

学 位 論 文 の 要 旨

論 文 名

スルホベタインが蛋白質のダイナミクスに及ぼす効果の解析

氏名 王 海梅 印

私は本論文でスルホベタインがタンパク質のダイナミクスに及ぼす効果について報告する。タンパク質の安定化は基礎科学的にも医学的応用においても重要である。例えば、タンパク質やその複合体の作用や相互作用メカニズムを理解するために必要な立体構造は、タンパク質が変性したり凝集したりすると決定できなくなる。ホルモンや抗体などのタンパク質製剤は、タンパク質が凝集すると効果がなくなったり、好ましくない副作用を引き起こすこともある。また、タンパク質の凝集はタンパク質製剤の製造コストを上昇させる。

2つの異なる種類の化合物がタンパク質を安定化することが以前より知られている。1つの種類は硫酸アンモニウムなどの無機塩であり、もう1つの種類はオスモライトと呼ばれる。オスモライトは細胞を浸透圧ストレスから守り、ポリオール、アミノ酸、メチルアミンなどを含む。オスモライトは変性状態の自由エネルギーを上昇させることによってタンパク質を安定化することが知られている。一方、スルホベタインは新しい種類のタンパク質安定化剤で、オスモライトとは異なる効果をタンパク質に及ぼし、その安定化メカニズムは良くわかっていない。スルホベタインはタンパク質の変性や凝集を防止する事、タンパク質のリフォールディングや結晶化を促進する事が分かっている。また、凝集を防止する事によってタンパク質の NMR 測定を促進する事も示されている。

私の研究の目的はスルホベタインがタンパク質のダイナミクスに及ぼす効果を解析する事で、スルホベタインがタンパク質を安定化するメカニズムを解明することを最終目標としている。

私は本研究で、choline-O-sulfate (COS), dimethylethylammonium propane sulfonate (NDSB-195), dimethylbenzylammonium propane sulfonate (NDSB-256) の3つのスルホベタインがタンパク質分子のコンフォーマー変換に及ぼす効果を解析し、以下の結果を得た：

1. COS は KIX-87 タンパク質の天然 ⇄ 変性中間体の間の unfolding 速度と refolding 速度の両方を上昇させた.
2. NDSB-195 は酵母ユビキチンの $\beta 4$ - $\alpha 2$ ループの type II β ターン ⇄ type I β ターン間のコンフォメーション変換速度を上昇させた. 一方, 最も効果が高い TMAO は速度に影響を及ぼさなかった.
3. NDSB-256 は Gly-Pro ジペプチドのペプチド結合の cis-trans 異性化速度を上昇させたが, NDSB-195 と COS は低下させた. また, TMAO とリフォールディングで最も頻用されるアルギニンは有意な効果を示さなかった.

スルホベタインがタンパク質のダイナミクスに及ぼす効果が解析されたのは本研究が初めてである. また, オスモライトのように蛋白質を安定化する化合物は蛋白質のダイナミクスを抑制し, 活性を低下させると従来は考えられてきた. スルホベタインはオスモライトとは異なり, 蛋白質の安定性と活性の両方を向上させる可能性がある. この性質は蛋白質の工業的・医学的利用に大いに役立つと期待される.

Abstract of Doctor Thesis

Title: Analyses of the effects of sulfobetaines on the dynamics of proteins

Haimei Wang

In the present thesis I report the effects of sulfobetaines on the dynamics of proteins.

The stabilization of proteins is important both in basic sciences and in medical applications. For examples, three-dimensional structures of proteins and protein complexes, which are crucial to understand their mechanisms of action and interaction, cannot be determined when the protein molecules are denatured or aggregated. Proteinaceous drugs such as hormones and antibodies become ineffective or even exert unfavorable side effects when aggregated. The aggregation of these proteins raises their manufacturing cost.

Two different classes of compounds have been known to stabilize proteins. One class is inorganic salts such as ammonium sulfate and the other is osmolytes, which protect cell from osmotic stresses, and include polyols, amino acids, and methylamines. The latter class of compounds is known to stabilize proteins by increasing the free energy of their denatured states. Sulfobetaines are a new class of protein stabilizers, which exhibit different effects on proteins compared with osmolytes, and their stabilizing mechanism have not been elucidated yet. Sulfobetaines are known to prevent denaturation and aggregation of proteins, to enhance protein refolding, to facilitate protein crystallization. They are also demonstrated to enhance NMR measurements of proteins by preventing protein aggregation.

The goal of my study is to analyze the effects of sulfobetaines on the dynamics of proteins, with the aim to ultimately elucidate the mechanisms whereby sulfobetaines stabilize proteins.

I focused my study on the effects of sulfobetaines, choline-O-sulfate (COS),

dimethylethylammonium propane sulfonate (NDSB-195), and dimethylbenzylammonium propane sulfonate (NDSB-256) on the chemical exchange between conformers of protein molecules.

I found:

- 1) COS increased both the unfolding and refolding rate between the native and intermediate conformers of KIX-87 protein.
- 2) NDSB-195, but not trimethylamine-N-oxide (TMAO), the most effective osmolyte, increased the exchange rate between the type II β -turn and the type-I β -turn in the β_4 - α_2 loop of yeast ubiquitin.
- 3) NDSB-256 increased the cis-trans isomerization rate of Gly-Pro peptide bond, whereas NDSB-195 and COS decreased the rate. Arginine, the most commonly used refolding additive and TMAO exhibited no significant effects.

My research is the first one to analyze the effects of sulfobetaines on dynamics of proteins. Those compounds that enhance protein stability, such as osmolytes, have been considered to suppress the dynamics and eventually the activity of the protein. In contrast to osmolytes, sulfobetaines may enhance both the stability and activity of proteins; such properties of sulfobetaines will be quite useful in the application of proteins in the industrial and pharmaceutical fields.