

学 位 論 文 題 名

Studies of Ca^{2+} -binding and folding mechanism of Ca^{2+} -binding lysozyme and α -lactalbumin

(カルシウム結合性リゾチームと α -ラクトアルブミンのカルシウム結合、
及びフォールディング機構に関する研究)

学位論文内容の要旨

α -ラクトアルブミンと c 型リゾチームは、機能的にはまったく異なるタンパク質であるが、アミノ酸配列の高い相同性と遺伝子構造や立体構造の類似点から共通の祖先から進化した相同タンパク質であると考えられている。カルシウム結合性リゾチームは生物活性が従来のリゾチームと、カルシウム結合能が α -ラクトアルブミンと同一であるという両者の中間の性質を示す興味深いタンパク質である。ウマリゾチームはカルシウム結合性リゾチームであり、また、このタンパク質のモルテングロビュール状態は、 α -ラクトアルブミンのモルテングロビュール状態よりも安定で、一部天然状態に類似した相互作用によって安定化されていることが既に報告されている。本研究では、(1) ウマリゾチームのカルシウムイオンに対する配位構造をフーリエ変換赤外吸収法によって明らかにすること、(2) ウマリゾチームのモルテングロビュール状態の安定性を定量的に評価し、フォールディング過程のいつ頃形成されるのか明らかにすること、(3) ウマリゾチームと α -ラクトアルブミンのモルテングロビュール状態の違いを決定している構造部位、及び相互作用を明らかにすることを目的とした。

α -ラクトアルブミン分子中でカルシウム結合に必要であるアスパラギン酸残基 (Asp82, 87, 88) は、ウマリゾチームのアミノ酸配列でも保存されている (Asp85, 90, 91)。ウマリゾチームの X 線立体構造解析は既に報告されているが、カルシウム非結合状態の結果であるので、カルシウムイオンに対する配位構造についての情報を得ることができない。赤外吸収スペクトルの COO^- 対称、非対称伸縮振動領域は、金属イオンに対する配位結合様式を反映することが知られている。最初に立体構造既知のウシ α -ラクトアルブミンの赤外吸収スペクトルを調べ、カルシウムに対する配位構造とスペクトル変化との相関関係を調べた。フーリエ変換赤外吸収スペクトルを用いてウシ α -ラクトアルブミンのカルシウム結合について調べると、 COO^- 非対称伸縮振動領域では、 1578 cm^{-1} 、 1592 cm^{-1} 付近で強度が増加し、 COO^- 対称伸縮振動領域では、 1388 cm^{-1} 付近のピークが 1406 cm^{-1} と 1425 cm^{-1} に高波数シフトすることがわかった。X 線構造解析の結果から、これらの変化は α -ラクトアルブミンの Asp82, 87, 88 がカルシウムイオンに対して pseudo-bridging 状態で結合したことを反映していると考えられる。pseudo-bridging 状態のモデル化合物である EDTA について調べると、カルシウム結合に伴って COO^- 非対称伸縮振動領域で強度増加、 COO^- 対称伸縮振動領域で高波数シフトが観測され、ウシ α -ラクトアルブミンで観測された変化と類似していた。これらの結果から、 COO^- 非対称伸縮振動領域での強度増加、 COO^- 対称伸縮振動領域での高波数シフトが pseudo-bridging 状態の特徴であることがわかった。

ウマリゾチームについて同様に調べると、 COO^- 非対称伸縮振動領域では 1578 cm^{-1} 、 1595 cm^{-1} 付近で強度が増加し、 COO^- 対称伸縮振動領域では、 1391 cm^{-1} 付近のピークが 1404 cm^{-1} と 1426 cm^{-1} に高波数シフトすることがわかった。これらの変化は pseudo-bridging 状態の特徴であり、 α -ラクトアルブミンのスペクトル変化と類似している。したがって、ウマリゾチームの Asp85, 90, 91 は pseudo-bridging 状態でカルシウムイオンに配位していることがわかった。

生体内で合成されたタンパク質ポリペプチド鎖は、その特異的な立体構造へとフォールディングしてはじめてその機能を発揮する。タンパク質がどのようにフォールディングするのかを理解することは生物

物理学の重要な課題の1つである。球状タンパク質のフォールディング過程でよく観測される中間体としてモルテングロビュール状態が知られているが、モルテングロビュール状態のフォールディング過程における意義は未だ理解されていない。

ウマリゾチームのモルテングロビュール状態の安定性を定量的に評価するために、平衡条件下でのグアニジン塩酸塩による変性過程を2次構造と3次構造をそれぞれ反映する230 nmと292.5 nmの円二色性を用いて調べた。モルテングロビュール状態から変性状態への転移に伴うギブス自由エネルギー変化はウマリゾチームで4.33-4.37 kcal mol⁻¹と決定された。ウシ α -ラクトアルブミンでは1.42 kcal mol⁻¹であるから、ウマリゾチームのモルテングロビュール状態は非常に安定であることを示すことができた。

変性状態からのリフォールディング反応と天然状態からのアンフォールディング反応をストップフローCD法で調べることによって、フォールディング過程で過渡的に蓄積する中間体や遷移状態についての情報を得ることができる。フォールディング反応初期に蓄積する中間体（バーストフェイズ中間体）について調べたところ、ウマリゾチームのバーストフェイズ中間体の安定性と構造が、平衡条件下で観測されるモルテングロビュール状態に類似していることを示すことができた。したがって、ウマリゾチームの安定で構造化されたモルテングロビュール状態は、フォールディング反応開始後の数十ミリ秒で形成されることが明らかとなった。

ウマリゾチームのモルテングロビュール状態のフォールディング反応に対する役割を理解するために、この中間体がフォールディング経路上に存在するのかどうかをモデルを仮定して調べた。フォールディング経路上に存在すると仮定したOn-pathway modelでは、天然状態形成の速度定数が10 s⁻¹であったのに対して、フォールディング経路上に存在しないと仮定したOff-pathway modelでは2×10⁻⁴ s⁻¹となり、タンパク質のフォールディングでは非現実的な値を示した。したがって、ウマリゾチームのフォールディング反応はOn-pathway modelで記述できることが示された。

球状タンパク質のフォールディングを理解するためには、経路上に蓄積する中間体のみならず、反応の遷移状態についての情報を得ることも重要である。ウマリゾチームの遷移状態で疎水性表面がどの程度埋もれた状態にあるのかを速度定数の変性剤濃度依存性から調べた。その結果、ウマリゾチームの遷移状態では疎水性表面の83%が内部に埋もれた状態にあり、ウシ α -ラクトアルブミンでは52%であることを考慮すると、ウマリゾチームの遷移状態はかなり構造化が進んだ状態であることがわかった。

α -ラクトアルブミンのhelix D（残基番号105-109）はヘリックス構造を示したり、ループ構造を示したりすることが知られており、非常に運動性が高いことが以前に行われた研究によって明らかとなっている。したがって、 α -ラクトアルブミンのhelix Dはflexible loopとも呼ばれている。それに対して、ウマリゾチームのhelix Dは α -ヘリックスを形成しており、運動性が低いことが知られている。したがって、ウマリゾチームのhelix Dがモルテングロビュール状態の高い安定性と天然状態に類似した構造を保持するために大きく寄与している可能性が高いと推測される。そこで、 α -ラクトアルブミンのflexible loopをウマリゾチームのhelix Dのアミノ酸配列に置き換えたキメラタンパク質（HLAELZ）を遺伝子工学的手法によって作製した。モルテングロビュール状態から変性状態への転移に伴うギブス自由エネルギー変化について調べると、HLAELZでは4.45-4.51 kcal mol⁻¹であった。ヒト α -ラクトアルブミンでは3.54 kcal mol⁻¹、ウマリゾチームでは4.33 kcal mol⁻¹であるから、ヘリックスの置換によって、キメラタンパク質のモルテングロビュール状態は約1 kcal mol⁻¹安定化し、ウマリゾチームのモルテングロビュール状態と同程度の安定性を獲得したことを示すことができた。また、HLAELZのモルテングロビュール状態では、ウマリゾチームのモルテングロビュール状態と同様にトリプトファン側鎖の特異的なパッキングが一部残っていることが示された。さらに、アクリルアミドクエンチングの実験を行い、トリプトファン側鎖の溶媒に対する露出度について調べた。その結果、HLAELZのトリプトファン側鎖は一部溶媒から遮蔽された環境にあることが示された。 α -ラクトアルブミンのモルテングロビュール状態では、Tyr103、Trp104、His107は非天然の相互作用をしていると考えられている。HLAELZではHis107はTrpに変異されているので、この非天然の相互作用はHLAELZのモルテングロビュール状態では存在していないと考えられる。したがって、HLAELZのモルテングロビュール状態ではTrp104の環境がヒト α -ラクトアルブミンと異なっている可能性が高い。これらの結果から、HLAELZのモルテングロビュール状態ではTrp104と、変異によって新たに導入されたTrp107で側鎖のパッキングが一部残っており、溶媒から遮蔽された状態にあると考えられる。

HLAELZで観測されたモルテングロビュール状態の高い安定性がウマリゾチームのhelix D固有の安定性に由来するのかどうかを調べるために、helix-coil予測プログラムを用いてヘリックス形成能を

調べた。その結果、ウマリゾチームの helix D のヘリックス形成能は α -ラクトアルブミンの helix D より低いことが示された。したがって、ウマリゾチームのモルテングロビュール状態の高い安定性は helix D 固有の安定性に由来するものではなく、helix D と他の構造部位との長距離相互作用によるものであることが示唆された。

学位論文審査の要旨

副 査 教 授 新 田 勝 利

副 査 教 授 田 中 勲

副 査 教 授 山 岸 皓 彦

副 査 助 教 授 出 村 誠

学 位 論 文 題 名

Studies of Ca^{2+} -binding and folding mechanism of Ca^{2+} -binding lysozyme and α -lactalbumin

(カルシウム結合性リゾチームと α -ラクトアルブミンのカルシウム結合、
及びフォールディング機構に関する研究)

蛋白質ポリペプチド鎖はその特異的な立体構造へと折り畳まれて初めてその機能を発揮する。球状蛋白質の折り畳み過程でよく観測される中間体としてモルテングロビュール状態が知られている。また、多くの金属蛋白質にとって金属イオンの結合は、その構造や安定性に寄与している場合が多い。申請者は(1)カルシウム結合性リゾチームであるウマリゾチームとカルシウムイオンの結合様式の解明、(2)ウマリゾチームの折り畳み反応機構の解析、(3)中間体安定化機構の分子論的解明に関する研究成果を、カルシウム結合性リゾチームと α -ラクトアルブミンのカルシウム結合、及びフォールディング機構の研究として体系的にまとめた。

申請者は、ウマリゾチームの変性過程を円二色性(CD)測定によって追跡して、ウマリゾチームのモルテングロビュール状態は非常に安定であることを示した。またウマリゾチームの安定で構造化されたモルテングロビュール状態は、巻き戻りの初期(数十ミリ秒)に蓄積する中間体と同一であることを実験的に示した。さらに申請者は、on-pathway model と off-pathway model に基づいて実験データから天然状態形成の反応速度定数を導出したところ、前者から 20 s^{-1} と妥当な数値を得て、ウマリゾチームの巻き戻り反応は On-pathway model で記述できることを示した。またウマリゾチームの巻き戻り反応経路の遷移状態はかなり構造化が進んだ状態であることも明かにした。これらの結果は、一般に巻き戻り反応初期に形成されるモルテングロビュール状態が、蛋白質の巻き戻りにとって必須の中間体であることを示唆している。

申請者は、ウマリゾチームの helix D がモルテングロビュール状態の安定性と構造保持のために大きく寄与していると推測し、 α -ラクトアルブミンの flexible loop をウマリゾチームの helix D のアミノ酸配列に置き換えたキメラ蛋白質(HLAELZ)を作製した。巻き戻りの熱力学的研究から、HLAELZ はウマリゾチームのモルテングロビュール状態と同程度の安定性を獲得したこと、モルテングロビュール状態ではウマリゾチームと同様にトリプトファン側鎖の特異的なパッキングが一部残っていることを示した。さらに蛍光分光学的な実験によってモルテングロビュール状態では Trp104 と変異によって導入された Trp107 の側鎖のパッキングが一部残っており、溶媒から遮蔽された状態にあると推測した。さらに、helix-coil 予測プログラムからウマリゾチームのモルテングロビュール状態の高い安定性は helix D と他の構造部位との長距離相互作用によるものであると結論づけている。上記のキメラ蛋白質について

得られた研究結果は、球状蛋白質におけるモルテングロビュール状態の安定化因子について分子論的な一般性を引き出す重要な研究成果といえよう。

学位論文の公開発表の質疑応答では、申請者は自ら行った実験の結果や過去の論文の内容などを引用し、豊富な知識に基づいて質問に明快に回答した。

以上のように申請者は、球状蛋白質の立体構造形成機構についていくつかの重要な知見を示した。審査員一同はこれらの成果を高く評価し、申請者が北海道大学博士（理学）の学位を授与される資格が充分にあるものと認定した。