

氏名・(本籍)	さ　　と　　り　　あ　　つ　　し 佐　藤　　篤
学位の種類	理　学　博　士
学位記番号	理博第　5　3　4　号
学位授与年月日	昭和52年　3月25日
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当
研究科専攻	東北大学大学院理学研究科 (博士課程)化学第二専攻
学位論文題目	The X-Ray Crystallographic Studies on Sea Snake Neurotoxins (ウミヘビ神経毒タンパクのX線結晶解析)
論文審査委員	(主査) 教　授　田　宮　信　雄　　教　授　向　井　利　夫 教　授　伊　東　　　椒

論　文　目　次

PART I Introduction

Chapter I Properties of snake neurotoxins

Chapter II Theory of X-ray crystallographic study on
proteins

PART II Crystal growth and derivatization of crystals

Chapter I Preparation of the crystals

Chapter II Preparation of derivatives

PART III Data collection and calculation of the structure

Chapter I Collection and reduction of data

Chapter II Location of heavy atoms and refinement of
the Parameters

Chapter III Calculation of the structure of erabutoxin b
by single isomorphous replacement method

PART IV The structure of erabutoxin b

Chapter I Structure of erabutoxin b solved by single
isomorphous replacement method

Chapter II Discussion of possible structure function
relationship

論文内容要旨

第一部 緒 論

ウミヘビ科あるいはコブラ科の蛇の毒腺から単離精製される神経毒は分子量 7千から 8千の極めて作用の強い蛋白である。これらの神経毒蛋白は運動神経—筋肉接合部の後シナプス膜上にあるアセチルコリン受容体蛋白に結合し、アセチルコリンによる刺激伝達を阻害して吸収機能を麻痺させることにより、致死活性を発現する。その結合は nicotinic acetylcholine 受容体に特異的で非常に強い。これらの蛇毒神経毒の構造の解明と作用機作の研究は蛋白質同志の結合の機構、更にはアセチルコリン受容体蛋白の構造についての知見を与えると期待される。現在上記の蛇の毒腺から単離精製された毒活性を示す蛋白約 80 種について一次構造が明らかにされている。そのうち約 50 種は神経毒である。これらの 80 種の一次構造の比較、及び化学修飾の結果から、神経毒活性に直接関与すると考えられるアミノ酸残基及び立体構造を保つ為に重要と考えられる、アミノ酸残基の推定がなされている。又、蛇毒神経毒蛋白分子上にはアセチルコリン受容体と結合する部位が複数個存在する事も強く示唆されている。これらの事から、蛇毒神経毒蛋白の立体構造、特に活性に重要と考えられるアミノ酸残基の蛋白分子上での分布は極めて興味深い。

田宮らにより長年研究されてきた、エラブウミヘビより単離精製されるエラプトキシンは結晶性がすぐれており、エラプトキシン b, エラプトキシン c, 及びヒロオウミヘビより単離精製されるラティコトキシン a の X 線結晶解析を試みた。蛋白の X 線結晶解析には同型な重金属置換体を用いる同型置換法が広く用いられている。本論文では上記 3 種の蛇毒神経毒の結晶化、エラプトキシン b の結晶の重金属置換体化、及び重金属置換体一個のみを用いた同型置換法で明らかにした立体構造について述べる。

第二部 結晶の調製及び誘導体化

構造解析に必要な重金属誘導体の調製を中性と弱アルカリ性で試みるため、結晶化は中性及び弱アルカリ性で行なった。結晶化の為の塩析剤として中性条件の場合は硫酸アンモニウム、弱アルカリ性の条件の場合は硫酸ナトリウムを用いた。結晶化はまず室温あるいは 4℃ で微小な核を生成せしめ、次に室温あるいは 37°-40℃ で成長させた。エラプトキシン b は条件により二種の結晶型の異なる結晶となる。又、エラプトキシン c も同様に二種の結晶となるが、そのうち一方の結晶型はエラプトキシン b の結晶型の一方と同一である。ラティコトキシン a の結晶は試みたいずれの条件でも十分な大きさには成長しなかった。これらの結晶の空間群、格子定数は既に報告されている。これらの結晶のうち、エラプトキシン b type I とよぶ結晶が最も結晶性及び安定性にすぐれており、以下の実験に用いた。

誘導体の調製は結晶化に用いた溶液から蛋白を除いた組成の溶液に重金属試薬を加え、その溶液に結晶をひたすことにより行なった。得られた結晶のプレセッション写真をとり、誘導体化の為の処理に伴うX線回折強度の変化と格子定数の測定を行なって同型の置換体としての質を判定した。その結果、白金錯体 (K_2PtBr_4)、水銀化合物 ($HgCl_2$, PCMB, HMTS, *mersalyl*) 等を用いて回折強度に充分な変化がみられ、しかも格子定数の変化も小さな誘導体の調製の条件を見出した。更に結晶をグルタルアルデヒドで架橋して物理的強度を増大させた結晶を用いて誘導体化を行なったが、回折強度の変化は誘導体として充分なものではなかった。

第三部 データの収集及びエラプトキシン b の構造の計算

結晶及び誘導体結晶として pH 9.5 で調製したものと及び同じ pH で調製し塩化第二水銀で誘導体化したものをを用いてデータの収集を行なった。データの収集は 4 軸自動回折計で ω -スキャンで 2.5° まで行なった。吸収の補正は North の方法によって行ない、結晶の劣化による反射強度の補正及びローレンツ因子、偏光因子の補正は常法で行なった。結晶と誘導体結晶のデータの相対的なつり合わせは Kraut の方法で行なった。絶対強度への変換は既に絶体強度にしてある他のデータとのつり合わせで行なった。得られたスケール因子は Wilson plot によって求めた値と比較的よい一致を示した。水銀の位置の決定は二次元及び三次元差パタソンを計算し、おおまかな位置の推定を行なった後、二次元の差フーリエの計算により同定した。その結果 4 個所の比較的高い占有率の水銀の位置が明らかとなった。この結果は差一差フーリエ及びクロスフーリエの計算で確認した。これらの 4 個の水銀原子のパラメータの精密化は二種の異なる方法で行なった。即ち “lack of closure” を最小とする様にパラメータを調整する方法、及び通常最小二乗法である。前記の方法で精密化を行なった場合、“centric” な反射のみを用いた。後記の方法を用いた場合には異常分散の利用により 2 つの可能な重金属構造因子のうちより計算値に近い値を精密化の毎サイクルで選ぶようにして行なった。これらの独立した 2 種の方法で得た結果は互いに非常に良い一致を示した。エラプトキシン b の構造因子の計算は Blow 及び Crick により提出された最良電子密度図を得る方法で行なった。用いた重金属誘導体が 1 個の場合、構造の計算の方法は “Single isomorphous replacement 法” と呼ばれ、その結果は重金属誘導体数個を用いる “Multiple isomorphous replacement 法” より一般に精度が低下する。しかし得られた電子密度図は Lowらと共に報告した “Multiple isomorphous replacement 法” による結果と良い一致を示した。両者の差異全般については “Single isomorphous replacement 法” による電子密度図中では電子密度が一般に低くしかも広がる傾向のある事、及び電子密度の分布に若干の差異のある事があげられる。部分対称心による偽のピークの存在は明らかではないが、存在するにしてもその寄与は非常に小さい。個々の原子の同定は分解能及び精度

の制限の為、現在の電子密度図では難かしい。いくつかのアミノ酸残基の側鎖についてはそのおおまかな位置の推定が可能である。 α 炭素の位置は一次構造及び既に報告された結果を参考にして決めた。この様にして同定した主鎖や側鎖は電子密度図中の電子雲のほとんどを説明した。

第四部 結果及び考察

エラプトキシンbの構造上の著しい特徴は分子の形が非常に扁平であり、且つジスルフィド結合の局在化している部分を核として3個の大きなループが周囲に突き出している点である。それらのループ間あるいはループ内の一部の間では逆平行 β 構造があり、分子の構造の安定化に寄与していると思われる。 α -ヘリックスは存在しない。一次構造の比較により、“structurally invariant”な残基と“functionally invariant”な残基の存在が示唆されている。これらの残基のうち“structurally invariant”な残基はほとんどジスルフィド結合の局在化している部分に集中している。これらの残基のうち1/2シスチンはジスルフィド結合によって構造を安定化しており25番のチロシンは38番のグルタミン酸のカルボキシル基と水素結合を形成している可能性が高い。他の残基の役割については未だ明確でない。“functionally invariant”な残基のほとんどはループの先端の周辺に極存化している。更にこれらの残基の側鎖は46番のバリン以外は扁平な分子上の一方の面に集中している。

以上の結果から、あるいは化学修飾等により得られた知見を考慮する事により、蛇毒、神経毒の活性発現の機構についての可能性が示唆される。即ち、分子の形が非常に扁平で且つ活性に直接関与すると考えられる残基が分子の一方の面に集中しており、更にこれらの個々の残基の化学修飾によっても神経毒活性が完全に消滅する事がないという事実から、この神経毒蛋白は活性に直接関与する残基の集中している面全域でアセチルコリンリセプターと結合する可能性が強い。このような結合によってより多くの水和水分子が遊離する為熱力学的にも有利と考えられる。アセチルコリンリセプター分子上のリセプター部位は蛇毒神経毒によりアセチルコリンと競争的に占有される事が知られている。又、蛇毒神経毒はニコチン感受性のアセチルコリンリセプターとのみ結合するという極めて高い特異性を示す事からこれらのアミノ酸残基の側鎖の配置はアセチルコリンリセプターの構造に新しい知見を与える可能性がある。その様な観点からいくつかのリジン残基やアルギニン残基の陽電荷の位置や、29番のトリプトファンと36番のイソロイシンの側鎖で形成される疎水性部位と31番のアスパラギン酸のカルボキシル基の相対的位置関係は興味深い。

論文審査の結果の要旨

佐藤篤提出の論文はウミヘビ毒液中に存在する神経毒タンパクの一種、エラプトキシンbにつき、はじめてその立体構造を明らかにしたものである。この神経毒タンパクは神経-筋肉接合部に存在するアセチルコリン受容体に特異的に結合し、刺激伝達を阻害するもので、その構造の解明は刺激伝達機構研究の面からも強く望まれていた。

本論文ではまず結晶化および結晶の重金属誘導体化の条件を検討し、中性および弱アルカリ性ですぐれた結晶及びその誘導体を得た。

ついでこれらの結晶につき水銀の位置を定め、その位置及び他のパラメーターを利用して結晶分子の電子密度を算出し、分子の立体構造を解明した。

分子は全体として偏平な形を示し、ジスルフィド結合がその中央部に集りコアを成している。従来多くの毒タンパクのアミノ酸配列の比較から、構造上の不可決と考えられたアミノ酸残基がこの部分に集まっている。

又従来アミノ酸配列の比較や、化学修飾の実験で作用不可欠と考えられて来たアミノ酸側鎖は偏平な分子の一方の面に集中して存在する。

以上佐藤篤提出の論文は強く望まれていた神経毒タンパクの立体構造を明らかにし、その作用解明に大きな一歩を進めたもので自立して研究活動を行うに必要な高度の研究能力と学識を有することを示している。よって佐藤篤提出の論文は理学博士の学位論文として合格と認める。