

学 位 論 文 の 要 旨

糖によるタンパク質の構造及び水和の安定化作用の分子機構の解明
(Elucidation of the molecular mechanism of sugar-mediated stabilization of
protein structure and hydration)

氏 名 味戸 聡志 印

糖およびポリオールによってタンパク質の変性および酵素の失活が防止されることが知られている。これらの添加剤は、生化学や食品保存の分野などで広く利用されている。このタンパク質保護作用は、水和構造を通じて発揮されると考えられている。これまでに、密度測定、熱量測定、円偏光二色性、NMR等を用いた実験的研究が実施されてきたが、タンパク質と溶媒間の相互作用を直接明らかにした研究は乏しい。従って、このメカニズムが完全には解明されたとは言えない。その一方で、タンパク質の折りたたまれるメカニズムは、依然として生物学における重要な問題の1つである。水溶液中のタンパク質の安定性は、塩等の共溶質、および温度や圧力の影響を受ける。しかし、大量の共溶質が存在する濃厚溶液中で特定のタンパク質構造を実験的観察することが困難であったため、実験的なタンパク質のアンフォールディング-フォールディングの研究は希薄溶液で行われてきた。

本研究では、放射光 X 線広角散乱(WAXS)および中性子小角散乱(SANS)を用い、タンパク質構造とその水和構造に対する糖の効果について直接的な証拠を得ることに成功した。さらに、化学変性、熱変性、および酸変性条件下におけるミオグロビンの構造転移に対する糖の効果解析した。研究試料には、ミオグロビンを典型的な球状タンパク質として用いた。糖としては、二糖であるトレハロースおよびスクロース、単糖であるグルコースおよびフルクトースを用いた。

第1章は、序章として生体およびタンパク質に対する糖の保護作用の概要と、本研究で用いた試料であるミオグロビンやアミロイド線維およびトレハロースの特性について述べた。第2章では実験手法について述べた。ここでは、研究で利用した施設の概要および散乱の基本理論に加え、WAXS データのバックグラウンド処理方法、ギニエ解析、距離分布関数、所属研究室が開発した転移多状態解析法(TMA)について説明した。

第3章から第5章までに研究結果および考察を述べた。第3章では WAXS と SANS を相補的に使用し、タンパク質の水和殻に対するトレハロースおよびグ

ルコースの効果を検討した。WAXS と SANS の実験データを詳細に議論するため、理論散乱関数のシミュレーションを実施した。理論計算では、糖の存在下で考えられる 2 つのモデルを想定した。選択的排除モデルでは、選択的溶媒和によって糖分子がタンパク質水和水と置換される。このモデルは、タンパク質水和殻の散乱密度の増加として観測され得る。選択的排除では、水和斥力により糖分子がタンパク質の水和殻から選択的に排除される。これは、タンパク質の選択的水和とも呼ばれ、タンパク質水和殻密度の保存として観測され得る。WAXS の結果は、タンパク質表面からの糖分子の排除が 25%w/w 未満の糖濃度で支配的であることを明確に示した。また、選択的排除および水和殻保存作用は、グルコースに比べてトレハロースでより支配的であった。重水素化グルコースを使用した SANS 実験の結果は、グルコース濃度の増加にも関わらず、タンパク質水和殻の密度がほぼ一定に保存されることを明確に示した。この結果は、糖分子がタンパク質の水和殻から選択的に除外されるという WAXS の結果を強く支持するものである。

第 4 章では第 3 章の研究を展開した。ここでは、タンパク質の水和殻に対する効果に加えて、化学変性および熱変性に対する糖の保護作用を検討した。糖にはトレハロース、スクロース、グルコース、フルクトースの 4 種を用いた。また、第 3 章で用いた 2 つのモデルの中間として中性的溶媒和モデルを加え、3 つのモデルを用いて解析を行った。実験データと 3 つ溶媒和モデルに基づいた理論的シミュレーションにより、糖分子がタンパク質表面から選択的または弱く排除され、天然のタンパク質水和殻が保存されることが明らかとなった。この傾向は、二糖類でより明白であった。さらに、糖濃度の増加に伴い、選択的排除モデルから中性溶媒和モデルへ徐々に移行することが判明した。塩酸グアニジンによる化学変性に対する糖の保護作用は、5%w/w の低濃度から発揮され、特に二次構造について顕著な保護傾向が示された。熱変性に対する抑制作用は、アミロイド形成を伴うものの、すべての階層構造レベルで約 4~5°C 上昇した。特に、アミロイド様凝集における多量体形成が抑制された。本章の結果は、糖が水和殻の保護作用を介してタンパク質の天然構造を化学変性および熱変性から保護することを明確に示唆するものである。

第 5 章では、ミオグロビンの酸変性によって生じるアミロイド線維形成に対するトレハロースの効果を検討した。ミオグロビンは、変性条件下でヘリックスからシートへの転移を伴うアミロイド形成を生じることが知られている。本章の研究により、トレハロースが初期段階のアミロイド線維からミオグロビンの天然構造を回復させることが明らかとなった。具体的には、クロスβ構造および積層したベータシート構造からミオグロビンの天然構造が回復された。

最後に、第 6 章では本研究の総括を述べた。

学 位 論 文 の 要 旨

Elucidation of the molecular mechanism of sugar-mediated stabilization of
protein structure and hydration

(糖によるタンパク質の構造及び水和の安定化作用の分子機構の解明)

氏 名 味戸 聡志 印

Protein denaturation and enzyme deactivation can be prevented by sugars and/or polyols. The preservative action of these additives has been widely utilized in various fields, including biochemistry and food preservation. Water is always involved in hydrogen bonding, hydrophobic interaction, and electrostatic interaction, which are the main stabilizing factors of proteins. Therefore, it is reasonably considered that these additives prevent denaturation through suppression of perturbation of the hydration structure of the protein. In spite of many experimental studies of the effects of sugars on protein structures, using various methods such as densitometry, calorimetry, circular dichroism, NMR, etc., there is little direct evidence concerning the interaction between protein and solvent. Therefore, we cannot say that the function of sugars has been fully elucidated yet. The mechanism by which proteins fold into their native structures is also still one of the important problems in biology. Stability of proteins in aqueous solutions is affected by the addition of salts and neutral substances and also by the changes in temperature and pressure. However, because it was practically difficult to experimentally observe the structure of a particular protein in concentrated solutions in which large amounts of co-solutes exist, most of the experimental studies of protein unfolding folding were conducted under dilute-solution conditions.

In the present study, by using synchrotron radiation wide-angle X-ray scattering (WAXS) and small-angle neutron scattering (SANS) methods, I have succeeded in obtain a direct evidence of the effect of sugars on a protein structure and hydration. In addition, I elucidated the effect of sugars on the structural transition of a typical globular protein "myoglobin" under chemical, thermal and acid denaturation conditions. Different types of sugars such as disaccharides (trehalose, sucrose) and monosaccharides (glucose, fructose) were used.

Overviews about the protective effect of sugars on living organisms and proteins were described in Chapter 1 as introduction. The properties of myoglobin, amyloid fibril, and trehalose used in the study were also described. The experimental methods were described in Chapter 2. The overview of the facilities used in the study and the basic theory of scattering were explained. In addition, the background processing method of WAXS data, the evaluation methods of Guinier analysis, distance distribution function and the transition-multiplicity analysis (TMA) method developed by our laboratory

were also described.

Discussions were described in Chapter 3, 4 and 5. The effects of trehalose and glucose on protein hydration-shell clarified by the complementary use of WAXS and SANS were described in Chapter 3. The experimental results were discussed in detail using the theoretical scattering function simulations. In the theoretical calculations, I assumed the following models that can happen on the protein structure and its hydration-shell caused of the presence of sugar. In the preferential solvation model, sugar molecules were replaced with hydration-shell water molecules of protein by the preferential solvation effect. Such replacement would result in the increase of the scattering density of the hydration-shell of protein. In the preferential exclusion model, sugar molecules were preferentially excluded from the hydration-shell of protein due to the hydration repulsion force. This is called the preferential hydration of proteins and would appear as the preservation of those hydration-shell densities. The WAXS results clearly indicated that the exclusion of sugar molecules from the protein surface was dominant at the sugar concentration lower than 25% w/w. The action of the preferential exclusion of trehalose and of the preservation of the protein hydration-shell was more dominated than in the case of glucose. The SANS results by using deuterated glucose clearly indicated that the hydration-shell density is almost constant in spite of the increase of the glucose concentration. The results strongly supported the WAXS results that sugar molecules are preferentially excluded from the hydration-shell region of the protein.

In Chapter 4, I expanded the study of Chapter 3. In addition to the effect on the hydration-shell of protein, the protective actions of sugars against the chemical denaturation and thermal denaturation were investigated by using trehalose, sucrose, glucose and fructose. The neutral solvation model was added as an intermediate between the two models in Chapter 3. Experimental data and theoretical simulation based on three different solvation models indicated that sugar molecules were preferentially or weakly excluded from the protein surface and preserved the native protein hydration shell. This tendency was more evident for disaccharides. The preferential exclusion shifted gradually to the neutral solvation at higher sugar concentrations. The protective actions of sugars against the chemical denaturation by guanidine hydrochloride appeared at > 5% w/w sugar concentration. Then, sugars especially protected the secondary structure of protein. Moreover, the addition of sugar increased the temperature of the thermal structural transition of myoglobin by about 4-5 °C for all hierarchical structural levels, although the amyloid formation was still caused by the thermal transition. This thermal stabilization also suppressed the oligomerization of amyloids. The present results clearly suggested that sugars intrinsically protect the native structure of proteins against chemical and thermal denaturation through the preservative action of the hydration shell.

In chapter 5, the effect of trehalose on the amyloid fibril formation by the acid denaturation of myoglobin was studied. Myoglobin was known to be involved in amyloid formation accompanying the helix-to-sheet transition under denaturation conditions. In this study, I obtained evidences that trehalose was able to revert the early stage of amyloid transition of myoglobin. Specifically, the cross-beta structure and the stacked beta-sheet mostly returned to the native structures by the presence of trehalose.

In chapter 6, summary of the present study was described.