環を有する難水溶性薬剤の溶解度を向上させた。リジンは可溶化効果を殆ど示さなかったことから、アルギニンの可溶化効果は、アルギニンの側鎖のグアニジウム基と薬剤の芳香環との相互作用に起因することを示した。また、分子動力学シミュレーションを用いたことで、以上の相互作用が支持された。アルギニンは有機

溶媒や界面活性剤と異なり、生体適合性の高いアミノ酸であるため、芳香環を有する一般的な薬剤の可溶化への応用が期待される。

第四章では、カオトロープが難水溶性の低分子化合物の溶解度を向上させた前章までの結果を応用して、タンパク質とカーボンナノチューブの複合体の水溶液分散の向上を試みた。分散向上剤としてカーボンナノチューブの疎水性界面の安定化が期待させるアルコールおよびカオトロープを用いた結果、ハロゲン系アルコールおよびグアニジンを含む溶液がタンパク質とカーボンナノチューブの複合体の分散を向上させることを示した。

本研究によって、塩およびアミノ酸がタンパク質と核酸の熱力学的安定性を変化させることを示した。タンパク質の安定性を構成要素単位で考察する物理化学的手法は半世紀前から行われてきたが、近年のタンパク質工学や構造解析技術の発展にも関わらず、溶液中でのタンパク質の安定性評価にこのような物理化学的手法が未だに適用しうることは驚くべき点である。薬剤のような低分子化合物からタンパク質や核酸などの生体高分子、カーボンナノチューブのようなナノ粒子に至るすべての化合物を溶液で扱うためには、当該論文で示した物理化学的手法が不可欠であると結論づけた。

審 査 の 結 果 の 要 旨

著者は研究背景として、細胞内に存在するタンパク質や核酸といった生体高分子の熱力学的安定性について述べた。タンパク質はアミノ酸を構成要素としており、アミノ酸の配列に従った立体構造にフォールディングする。タンパク質のフォールディングに関わる相互作用として挙げられるのが、水素結合や、静電相互作用、ファンデルワールス力、疎水性相互作用といった非共有結合である。なかでも水素結合はタンパク質のコンフォメーションを制限するため、タンパク質の立体構造の特異性の主因にもなる。一方、核酸は核酸塩基およびリン酸、糖を構成要素としており、特にDNAは右巻きの二重螺旋構造を形成する。細胞内では、さらにヌクレオソームの形成や核酸塩基のメチル化の他に、タンパク質やイオンの寄与などによって高次構造が制御される。核酸の二重螺旋構造はタンパク質と同様に非共有結合によって制御されるが、特に重要な役割を果たしているのは、核酸塩基間の水素結合や $\pi-\pi$ 相互作用、疎水性相互作用である。このような生体高分子の立体構造は試験管内では不安定であり、変性や凝集が引き起こされることも多い。しかしながら、細胞には生体高分子の変性や凝集を避ける厳密な仕組みが備わっている。著者は以上のような背景の下、細胞内に存在する低分子化合物も生体高分子の不安定化を防ぐ役割を担っていることを想定し、塩やアミノ酸といった低分子化合物が細胞内で果たす役割を理解することを目的とした。

第一章では、塩やアミノ酸を含む溶液中でのタンパク質の熱安定性と熱凝集速度を調べた。コスモトロープは熱変性によって増加したタンパク質の界面エネルギーを高め、その結果、熱凝集へのエネルギー障壁を下げることで、タンパク質の熱凝集を促進することを明らかにした。一方で、カオトロープは界面エネルギーを低下させることで凝集を抑制することを示した。用いられた塩の中でも、アンモニウム塩はその他のコスモトロープやカオトロープとは異なり、熱凝集を大きく抑制することを示した。そこで、アンモニウム塩はアミノ酸の一種であるアルギニンと同様にタンパク質の会合部と相互作用することで凝集を抑制することを想定した。つぎに、シクロヘキサンジアミンもタンパク質の熱凝集を抑制することを明らかにし、上記の仮説が正しいことを実証した。

第二章では、アルギニンによるタンパク質凝集抑制効果を発展させ、アルギニンが核酸の熱安定性を変えることを示した。アルギニンは低濃度では核酸の熱安定性を向上させ、高濃度では熱安定性を低下させることを明らかにした。このようなアルギニンによる核酸の熱安定性の変化は、アルギニンの塩としての効果だけでなく、アルギニンの側鎖のグアニジウム基と核酸塩基の相互作用に帰着されることを示した。

第三章では、塩やアミノ酸と生体高分子の相互作用を、難水溶性薬剤の可溶化へ応用した。中でもアルギニンは難水溶性薬剤の溶解度を大きく増加させることを明らかにした。この結果がアルギニンとタンパク質や核酸との相互作用と同様の機構に基づいていることを溶解度実験だけでなく分子動力学シミュレーションからも示した。

第四章では、カオトロップやアルコールがもつ界面エネルギーの安定化効果を応用して、タンパク質が吸着したカーボンナノチューブの水溶液分散を向上させた。水に不溶のカーボンナノチューブにタンパク質とカオトロップまたはアルコールを混合させることによって、タンパク質とカーボンナノチューブの複合体の分散量が増加することを明らかにした。以上で示したように、著者は生体高分子の水溶液中での熱力学的解析を通して、難水溶性分子の水溶液分散法を確立することに成功した。これらの知見に基づいて、生物の理解だけでなく、難水溶性薬剤を用いる医療やカーボンナノチューブを用いるナノテクノロジーへの応用が期待される。

よって、著者は博士（工学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。