

学 位 論 文 題 名

Studies on Unfolding Mechanism and Unfolded state of Hen Egg-white Lysozyme

(鶏卵白リゾチームの変性機構及び変性状態に関する研究)

学位論文内容の要旨

本研究は、以下の3つのセクションからなる。

(1) リゾチームの平衡化学変性過程における中間状態の検出及びその熱力学的解析

従来、鶏卵白リゾチームの熱変成及び化学変性は、平衡条件下では中間体はほとんど検出されず、2状態転移で近似されることが知られていた。一方、同族の α -ラクトアルブミンは、平衡条件下で中間体を含む3状態転移をすることが知られ、その変性挙動の違いはリゾチームと対比されてきた。速度論からの解析によると、リゾチームのフォールディングの過程において、native-likeな2次構造を持ち3次構造が壊れた中間体が存在することが示されている。平衡条件下および速度論の両方の実験から中間体を解析することは、蛋白フォールディング機構を解明する上で重要である。本研究は、pH0.9の酸性条件下で塩酸グアニジン変性を調べ、熱力学的に安定な中間体をCDスペクトルから検出した。天然と中間状態の間に約84%の、中間と変性状態の間に16%の比熱の変化(ΔC_p)があることがわかった。天然から中間状態への協同性は、3次構造が壊れることに対応し、中間から変性状態への過程は、2次構造が壊れることに対応する。この結果は、速度論からの結果と一致し、リゾチームの変性過程に熱力学的に安定な中間体が存在することを示す。したがって、リゾチームの化学変性過程は、3状態モデルで説明される同族の α -ラクトアルブミンと本質的には同じであることが明らかになった。

(2) 変性剤存在下でのリゾチームの圧力変性に伴う体積変化及びその変性機構の解析

球状蛋白質の圧力変性は、1970年頃から報告されているが、一般には2状態転移を仮定して体積変化を算出してきた。その値は、pHや温度などの実験条件に依存するが、 $-10 \sim 100 \text{ ml/mol}$ の値が報告されている。本研究は、 $10 \sim 60^\circ\text{C}$ の温度範囲で、塩酸グアニジン存在下での化学変性転移領域内にあるリゾチーム水溶液に、 120 MPa までの圧力を加えた。更に2状態モデルを仮定することで、加圧変性に伴う体積変化をUV測定から求め、変性機構を検討した。加圧変性に伴うGibbs free energy変化(ΔG_u)を圧力に対してプロットしたところ、傾きはほとんど直線性を示し、 25°C 、 40°C 、 60°C の温度では、転移領域内でほぼ同じ傾きを示した。これは、加圧による変性機構が2状態仮定を支持する結果であると考えられる。一

方、20℃、15℃、10℃の低温領域では ΔG_u の圧力依存性に転移領域内で異なる傾きを示す結果が得られた。この低温領域での結果は、リゾチームの加圧変性の解析に対して2状態モデルが適当でなく、中間体の存在を示唆するものであると考えられる。

圧力による蛋白変性の機構は十分解明されていないが、蛋白内部の packing、及び疎水基の露出による水和が重要な因子であると考えられている。一方、蛋白は、低温でも変性する事が知られており、これは疎水性相互作用が弱くなるためと説明されている。圧力に対する系の応答は、体積の減少する方向なので蛋白内部の露出による疎水基の水和（低分子モデルでは、水和によって系の体積は減少する）が、重要な因子であると考えられる。したがって、熱力学的に低温変性、圧力変性が重なる領域において、変性機構の変化が体積変化となって現われたものと考えられ、溶媒である水分子と露出される疎水性残基との相互作用が蛋白変性の協同性に重要な役割を果たしていると推定される。リゾチームは、化学平衡条件下では典型的な2状態変性で近似されてきた蛋白だが、圧力による摂動は、その協同的な変性機構に影響を及ぼすことが本実験から明らかになった。

(3) リゾチームの化学変性に伴う体積、圧縮率変化及びその変性状態の解析

変性状態は、速度論による蛋白フォールディング研究の reference 状態であり、蛋白安定性を理解する上での基準となる状態である。近年、NMR や小角 X 線散乱などの測定装置の進歩とともに、変性状態の構造に関する研究が重要になってきている。塩酸グアニジン変性状態は、実験的に得られる変性状態の中で最もランダムコイル状態に近いと考えられている。本研究では、鶏卵白リゾチームの塩酸グアニジン変性に伴う体積変化を密度計を用いて、また断熱圧縮率変化を sing-around 音速計を用いて求め、変性状態がランダムコイル状態に相応するかどうか検討した。化学変性に伴う体積変化は、直接密度測定から求められる。リゾチームのこれまで報告された値は、実験的な難しさから $0 \sim 1000 \text{ cm}^3/\text{mol}$ ($\sim 0.07 \text{ cm}^3/\text{g}$) と非常に大きなばらつきがある。本研究では、 $\pm 0.01 \text{ cm}^3/\text{g}$ の誤差内で変性の前後でほとんど変化が見られないことが分かった。先の圧力変性による体積変化は、約 $-50 \text{ cm}^3/\text{mol}$ で比容に換算すると $-0.0025 \text{ cm}^3/\text{g}$ となり密度測定の誤差内に入ることがわかる。したがって、本研究で得られた密度測定と圧力変性からのそれぞれの体積変化の相関は非常にいいことが分かる。

部分比断熱圧縮率は、塩酸グアニジン変性に伴って約 $-0.03 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1} \text{ GPa}^{-1}$ の減少を確認した。一方、オリゴペプチドの断熱圧縮率の加算性を仮定したランダムコイル状態では、天然状態の値から約 $-0.15 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1} \text{ GPa}^{-1}$ 減少すると報告されている。実験値とランダムコイル状態を仮定した計算値の差から、変性に伴い内部の疎水基、極性基が溶媒に露出すると考えられるが、塩酸グアニジン変性状態は、完全なランダムコイル状態に相応しないことが明らかになった。これは最近の NMR や X 線による解析から変性状態がかなりの残存構造を持っているという結果を支持する。

学位論文審査の要旨

主 査	教 授	新 田 勝 利
副 査	教 授	中 田 允 夫
副 査	助教授	佐々木 直 樹
副 査	助教授	出 村 誠
副 査	助教授	櫻 井 雅 男 (東京理科大学基礎工学部)

学 位 論 文 題 名

Studies on Unfolding Mechanism and Unfolded state of Hen Egg-white Lysozyme

(鶏卵白リゾチームの変性機構及び変性状態に関する研究)

本研究は、以下の3つのセクションからなる。

- (1) リゾチームの平衡化学変性過程における中間状態の検出及びその熱力学的解析
- (2) リゾチームの圧力変性に伴う体積変化及びその変性機構の解析
- (3) リゾチームの化学変性に伴う体積、圧縮率変化及びその変性状態の解析

この中でタンパク質の構造形成の研究に最も貢献した部分は(3)の体積及び圧縮率の変化の研究に関するものである。

近年、NMR や小角 X 線散乱などの測定装置の進歩とともに、変性状態の構造に関する研究が重要になってきている。塩酸グアニジン変性状態は、実験的に得られる変性状態の中で最もランダムコイル状態に近いと考えられている。本研究では、鶏卵白リゾチームの塩酸グアニジン変性に伴う体積変化を密度計を用いて、また断熱圧縮率変化を sing-around 音速計を用いて求め、変性状態がランダムコイル状態に相応するかどうか検討した。化学変性に伴う体積変化は、直接密度測定から求められる。リゾチームのこれまで報告された値は、実験的な難しさから $0 \sim -1000 \text{ cm}^3/\text{mol}$ ($\sim -0.07 \text{ cm}^3/\text{g}$) と非常に大きなばらつきがあった。本研究の結果、 $\pm 0.01 \text{ cm}^3/\text{g}$ の誤差内で変性の前後でほとんど変化が見られないことが分かった。(2) の圧力変性による体積変化は、約 $-50 \text{ cm}^3/\text{mol}$ で比容の変化に換算すると $-0.0025 \text{ cm}^3/\text{g}$ となり密度測定の誤差内に入ることがわかる。したがって、本研究で得られた密度測定と圧力変性からのそれぞれの体積変化の相関は非常によく、信頼度が高い実験結果であることが分かる。

部分比断熱圧縮率は、塩酸グアニジン変性に伴って約 $-0.03 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1} \text{ GPa}^{-1}$ の減少

を確認した。一方、オリゴペプチドの断熱圧縮率の加算性を仮定したランダムコイル状態では、天然状態の値から約 $-0.15 \text{ cm}^3\text{g}^{-1}\text{GPa}^{-1}$ 減少すると報告されている。実験値とランダムコイル状態を仮定した計算値の差から、変性に伴い内部の疎水基、極性基が溶媒に露出すると考えられるが、塩酸グアニジン変性状態は、完全なランダムコイル状態に相応しないことが明らかになった。これは最近の NMR や X 線による解析から変性状態がかなりの残存構造を持っているという結果を支持する。

以上のように申請者は、球状タンパク質の立体構造形成機構について体積挙動、圧力応答の面から独創的な研究を展開し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。