

Ion Specific Effects on Protein-Protein Interactions Studied by Fluorescence Spectroscopy

加藤, 茜

<https://hdl.handle.net/2324/4784692>

出版情報 : Kyushu University, 2021, 博士 (農学), 課程博士

バージョン :

権利関係 : Public access to the fulltext file is restricted for unavoidable reason (3)

氏名	加藤 茜			
論文名	Ion Specific Effects on Protein-Protein Interactions Studied by Fluorescence Spectroscopy (蛍光分光法によるタンパク質間相互作用に及ぼすイオン特異的効果についての研究)			
論文調査委員	主査	九州大学	准教授	西本悦子
	副査	九州大学	教授	角田佳充
	副査	九州大学	教授	石野良純

論文審査の結果の要旨

タンパク質間相互作用は、静電力、ファンデルワールス力、排除体積効果、生体特異的相互作用、疎水性相互作用、水和力などが複雑に絡み合った結果としてもたらされるが、これらの相互作用を詳細に記述することは、酵素反応や分子認識など多くの生命現象の解明、およびタンパク質集合体の高度利用の実現に極めて重要である。従来、タンパク質間の相互作用は物理化学的にネルンストの関係式、熱力学第二法則に基づく自由エネルギー、エントロピー、エンタルピーの変化を通じてその特性が議論されてきた。しかし、このような方法は適用できる範囲が比較的強い相互作用をもつ場合に限定されるため、本研究論文はより広い観点から分子間相互作用を把握するための方法を提案している。すなわち、溶液中でのタンパク質の分子運動に着目し、その回転拡散係数の拡張型ビリアル展開から相互作用の特性を示す第二、第三ビリアル定数を導出し、これらを分子間相互作用の指標とするものであった。

本研究ではまず、水溶性球状分子であるリゾチームのN末端をAlexa色素で蛍光標識し、これをタンパク質試料としている。蛍光は高濃度条件下では多重光散乱や共鳴エネルギー移動、再吸収などの要因のため厳密な測定が困難であるが、任意の濃度のリゾチーム溶液にそれぞれ蛍光標識したリゾチームをごく微量混合し、蛍光色素をトレーサーとすることでタンパク質高濃度条件下での蛍光測定を可能にしている。タンパク質濃度の関数としての回転拡散係数 D_{rot} は、定常光励起またはサブピコ秒パルス励起時間分割蛍光異方性を精密に測定することにより決定された。この D_{rot} をタンパク質濃度に関してビリアル展開することで、1次項の係数である第二ビリアル定数、2次項の係数である第三ビリアル定数が導出された。ここで得られる第二、第三ビリアル定数はそれぞれ二分子、三分子分布関数により決定され、タンパク質の相互作用ポテンシャルを強く反映するものである。

これらの相互作用解析をタンパク質間相互作用に及ぼすイオン特異的効果の機構解明に適用した結果、蛍光異方性の減衰から決定されたタンパク質の回転拡散係数は、各種カチオン、アニオンに誘導された特異的効果により強く影響され、第二ビリアル定数に負、第三ビリアル定数に正の値を与えることが示された。すなわち、各種イオンに応じた引力と斥力が同時にタンパク質間に誘導され、一価カチオンにおいては $\text{Na}^+ > \text{K}^+ > \text{Li}^+ > \text{NH}_4^+ > \text{Cs}^+$ の順に強い引力が誘導されることが見出された。また、リゾチーム正方晶の形成に最適な第二ビリアル定数の範囲は $-0.08 \text{ mL/mg} \sim -0.04 \text{ mL/mg}$ であり、適度な引力がはたらく条件においても第三ビリアル定数で与えられる斥力の重要性が初めて実験的に明らかにされた。

このような回転拡散係数のビリアル定数に現れるイオン特異的効果は、個々の自由運動を抑えられた二量体タンパク質のドメイン間にも認められることが共鳴型励起エネルギー移動の解析による分子間距離のイオン種及びその濃度依存性の結果からも明らかにされた。

以上要するに、本論文は、高度な蛍光分光法と分子運動論的解析に基づき、タンパク質間相互作用に及ぼすイオン特異的効果に関する有用な知見を得たものであり、その成果はタンパク質科学のみならず生体物理化学の発展に寄与する価値のある業績と認める。よって、本研究者は博士（農学）の学位を得る資格を有するものと認める。