

生命化学I

第4回

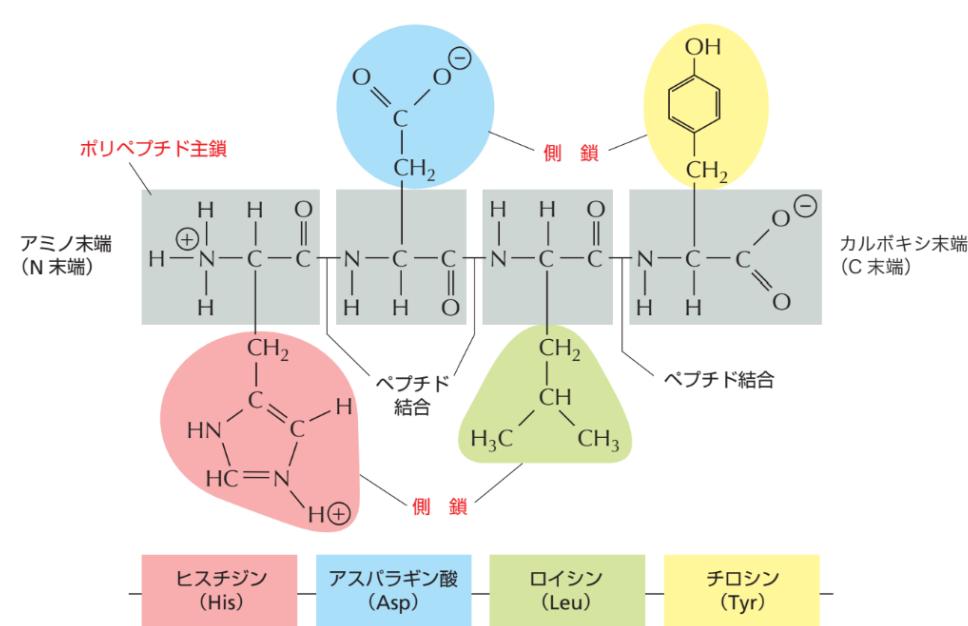
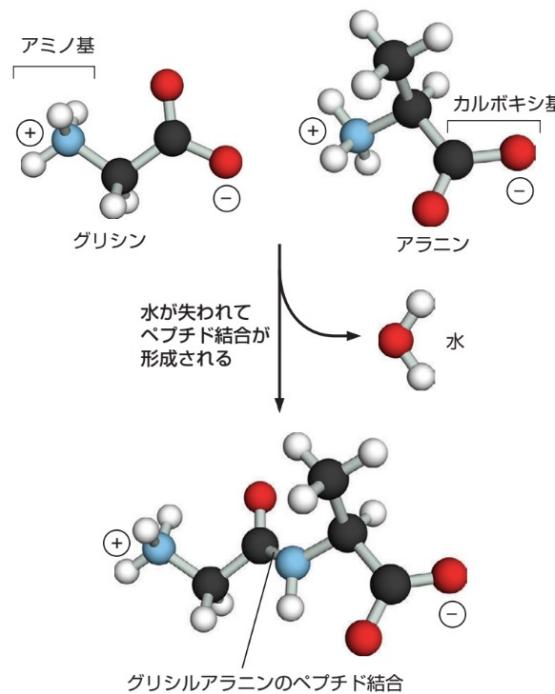
2024年10月17日木

生命化学I 講義内容

- 第1回 概論
- 第2回 生命の化学：生体分子の構造と相互作用
 - 2 細胞の化学成分
- 第3回 生体エネルギー：化学平衡と触媒反応
 - 3 エネルギー, 触媒作用, 生合成
- 第4回 生体分子の構造と機能（1）：タンパク質
 - 4 タンパク質の構造と機能
- 第5回 生体分子の構造と機能（2）：DNAと染色体
 - 5 DNAと染色体
- 第6回 グルコース代謝によるATP生産
 - 13 細胞が食物からエネルギーを得るしくみ

タンパク質の構成

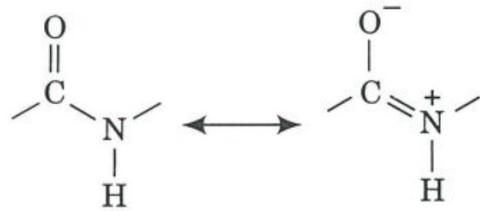
- アミノ酸がペプチド結合/アミド結合により特定の配列でつながったもの.
- アミノ基を持つ側をN末端、カルボキシ基を持つ側をC末端とよぶ.



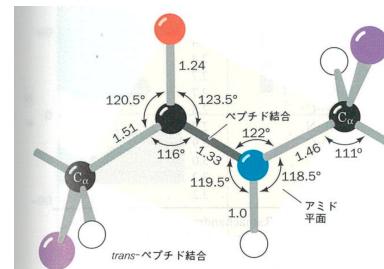
補足：タンパク質主鎖の構造

- ・ ポリペプチド鎖は ϕ , ψ , ω の 3 つの二面角（ねじれ角）をもつ。
- ・ ペプチド結合/アミド結合は **二重結合性** を帶びており、ほとんどが **トランス型** で存在する。
- ・ 主鎖のコンフォメーションは、 ϕ , ψ の角度でほとんど決定される。

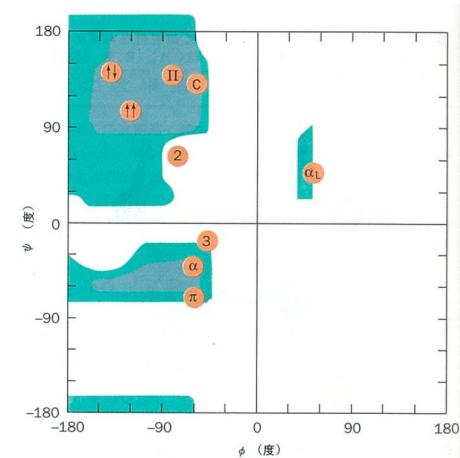
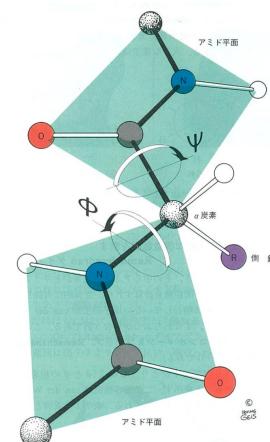
アミド結合の共鳴構造



二面角 ω

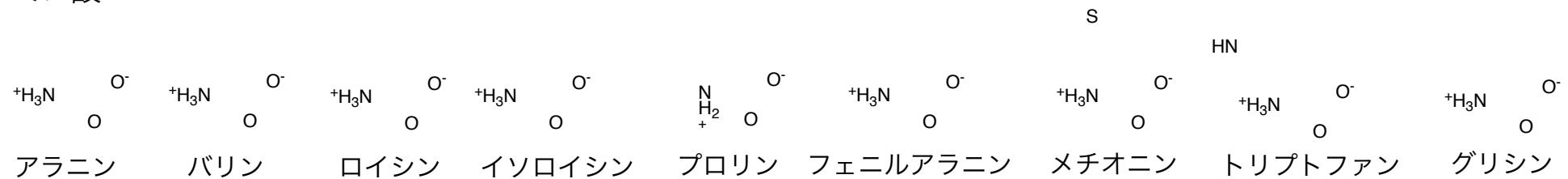


二面角 ϕ , ψ とラマチャンドランダイアグラム

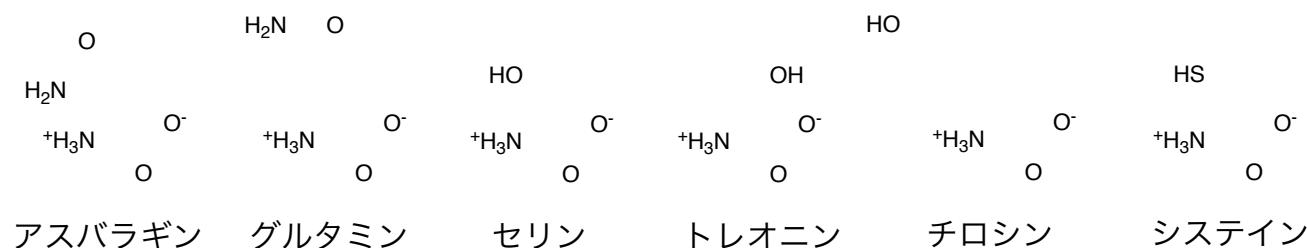


補足：タンパク質を構成するアミノ酸

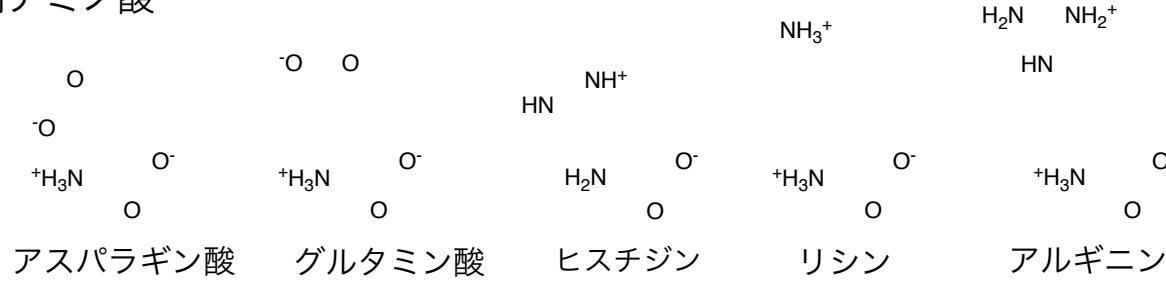
非極性アミノ酸



極性無電荷アミノ酸



極性電荷アミノ酸



タンパク質のフォールディング

- 分子内の**非共有結合**により特定の3次元構造におりたたまる。

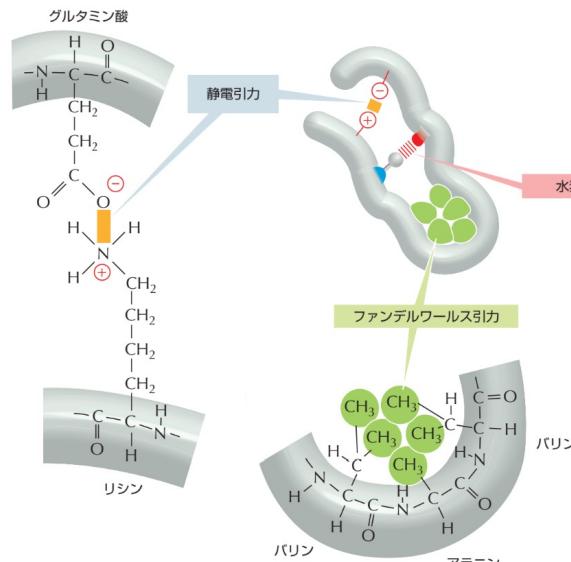


図 4-4 3種類の非共有結合がタンパク質を折りたたむのに使われる。このような結合は単独ではきわめて弱いが、中央に示す小さなポリペプチドのようにこれらが多数集まると特定の三次元構造を安定化するほど全体として強力な結合になる。Rはアミノ酸側鎖を示す共通記号。図4-5に示すように、タンパク質の折りたたみには疎水効果も働いている。

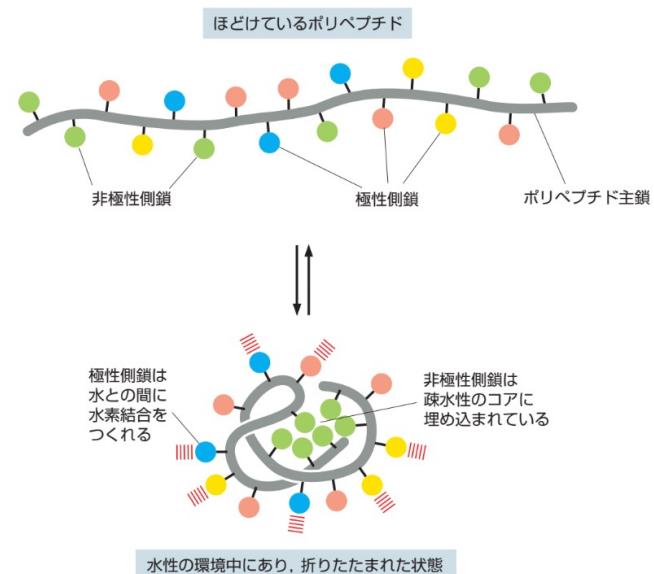


図 4-5 “疎水効果”がタンパク質を密な立体構造に折りたたむ。折りたたまれたタンパク質では、極性アミノ酸側鎖は表面に集まりやすく、そこで水と接触する。非極性のアミノ酸側鎖は水と直接接触しないように内部に埋め込まれて、疎水性の中心部(コア)をつくる。

タンパク質の一次構造

- アミノ酸がペプチド結合でつながった化学構造を一次構造とよぶ
- タンパク質の3次元構造は一次構造で決まっている。
- 全てのアミノ酸配列が特定の3次元構造におりたまるわけではない。
- シャペロンの働きによりフォールディングが促進される。

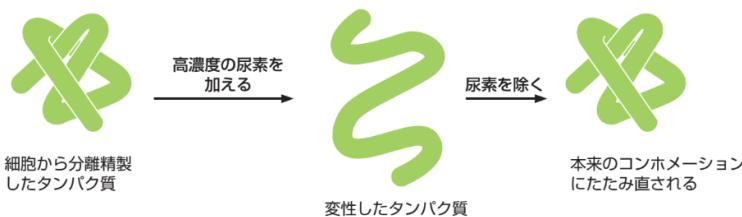


図 4-7 変性したタンパク質は多くの場合、元の形に戻る。この実験は、タンパク質のコンホメーション(立体構造)が、アミノ酸配列だけによって決まることを示している。たたみ直しは正しい条件が必要であり、小さなタンパク質のほうが容易である。

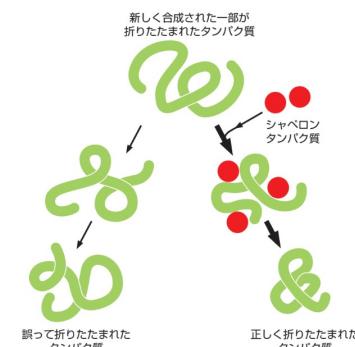


図 4-8 シャペロンタンパク質は新しく合成されたポリペプチド鎖の折りたたみを誘導する。シャペロンは新たに合成された。あるいは一部が折りたたまれたポリペプチド鎖に結合し、ポリペプチド鎖がエネルギー的に最も好ましい経路に沿って折りたたまれるようにする。シャペロンが働くには ATP の結合と加水分解が必要である。

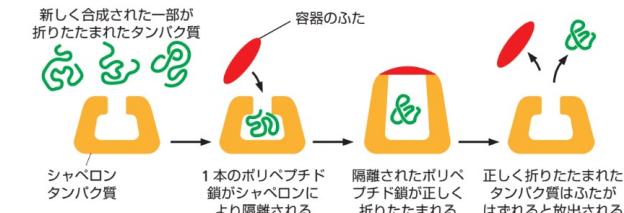


図 4-9 シャペロンタンパク質にはポリペプチド鎖の折りたたみを助ける“隔離容器”的に働くものもある。この場合、シャペロンの“樽”が隔離容器となって、新しく合成されたポリペプチド鎖が、細胞質のほかのポリペプチド鎖で混み合った条件下でたがいに凝集することなく折りたたまれるようにする。この系には ATP 加水分解によるエネルギーが必要で、それは、容器のふたとなるタンパク質の結合と続いて起こる分離におもに使われている。

タンパク質の二次構造： α -ヘリックス

- 3.6アミノ酸で一巻きの右巻きらせん.
- カルボニル酸素がC末側4残基先のアミド水素と水素結合を形成する.

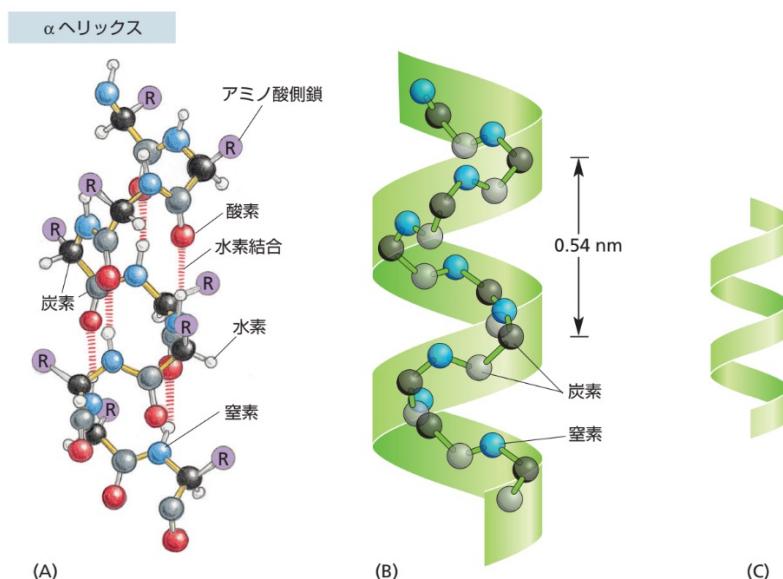


図 4-12 ポリペプチド鎖には、 α ヘリックスとして知られる規則的な繰り返し構造に折りたたまれるものがある。(A) α ヘリックスでは、各ペプチド結合のN-Hが、同じペプチド鎖にある4つ離れたペプチド結合のC=Oと水素結合する。ポリペプチド主鎖内のすべての原子を示し、アミノ酸側鎖は略号Rで表してある。(B)同じポリペプチドの炭素原子(黒色と灰色)と窒素原子(青色)のみを示してある。(C)タンパク質のリボン模型を表す省略記号で α ヘリックスを表してある(図 4-11B 参照)。

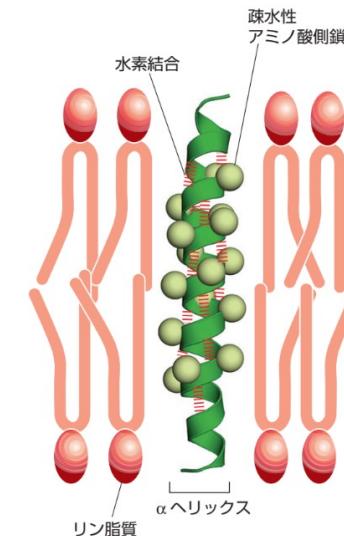


図 4-15 多くの膜結合タンパク質は α ヘリックスの形で脂質二重層を横断する。 α ヘリックスを形成する疎水性アミノ酸側鎖がリン脂質分子の疎水性の炭化水素の尾部と結合し、ポリペプチドの親水性の主鎖はヘリックス内部で相互に水素結合をつくる。このやり方で膜を横断するには20個のアミノ酸が必要である。この図ではヘリックス内部を貫通する空間があるように見えるが、ヘリックスはチャネルではないことに注意。つまり、イオンや小分子が通過することはない。

タンパク質の二次構造： β -シート

- 並列する2つのポリペプチド鎖の間で水素結合が形成された構造.

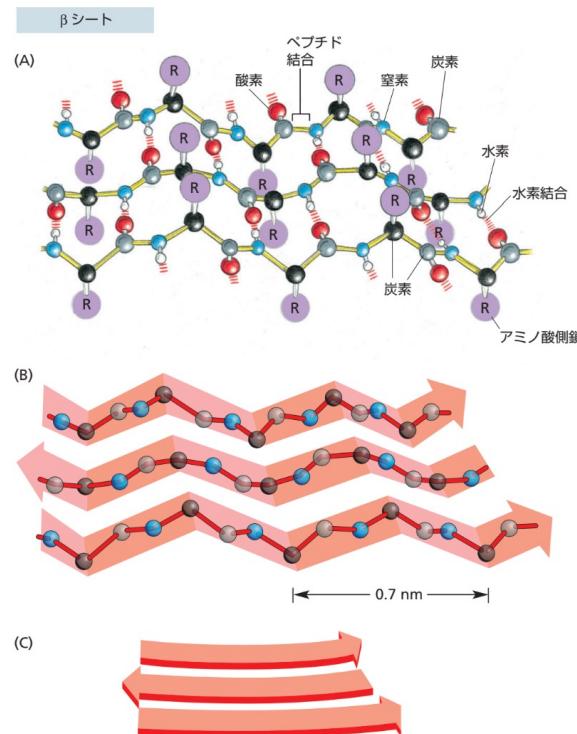
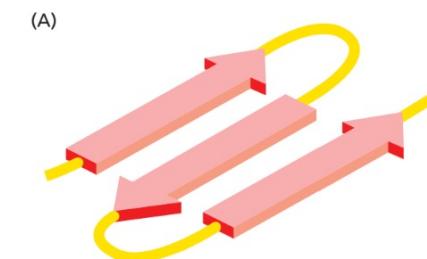


図 4-13 ポリペプチド鎖には、 β シートとよばれる規則的な繰り返し構造に折りたたまれるものがある。(A) β シートでは、シート内の個々のポリペプチド鎖のペプチド結合が隣の鎖のペプチド結合との間に水素結合をつくりシートの形が保たれる。このとき各鎖内のアミノ酸側鎖はシート面の上下に交互に突き出している。例では隣り合うポリペプチド鎖が逆方向を向いている(逆平行)。ポリペプチド主鎖内のすべての原子を示し、アミノ酸側鎖は略号 R で表してある。(B)同じポリペプチドの炭素原子(黒色と灰色)と窒素原子(青色)のみを示してある。(C)タンパク質のリボン模型を表す省略記号で β シートを表してある(図 4-11B 参照)。

逆並行 β シート



並行 β シート

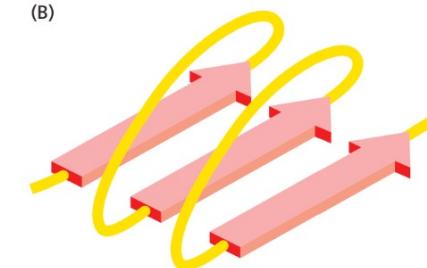
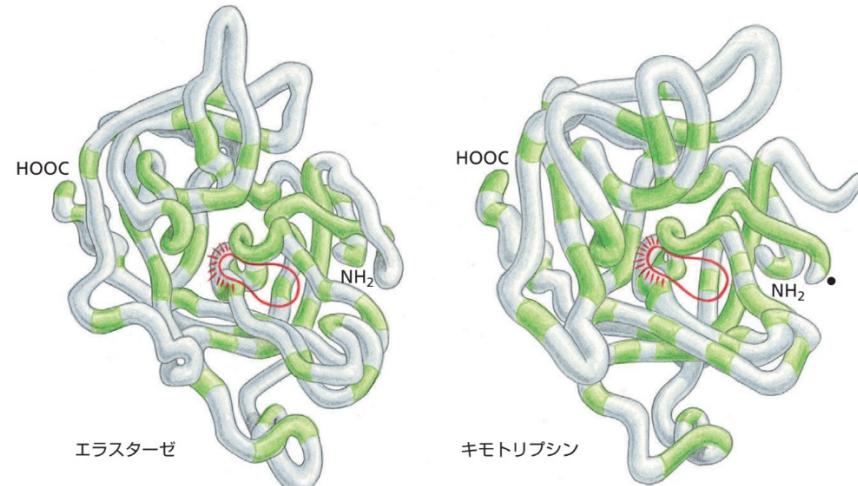


図 4-17 β シートには 2 種類の形がある。(A) 逆平行 β シート(図 4-13A も参照)。(B) 平行 β シート。いずれの構造もタンパク質で一般的に存在する。矢印はポリペプチド鎖の C 末端側を向くことにしてある(動画 4.4)。

タンパク質の三次構造

- 複数の二次構造や天然変性領域が集まって三次構造が形成される。
- 進化によって類似した三次構造をもちながら多様な機能を発揮するタンパク質が生まれた。

図 4-22 セリンプロテアーゼはタンパク質分解酵素ファミリーを構成する。2種類のセリンプロテアーゼ、エラスターーゼとキモトリプシンの主鎖模型を示した。ポリペプチド鎖の緑色で示したアミノ酸配列のみが2つのタンパク質間で共通だが、両者のコンホメーションはどの部分を見ても非常に似通っている。とはいっても、2種類のプロテアーゼは異なる基質特異性をもつ。それぞれの酵素の活性部位（基質が結合し切断される部位）を赤色で囲った。セリンプロテアーゼの名称は、セリンの側鎖が酵素の切断反応に直接あずかることに由来する。キモトリプシン分子の“右側”的黒色の点は、この酵素が自身の主鎖を切断したために形成された2個の末端を示す。



タンパク質の四次構造

- 複数のポリペプチド鎖からなるタンパク質集合体.

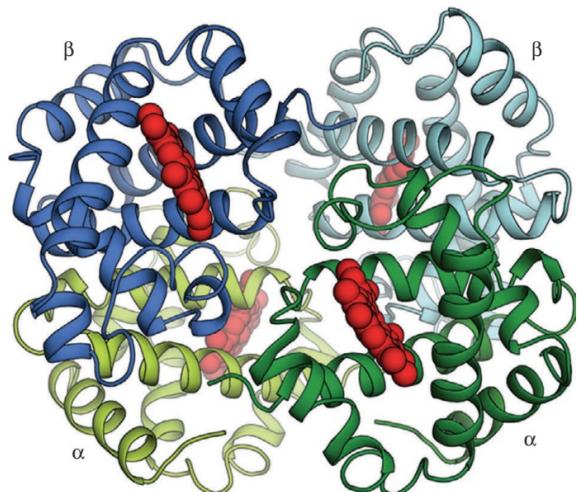


図 4-24 異なる 2 つのサブユニットが対称的に配置されているタンパク質. 赤血球に多量に含まれる酸素運搬タンパク質、ヘモグロビンは、 α グロビン（緑色）と β グロビン（青色）をそれぞれ 2 個ずつ含むタンパク質である。これら 4 本のポリペプチド鎖はいずれも 1 分子のヘム（赤色）を含み、酸素（O₂）はここに結合する。つまり、血液中のヘモグロビンタンパク質 1 個は 4 分子の酸素を運ぶ。

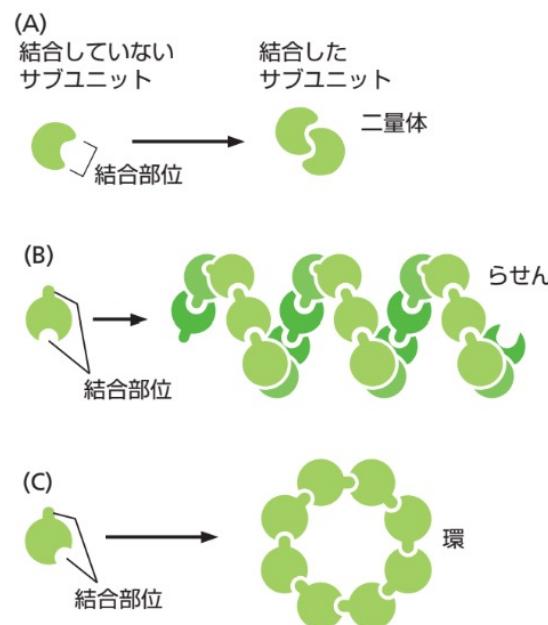


図 4-25 同一なタンパク質サブユニットが複雑な構造をつくり出す。(A) 結合部位が 1 つしかないタンパク質は、別の同一なタンパク質と二量体をつくる。(B)異なる結合部位を 2 か所もつ同一タンパク質どうしは、長いらせん状の線維をつくることが多い。(C)2 か所の結合部位が適当な位置関係にあれば、タンパク質サブユニットはらせんでなく閉じた輪をつくる(図 4-23B も参照)。

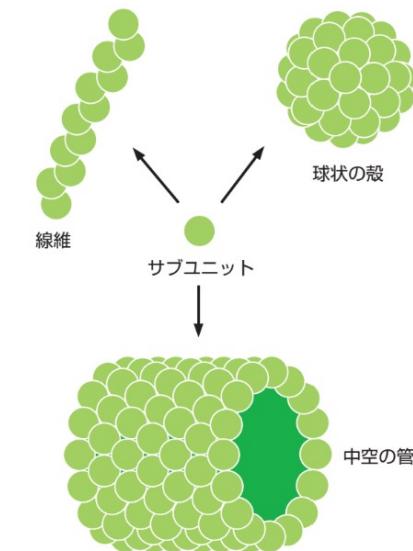
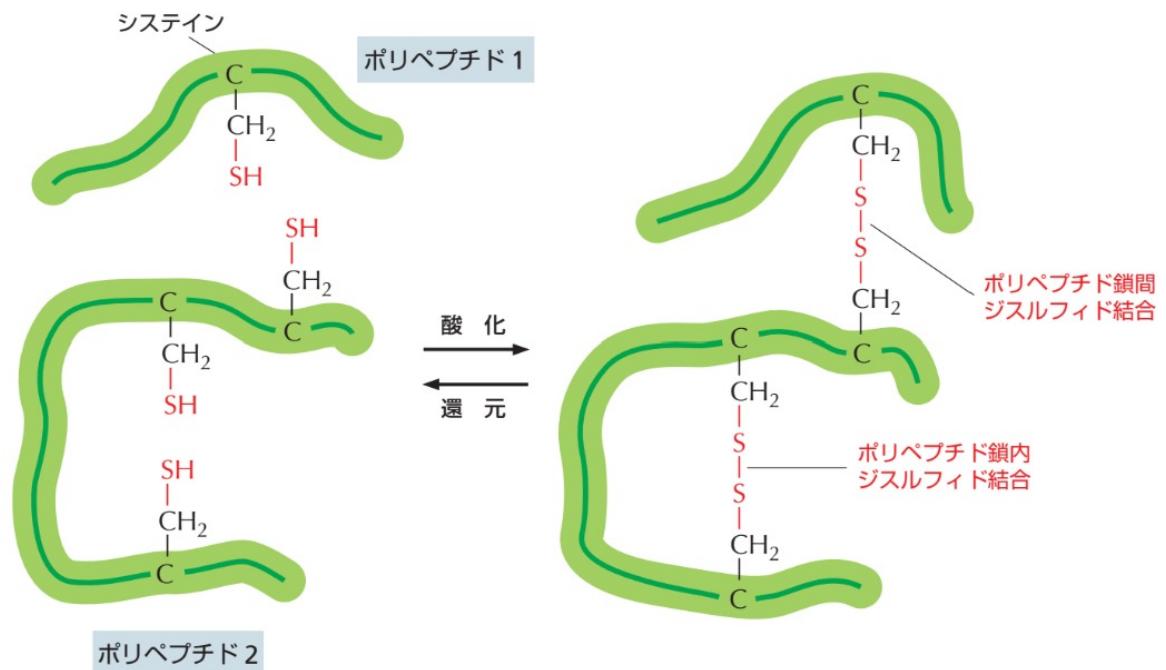


図 4-27 1 種類のタンパク質サブユニットが、線維、中空の管、球状の殻などの構造をつくる。たとえばアクチン・サブユニットは、アクチンフィラメント（図 4-26 参照）を形成し、チューブリン・サブユニットは中空の微小管を形成する。ウイルスタンパク質にはウイルスゲノムを取り囲む球状の外被（カプシド）を形成するものもある（図 4-28 参照）。

側鎖同士の共有結合：ジスルフィド結合

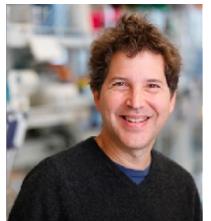
- ・ **システイン**側鎖同士の共有結合の形成により、タンパク質の構造が安定化する。
- ・ 酸化・還元により可逆的に結合・切斷する。

図 4-30 ジスルフィド結合はタンパク質のコンホメーションを安定化する。-SH 基の酸化反応により、近くにあるシステイン側鎖間に共有結合のジスルフィド結合が形成されるようすを模式的に描く。ここに示すように、架橋によって同じポリペプチド鎖の 2 か所、あるいは異なる 2 本のポリペプチド鎖を連結できる。1 つの共有結合を切断するのに必要なエネルギーは、一群の非共有結合を全部切断する際のエネルギーよりもかなり大きいので(p. 48 の表 2-1 参照)、ジスルフィド結合はタンパク質の折りたたみ構造の安定化に大きな役割を果たしている(動画 4.6)。

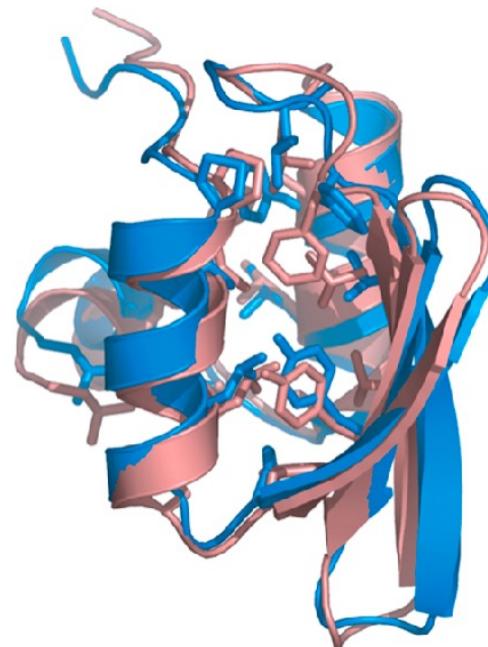
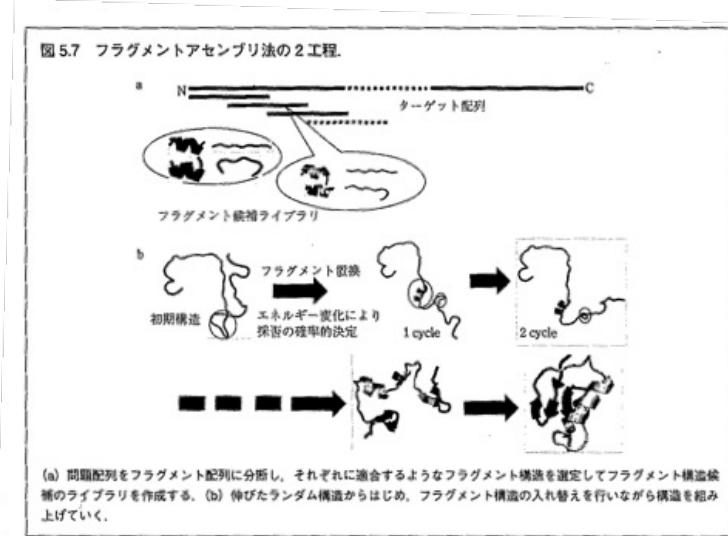


閑話休題：タンパク質の構造予測

- ・ フラグメントアセンブリ法による立体構造予測



David Baker



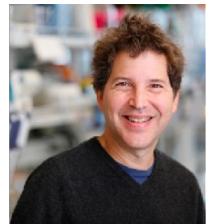
Predicted structure
Solved structure

CASP (Critical Assessment of Structure Prediction) で立体構造予測に成功

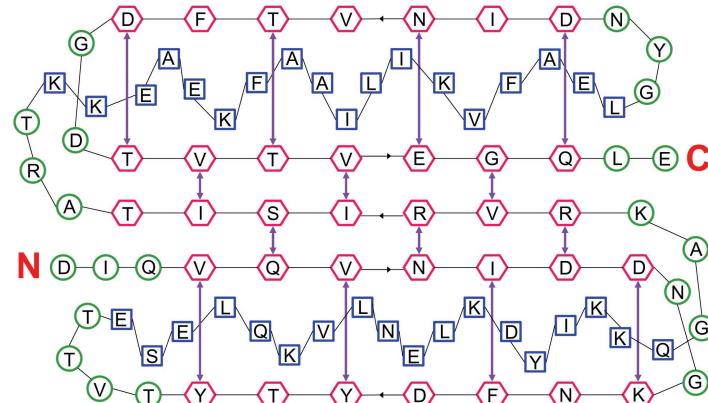
Rosetta プログラムが立体構造予測の精度を大幅に向上した

閑話休題：新規タンパク質の設計

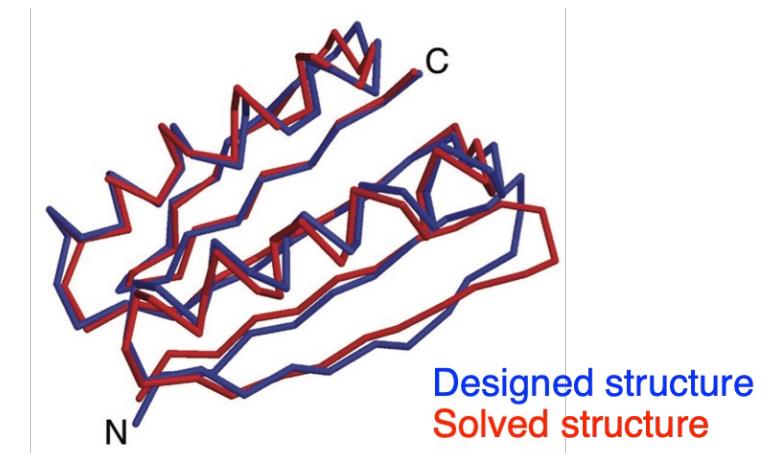
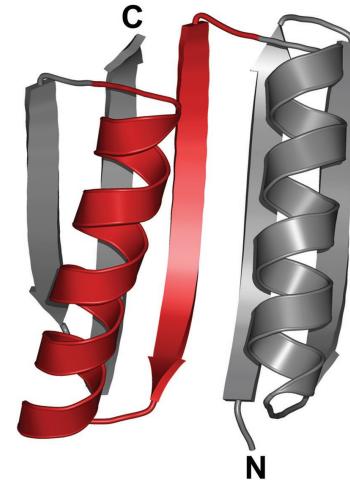
- De Novo タンパク質設計



David Baker



Top7



B. Kuhlman, et al. *Science* 2003, 302, 1364–1368.

Rosettaプログラムを用いることで
天然に存在しないtopologyのタンパク質を初めて生まれた

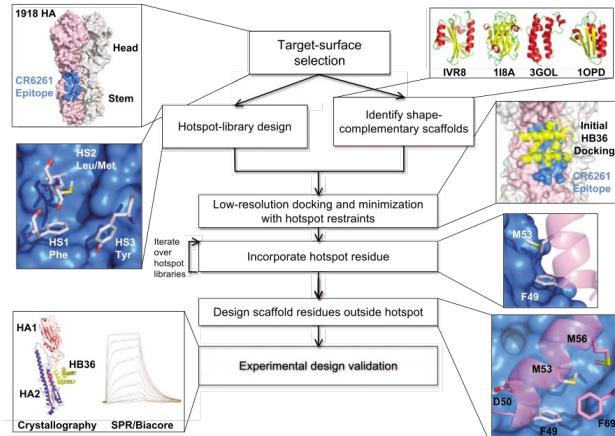
閑話休題：Rosettaの波及効果

Flu-HAを阻害するタンパク質を設計

Computational Design of Proteins Targeting the Conserved Stem Region of Influenza Hemagglutinin

Sarel J. Fleishman,^{1*} Timothy A. Whitehead,^{1*} Damian C. Ekiert,^{2*} Cyrille Dreyfus,²
Jacob E. Corn,^{1†} Eva-Maria Strauch,¹ Ian A. Wilson,² David Baker^{1,2,‡}

S. J. Fleishman, *et al. Science* **2011**, *332*, 816–821.



クラウドベースサイエンスによりタンパク質構造予測・設計を加速

Letter | Published: 05 August 2010

Predicting protein structures with a multiplayer online game

Seth Cooper, Firas Khatib, Adrien Tressaille, Janos Barbero, Jeehyung Lee, Michael Beenen, Andrew Leaver-Fay, David Baker, Zoran Popović & Foldit players

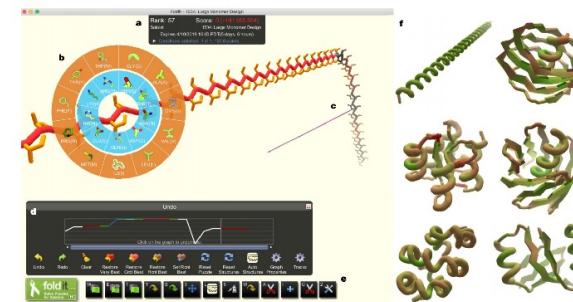
Nature **466**, 756–760(2010) | Cite this article

De novo protein design by citizen scientists

Brian Koepnick^{1,2}, Jeff Flattin³, Tamir Husain³, Alex Ford^{1,2}, Daniel-Adriano Silva^{1,2}, Matthew J. Bick^{1,2}, Aaron Bauer³, Gaohua Liu^{4,5}, Yojiro Ishida⁴, Alexander Boykov¹, Roger D. Estep¹, Susan Kleinfelter¹¹, Toke Nørgråd-Solano¹¹, Linda Wei¹¹, Foldit Players¹⁰, Gaetano T. Montelione^{4,6}, Frank DiMaio^{1,3}, Zoran Popović³, Firas Khatib³, Seth Cooper³ & David Baker^{1,2,9}

B. Koepnick, *et al. Nature* **2019**, *570*, 390–394.

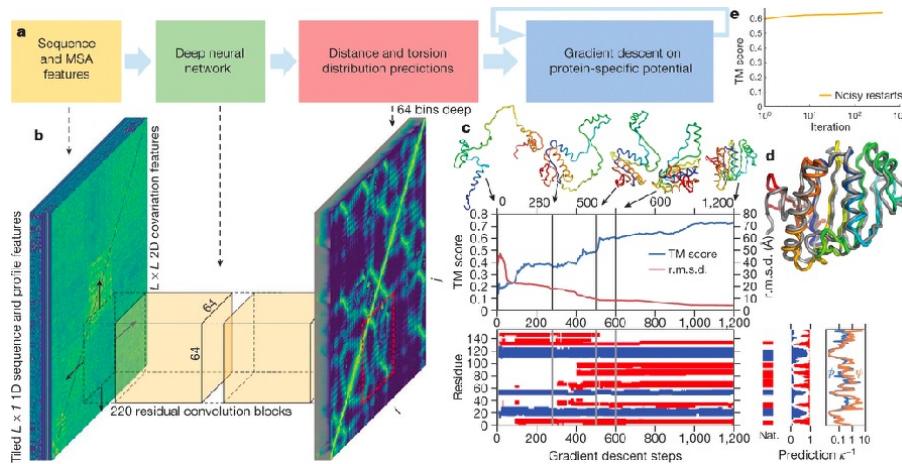
Folditというゲームを作り、ユーザーに構造予測・設計を競わせた。



Rosettaプログラムを使うことで医薬などに役立つタンパク質を創出

閑話休題：Google社が構造予測ソフトを開発

第一報



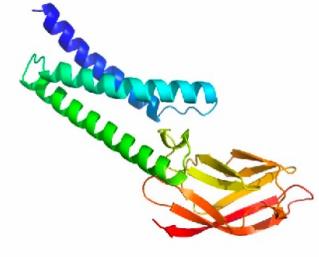
A. W. Senior, et al. *Nature* 2020, 577, 706–710.

アミノ酸配列からのタンパク質の3次元構造の
正確な予測を実現

より精度の高いタンパク質構造予測を実現

クラウドベースサイエンスによりタンパク質構造予測・設計を加速

Computational predictions of protein structures associated with COVID-19

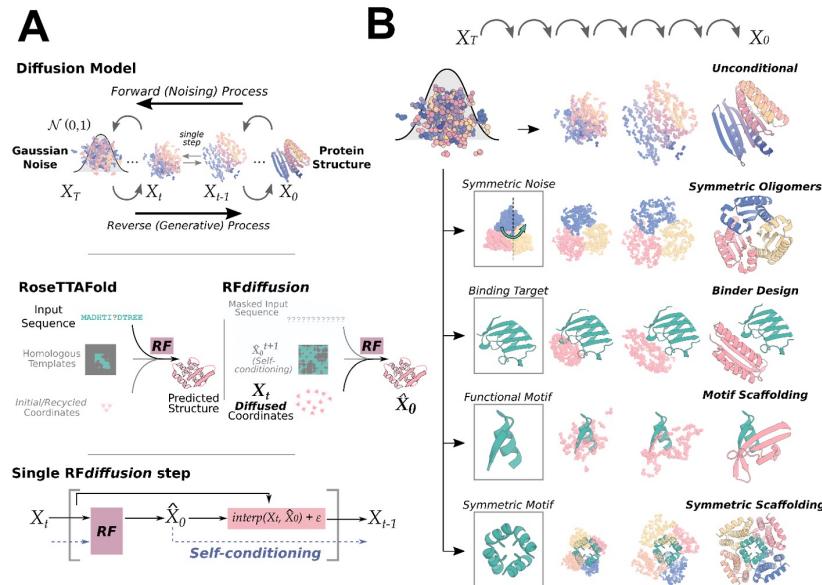


John Jumper, Kathryn Tunyasuvunakool, Pushmeet Kohli, Demis Hassabis, and the AlphaFold Team, "Computational predictions of protein structures associated with COVID-19", Version 2, DeepMind website, 8 April 2020, <https://deepmind.com/research/open-source/computational-predictions-of-protein-structures-associated-with-COVID-19>.

SARS-CoV-2のMタンパク質などの予想
構造データを公開

閑話休題：Diffusion Modelの活用によるタンパク質設計

RF diffusion

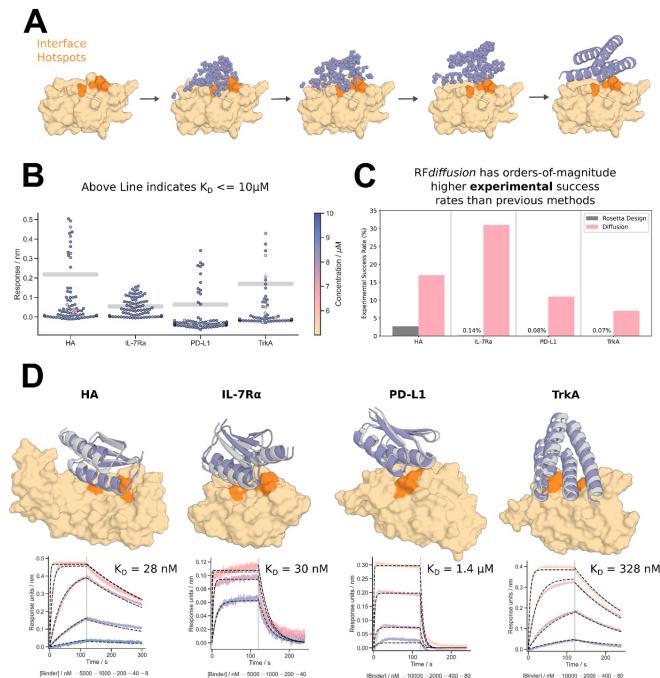


J. L. Watson, et al. bioRxiv, DOI: 10.1101/2022.12.09.519842

タンパク質複合体設計が加速

迅速なタンパク質複合体構造設計を実現

応用：タンパク質に結合する分子の設計



タンパク質の例 1：酵素

- 酵素の基質ポケットでは、複数のアミノ酸側鎖が協同的に反応を触媒する。

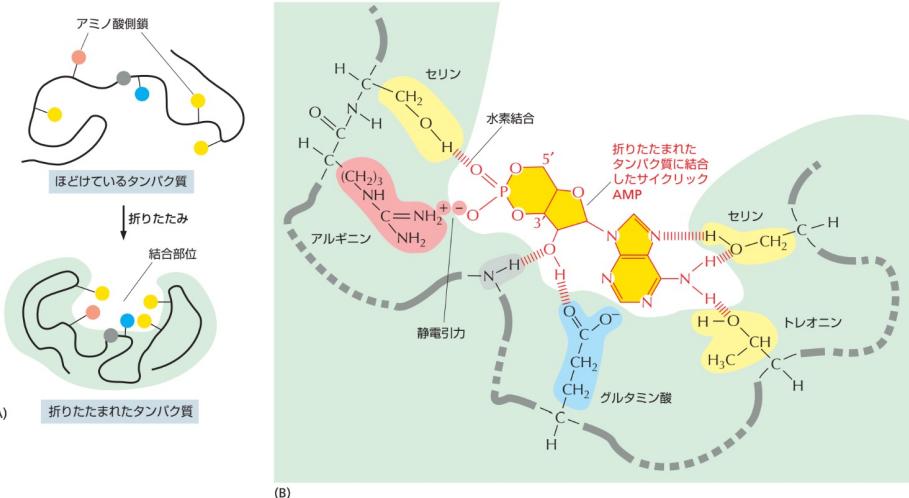


図 4-32 タンパク質は結合部位で特定のリガンドと結合する。(A) ポリペプチド鎖の折りたたみによって、折りたまれたタンパク質の表面に溝やくぼみができる。こうした溝にあるアミノ酸の側鎖は特定のリガンドとだけ一群の非共有結合をつくるように配置されている。(B) 実際の結合部位の拡大図。タンパク質とリガンドの間にできる水素結合や静電引力を示す(この例では、サイクリック AMP がリガンドとして結合しており、橙色で示してある)。

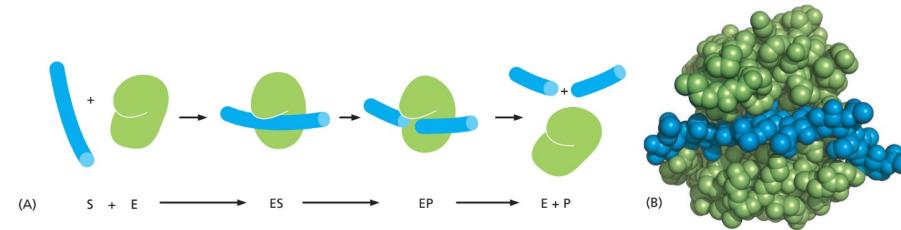


図 4-38 リゾチームは多糖鎖を切断する。(A) リゾチーム(E)が多糖基質分子(S)の切断を触媒するようすの模式図。酵素はまず多糖と結合して酵素-基質複合体(ES)を形成し、次に多糖の主鎖の中にある特定の共有結合の切断を触媒する。生成された酵素-生成物複合体(EP)は急速に解離する。生成物(P)が離れ、酵素は新たな基質分子と反応できる遊離状態に戻る。(B) 切断される前の短い多糖鎖を結合しているリゾチームの空間充填模型。

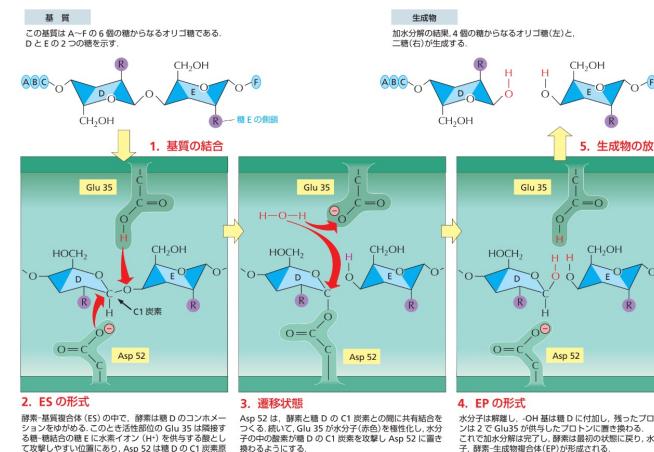


図 4-39 酵素は基質分子に結合し、化学的に変化させる。リゾチームの活性部位では、多糖分子の共有結合が切れ曲りで切られる。上段の図は、それぞれ遷移状態にある基質と生成物を表し、下段の 3 つの図は酵素-基質複合体中の糖 D のコンホーメーションの変化を順番に示している。遊離状態の基質と比較した酵素-基質複合体中の糖 D のコンホーメーションの変化に注目。このコンホーメーションから、反応に必要な活性化エネルギーを大きく下げる真ん中の図に示す遷移状態を形成やすい。この反応とリゾチームが生成物に結合したときの構造を動画 4.8 と動画 4.9 に示す。(D.J. Vocadlo et al., *Nature* 412:835-838, 2001に基づく)

タンパク質の例2：抗体

- 免疫に関わる抗体分子はY字形をしており、抗原結合部位をもつ。

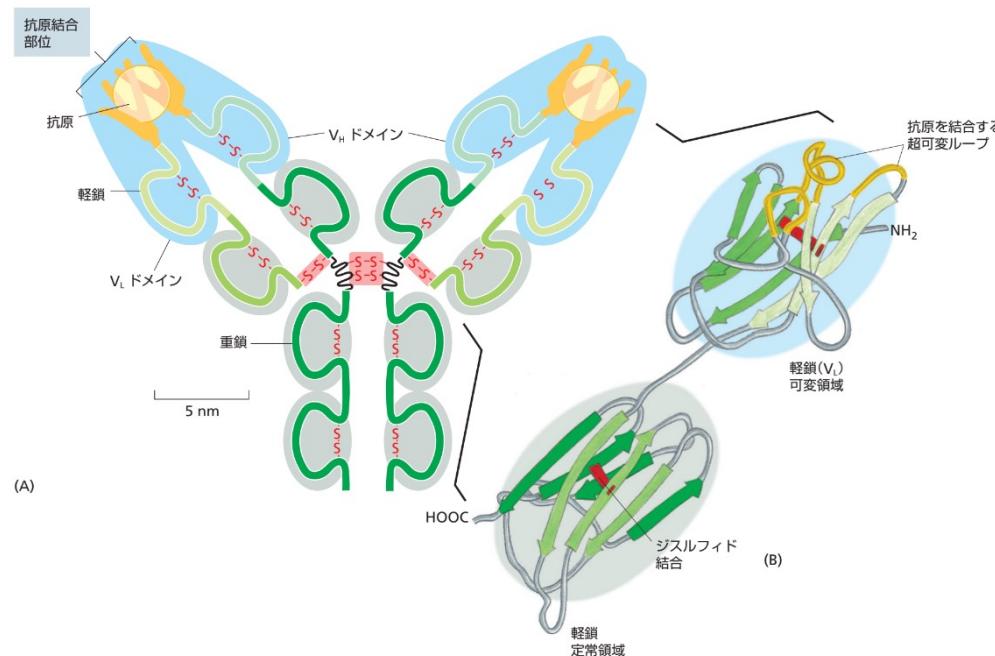


図4-33 抗体分子はY字形をしており、Y字のそれぞれの腕の先に同一の抗原結合部位をもっている。(A)典型的な抗体分子の模式図。このタンパク質は4本のポリペプチド鎖からなり(同一の重鎖2本と同一の軽鎖2本)、それらがジスルフィド結合(赤色)で連結され、構造が安定化されている。おのおのの鎖は数個のドメインに分かれしており、この図では可変領域を青色、定常領域を灰色で区別してある。重鎖の可変領域(V_H)と軽鎖の可変領域(V_L)が近接して抗原結合部位をつくり上げている。この領域のアミノ酸配列は抗体ごとに大きく異なるため、“可変”といわれる。(B)軽鎖のリボン模型。(A)に示した抗体分子の抗原結合部位の半分を形成する可変領域(V_L)、その一方の端からループ状に伸びるポリペプチド鎖の最も変化する部位(オレンジ)を示している。定常領域、可変領域はいずれも2枚の逆平行 β シートのサンドイッチからなり、ジスルフィド結合(赤色)により結合している。

タンパク質の翻訳後修飾

- タンパク質は、リン酸化、アセチル化、メチル化などの様々な修飾を受ける。

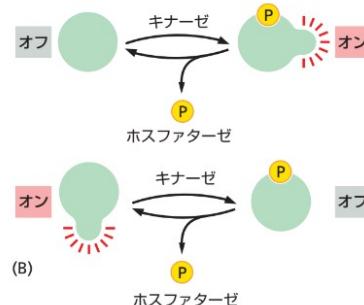
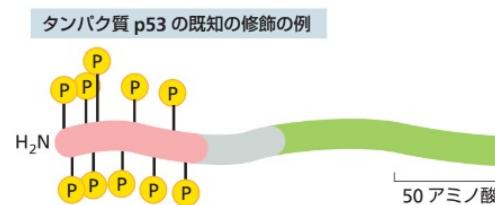
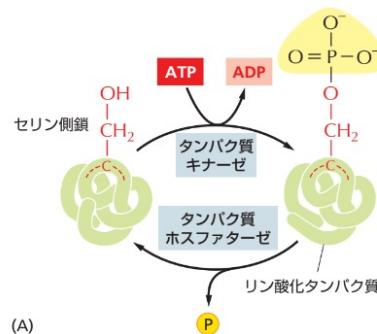


図 4-46 タンパク質のリン酸化はタンパク質の活性調節によく使われる機構である。標準的な真核細胞に含まれている数千種類のタンパク質は、共有結合による 1 個あるいは複数のリン酸基の付加という修飾を受けている。(A)ここに示す一般的な反応では、ATP のリン酸基がタンパク質キナーゼによって標的タンパク質のアミノ酸側鎖へ移される。リン酸基の除去は第 2 の酵素、タンパク質ホスファターゼにより触媒される。この例では、リン酸基はセリン側鎖に付加しているが、トレオニン側鎖やチロシン側鎖の-OH 基に付加することもある。(B)リン酸化は、タンパク質の活性を増大させることも低下させることもあり得る。これは、リン酸化の起こる部位と、タンパク質の構造によって決まる。

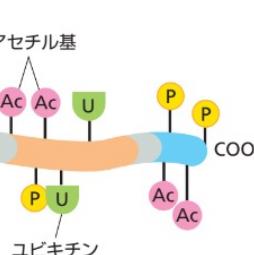
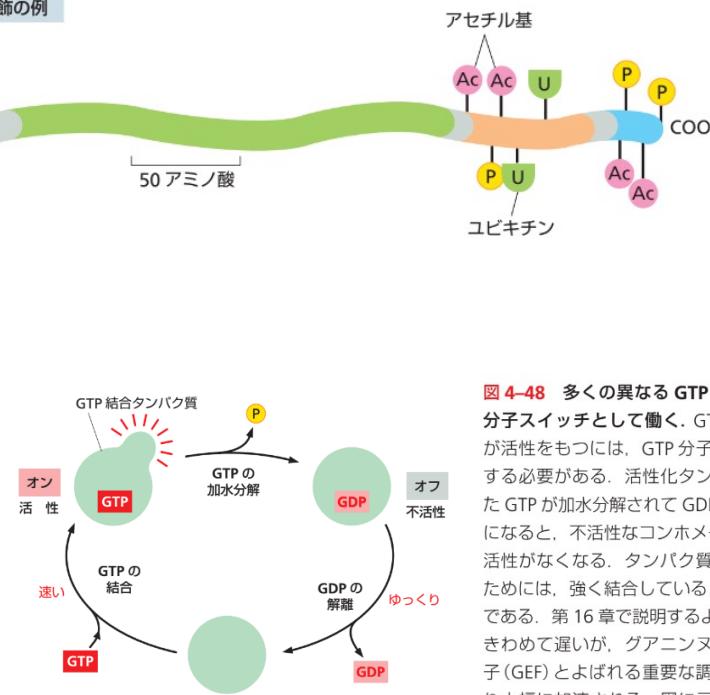


図 4-47 タンパク質を複数の部位で修飾することにより、タンパク質の振る舞いを制御できる。p53 タンパク質の活性と分解を制御する共有結合修飾の一部を示した。p53 は 400 近いアミノ酸からなる重要な遺伝子調節タンパク質で、細胞の損傷への応答を調節する(第 18 章)。これらの修飾のすべてが同時に起きるわけではない。タンパク質の本体に沿った色づけは、DNA に結合する(緑色)、遺伝子の転写を活性化する(ピンク色)などの異なるタンパク質ドメインを表す。ここに示した修飾はすべて、ポリペプチド鎖の比較的はっきりとした構造がない領域に位置する。

図 4-48 多くの異なる GTP 結合タンパク質が分子スイッチとして働く。GTP 結合タンパク質が活性をもつには、GTP 分子がしっかりと結合する必要がある。活性化タンパク質は、結合した GTP が加水分解されて GDP と無機リン酸 (P_i) になると、不活性なコンホメーションに変化し、活性がなくなる。タンパク質を再度活性化するためには、強く結合している GDP の解離が必要である。第 16 章で説明するように、この過程はきわめて遅いが、グアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) とよばれる重要な調節タンパク質により大幅に加速される。図に示したように、GDP が解離すると、すみやかに GTP 分子が再結合し、タンパク質は活性なコンホメーションに戻る。

タンパク質の研究方法

- 細胞からタンパク質を抽出・精製する.
- プロテアーゼ処理・質量分析によって、アミノ酸配列が決定できる.

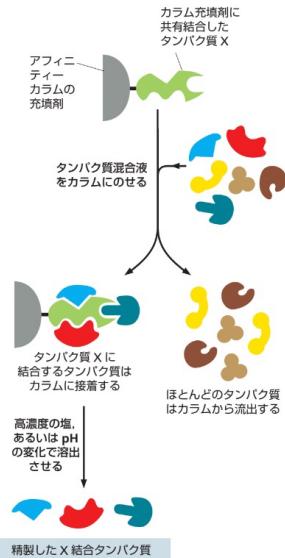


図 4-55 アフィニティクロマトグラフィーは目的タンパク質と結合する相手タンパク質の単離に利用できる。精製した目的タンパク質(タンパク質 X)は、クロマトグラフィーカラムの充填剤に共有結合により結合している。次にタンパク質混合物を含む抽出液をカラムにのせる。細胞内でタンパク質 X に結合するタンパク質は通常カラム内のタンパク質 X に結合する。カラムに結合しないタンパク質はそのまま流出し、タンパク質 X に強く結合するタンパク質は洗浄液の pH あるいはイオン成分を変えると溶出してくる。

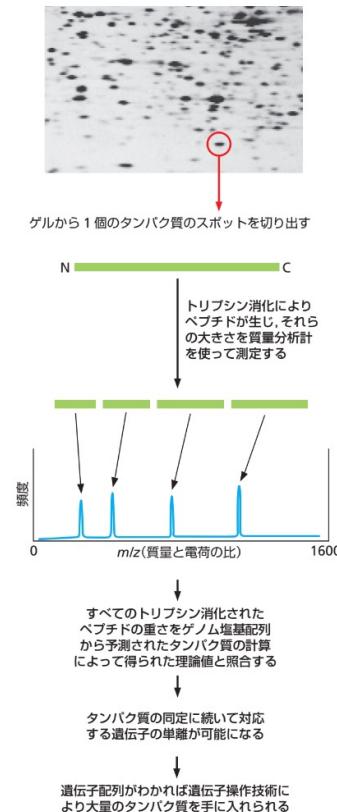
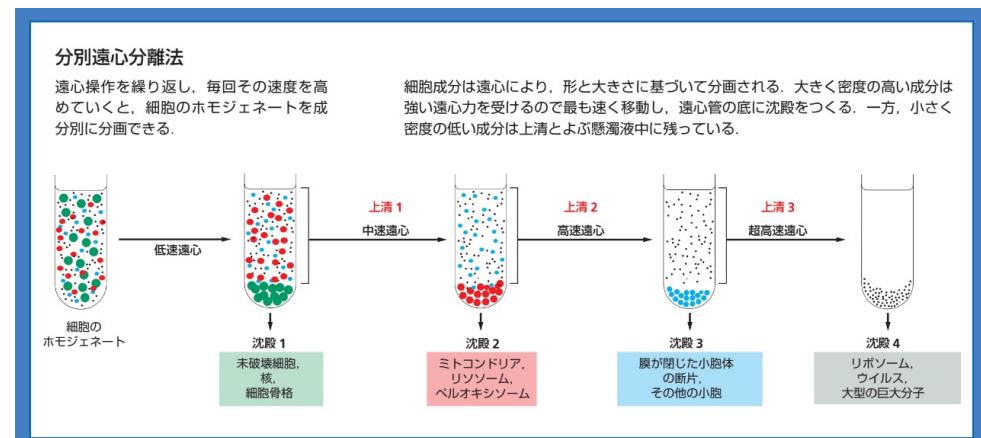
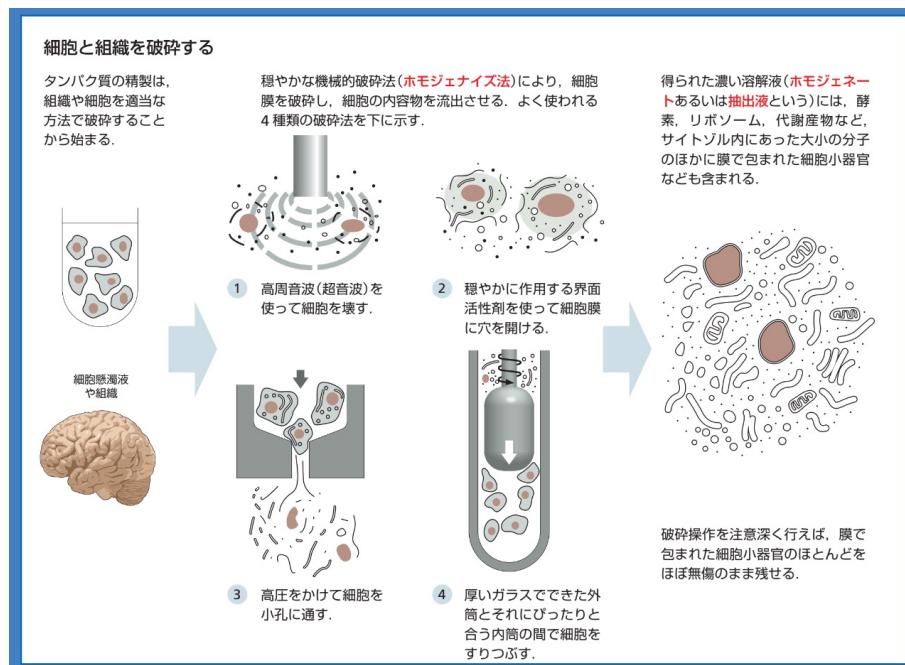


図 4-56 質量分析法を使うと、目的のタンパク質に由来するペプチドの正確な大きさを決定し、そのタンパク質を同定することができる。ここに示すように、この手法により三次元構造を決定するために必要な目的のタンパク質を大量に生産できる。例では目的のタンパク質を二次元電気泳動のポリアクリルアミドゲルから切り出した後(p. 167 のパネル 4-5 参照)、トリプシン消化し、生じたペプチド断片を質量分析計にかけて、それぞれの大きさを正確に測定している。ゲノム塩基配列データベースを検索し、このペプチド指紋にプロファイルが一致するタンパク質(目的の生物がコードする)を見つける。タンパク質の混合物もこの手法で分析できる。(写真提供: Patrick O'Farrell)

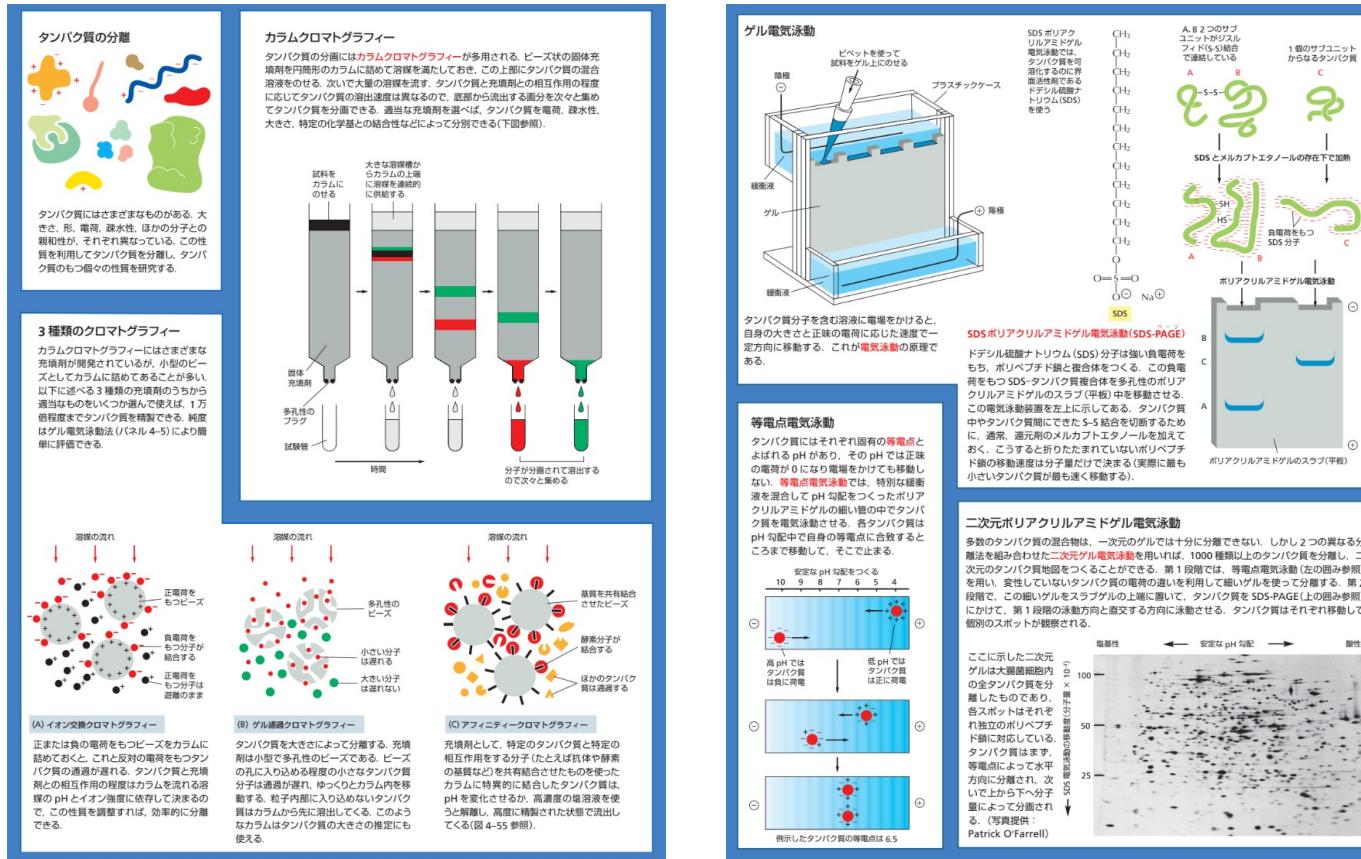
タンパク質の精製方法

- 細胞を破碎して、細胞の中身を取り出す。
- 遠心操作により、いくつかの画分にわける。



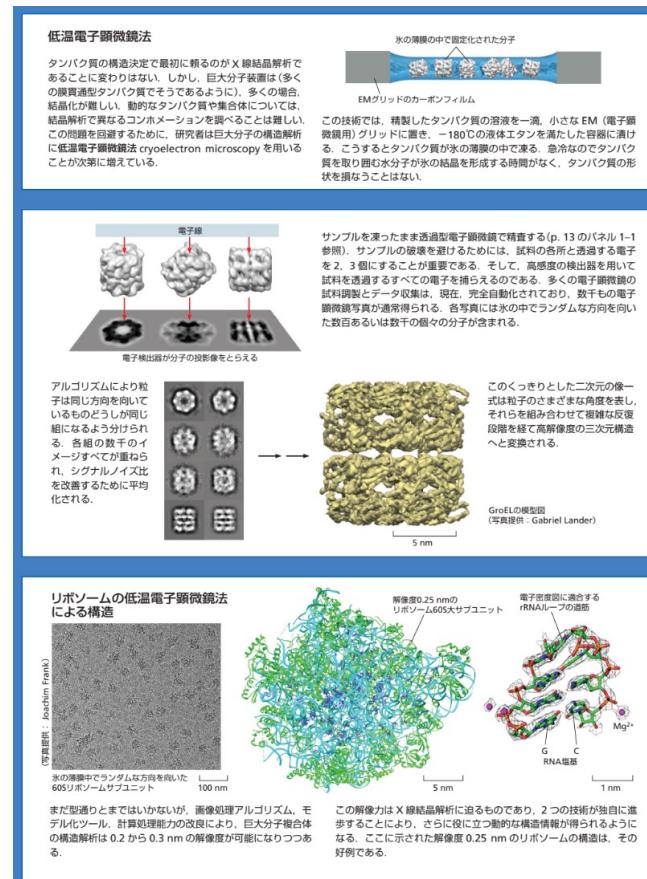
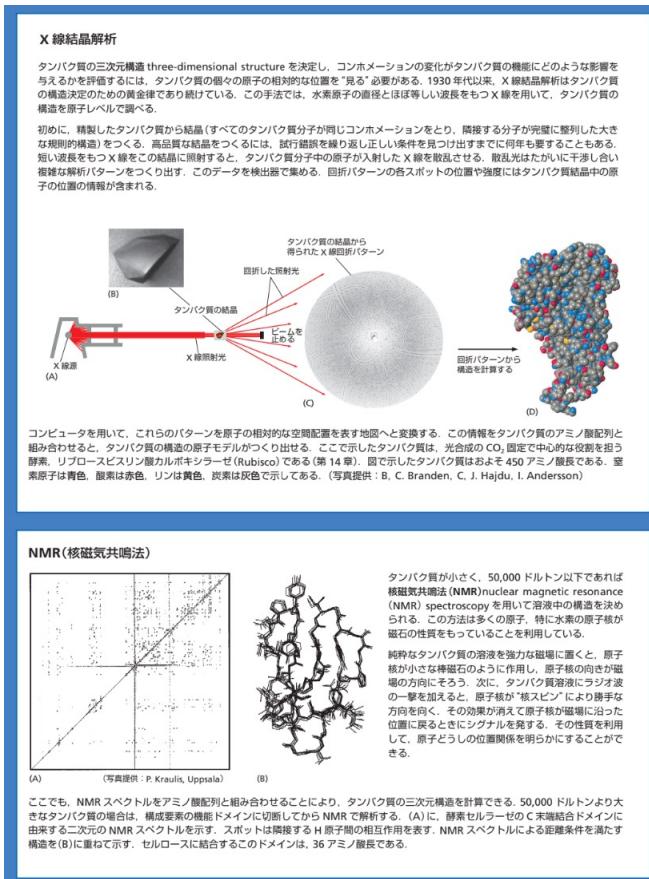
タンパク質の精製と分析

- クロマトグラフィーにより、タンパク質の化学的性質に基づいて分離する。
- 電気泳動により、タンパク質を分析する



タンパク質の構造解析

- X線結晶構造解析により、原子レベルで構造決定できる。
- NMR（核磁気共鳴）法により、溶液中のタンパク質の構造を決定できる。



遺伝子操作による組換えタンパク質の発現

- 多くのタンパク質は、遺伝子工学技術により、改変したり大量発現することができる。

バイオテクノロジーI, II



まとめ

- ・タンパク質は、アミノ酸がペプチド結合で連結した高分子である。
- ・タンパク質の一次構造は、様々な二次構造を形成し、それらが集まって全体の三次構造を形成する。
- ・タンパク質の中には、複数のポリペプチド鎖が集まって、四次構造を形成するものもある。
- ・タンパク質は、分子内で様々な非共有結合やジスルフィド結合などを形成することによって特定の三次元構造におりたたまる。
- ・酵素の基質ポケットでは、複数のアミノ酸残基が共同して、触媒作用を発揮する。
- ・タンパク質は、様々な翻訳後修飾を受けて、その機能を変化させる。
- ・タンパク質は、様々な分析手法により、研究されている。
- ・遺伝子操作により、様々なタンパク質を改変したり大量発現することができる。

参考図書

- Essential細胞生物学 原書第5版 南江堂
- ウォーレン 有機化学 第2版 東京化学同人