

学 位 論 文 題 名

Strutural Studies of Calcium-Binding Lysozymes

(カルシウム結合性リゾチームの構造研究)

学位論文内容の要旨

リゾチームは、*N*-アセチルグルコサミンと*N*-アセチルムラミン酸の β 1-4結合を切る酵素として見いだされ、X線解析により始めて構造が明らかになった酵素である。一方、 α -ラクトアルブミンは、ガラクトシルトランスフェラーゼのモジュレーターとして知られ、ラクトース合成に関わる酵素である。この2つのタンパク質は、アミノ酸の配列順序の類似性、遺伝子構造の類似性より同一の祖先タンパク質より進化したと考えられる。1980年、 α -ラクトアルブミンがカルシウム結合性タンパク質であることがわかり、このカルシウム結合性がリゾチームと α -ラクトアルブミンの構造上の大きな相異点であることが判ってきた。1986年、 α -ラクトアルブミンはX線解析により構造が解明され、カルシウム結合部位の構造が明らかになり、3つのAsp(85,90,91)の側鎖がその結合に関与していることが明らかにされた。この3つのAspは一次構造のわかっているすべての α -ラクトアルブミンで保存され、さらにウマ、ハトリゾチームにおいても保存されている。本研究はカルシウム結合性リゾチームと呼ばれるサブファミリーの発見及び、その内の一つウマリゾチームの物性、構造研究を行なったものである。その結果はリゾチームからカルシウム結合性リゾチームをへて α -ラクトアルブミンへ進化したことを支持するものである。以下に要約する。

ウマ、ハトリゾチームがカルシウム結合蛋白であることを明らかにした。それぞれのリゾチームを精製し、ウマとハトリゾチームには分子あたり1個のカルシウムが結合し、ヒトとニワトリリゾチームにはカルシウム結合がないことを原子吸光分析により証明した。カルシウム結合性蛍光試薬(Quin2およびFura2)を用いてそのカルシウム結合定数を解析した。ウマ、ハトリゾチームの結合定数はそれぞれ $10^{6.4} \text{ M}^{-1}$ 、 $10^{7.2} \text{ M}^{-1}$ である。すなわち、カルシウム結合は α -ラクトアルブミン

だけではなくリゾチームにも存在する場合がある。リゾチームファミリーはリゾチーム、カルシウム結合性リゾチーム、 α -ラクトアルブミンの3つのサブファミリーに分けられる。新田等(1989)による一次構造の解析の結果、カルシウム結合性リゾチームはリゾチームから遺伝子重複により進化しさらにカルシウム結合性リゾチームは遺伝子重複と新しい機能の獲得により α -ラクトアルブミンへと進化したと考えられる。

ウマリゾチームの変性過程に及ぼすカルシウムの影響について研究した。カルシウム濃度が高いと、天然状態(N)が安定化され、2状態転移をする。しかし、カルシウム濃度が低いと見かけの天然状態の安定性が下がるために安定な平衡中間体(I)が観測される。N-I転移の ΔC_p は5.8kJ/mol/deg、またI-U転移の ΔC_p はほとんど0kJ/mol/degであった。これはN-I転移において疎水性領域が崩壊したことを意味する。この変性の過程は α -ラクトアルブミンのそれと同様であった。

X線解析によりウマリゾチームの構造を2.5Å分解能で明らかにした。結晶化は水滴懸下蒸気拡散法で行い、2種類の結晶形が得られた。十分な回析強度が得られたTYPE II($P2_12_12_1$, $a=54.1\text{\AA}$, $b=57.2\text{\AA}$, $c=38.7\text{\AA}$ 、非結晶学的対称単位あたり1分子($V_m=2.05$))の結晶でデータ測定を行った。測定したX線強度データの統計値は2.3 Å分解能までの全28911点、独立な回析強度として4842点、 $R_{\text{merge}}=3.9\%$ であった。分子置換法により初期位相を求め、分子動力学に基づくプログラムXPLORでモデルの回析強度に対する精密化を行い、各段階でモデルの位相を用いた電子密度マップを計算してグラフィックスプログラムFRODO(VAX/PS390上)でこのマップを確認し、モデルのマニュアルによる修正を行なった。3サイクルの精密化後、R値は0.240を得ている。カルシウム結合ループ部分は、進化上類縁のカルシウム結合タンパクである α -ラクトアルブミンのカルシウム結合部分と同様の立体構造をしている。近年、ヒトリゾチームに遺伝子操作によりカルシウム結合部位を導入したD85/90ヒトリゾチーム(Holo, Apo共)の構造が明らかにされている(Inaka等、1991)。これらとカルシウム結合部位を比較した所、3つのAsp側鎖の向きはHoloよりApoD85/90ヒトリゾチームと非常に良い一致を見た。一方温度因子の解析から、動的構造もC-タイプのリゾチームファミリーにおいて保存されておりカルシウム結合性リゾチームはリゾチームと α -ラクトアルブミンの間に位置する。

ウマリゾチームはカルシウム結合により多くの ^1H -NMRシグナルがゆっくりした交換をする。これらのシグナル帰属のため2次元NMR(COSY, HOHAHA, NOESY)による解析を行なった。この結果Trp28, Trp108(疎水性領域コアを形成)のプロトンシグナルはカルシウム結合に伴うゆっくりした交換がみられるが、その間のNOE強度は大きく変わらない。またホロ、アボで β シート間のNOEパターンおよび遠隔間NOE強度は変わらない。すなわち、カルシウム結合に伴う構造変化は α -ラクトアルブミンほど大きなものではなく、基本構造(2次構造および疎水性コア)は同じであると考えられる。

本研究により得られたカルシウム結合性ウマリゾチームの以下の物性はリゾチームと α -ラクトアルブミンの中間に位置する。(1) α -ラクトアルブミンと同様、分子あたり1個のカルシウムを結合する。(2) α -ラクトアルブミンと同様、安定な変性中間体を持つ。(3)静的構造は基本的にリゾチーム、 α -ラクトアルブミンと変わらない。(4)カルシウム結合部位の構造は α -ラクトアルブミンに非常に似ている。(5)動的構造は相関係数の解析によりリゾチームと α -ラクトアルブミンの間にある。

(6) α -ラクトアルブミンと異なりホロとアボで大きな構造変化はない。

これらの結果はカルシウム結合性リゾチームが系統樹上でリゾチームと α -ラクトアルブミンの中間に位置する事と一致する。高次構造(静的構造、動的構造)は分子進化を反映していると考えられる。

1) Nitta, K., and Sugai, S. (1989) *Eur. J. Biochem.* 182, 111-118

2) Inaka, K. et al (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 20666-20671

学位論文審査の要旨

主 査	教 授	新 田 勝 利
副 査	教 授	戸 倉 清 一
副 査	教 授	引 地 邦 男
副 査	助教授	田 中 勲

学 位 論 文 題 名

Structural Studies of Calcium-Binding Lysozymes

(カルシウム結合性リゾチームの構造研究)

リゾチームは細菌の細胞壁を構成するペプチドグリカンを加水分解する酵素でニワトリ卵白のものが古くから研究されてきた。このニワトリのリゾチームは分子量が約14、000の単純タンパク質で、これと相同のリゾチームが動物界に広く分布している。一方、 α -ラクトアルブミンは哺乳動物の乳汁中に不変的に存在するタンパク質で、ガラクトシルトランスフェラーゼに結合して乳糖合成酵素とする基質特異性変換因子としての機能を持っている。この2つのタンパク質は、アミノ酸配列の類似性等から、相同で α -ラクトアルブミンがリゾチームから進化したと推定された。

リゾチームが単純タンパク質であるのに対して α -ラクトアルブミンはカルシウムイオンを1個強く結合した金属タンパク質である。1986年、英国のStuart等がキイロヒヒの α -ラクトアルブミンのX線構造解析を発表しカルシウム結合部位を決定した。この部位はアミノ酸配列が明らかになっている α -ラクトアルブミンの全てに保存されていたがウマのリゾチームにも存在し、ウマリゾチームのカルシウム結合の可能性が指摘された。当時この可能性を否定する報告もされたが申請者はゲルクロマトグラフィーと原子吸光法を併用してウマ及びハト卵白のリゾチーム中のカルシウム

を定量してこれらがカルシウムタンパク質であることを証明した。ついでカルシウム結合性の蛍光色素とのカルシウムイオンの競合によってこれらのカルシウム結合常数を決定してそれが α -ラクトアルブミンに匹敵する大きな値をとることを証明した。

ついで申請者はウマリゾチームの巻き戻りを研究した。タンパク質の巻き戻りの過程は生合成の際に特異的高次構造を獲得するプロセスに相当し同属タンパク質の間では保存されている。ところが α -ラクトアルブミンとリゾチームとでは前者が安定なモルテングロビュールと言われる状態を経由して巻き戻るに対して後者には安定な中間体は存在しない。申請者はウマリゾチームの巻き戻りには α -ラクトアルブミンと同様、他のリゾチームとは異なり、安定な中間体が存在することを明らかにしてカルシウム結合性リゾチームと α -ラクトアルブミンの関連性をさらに強く示唆した。

つぎに申請者はウマリゾチームのX線構造解析を行った。得られた結晶はアボ型で全体の構造はカルシウム非結合性リゾチームや α -ラクトアルブミンと類似しており、カルシウム結合部位の構造はD 8 5 / 9 1 ヒトリゾチームのアボ型のそれと同じであった。またウマリゾチーム結晶のB-因子の解析からリゾチームの同属タンパク質の間ではタンパク質分子内部の運動も保存されている事が明らかとなった。

さらに2次元NMRによる構造解析を行い1部のケミカルシフトの帰属を決定した。またウマリゾチームはカルシウムの脱着によって小さな構造変化をする事、しかし変化する部位は結合部位付近のみではない事を示した。カルシウム結合性リゾチームの諸性質はちょうど α -ラクトアルブミンとカルシウム非結合性リゾチームの中間の性質を示すものが多く、 α -ラクトアルブミンがカルシウム非結合性リゾチームからカルシウム結合性リゾチームを経由して進化したとの仮説を強く指示している。

以上は α -ラクトアルブミン～リゾチームの相互の関係をカルシウム結合性リゾチームの発見及びそれらの高次構造の面から明らかにした先駆的な研究で、タンパク質の進化の研究に資するところ大であり、且つ国際的な評価も高いものである。博士の学位を取得するに充分であると認める。