

学 位 論 文 題 名

NMR Study of Intramolecular Dimer
Antifreeze Protein RD3

(分子内二量体不凍タンパク質 RD 3 の NMR 法による構造解析)

学位論文内容の要旨

序 論

不凍タンパク質 (Antifreeze Protein、AFP) は、南極などの寒冷水域に生息する魚類の血漿中に存在するタンパク質である。このタンパク質は、0℃以下の温度で血漿中に生成する氷結晶と結びつき、その結晶成長を妨げ、血漿の凝固点を下げる機能 (不凍機能) を持っている。氷の結晶成長は、1 気圧下で通常生成する氷結晶 (六方晶系) の主にプリズム面に垂直な方向に向かってすすむことが知られている。提唱されている AFP の不凍機能モデルによれば、AFP は氷結晶のプリズム面に結合し、この面の結晶成長を阻害するとされている。その結果、氷結晶は六角すいを 2 つあわせたようなバイピラミッド型の結晶を形成する。この結晶成長阻害と、凝固点を著しく降下させる活性との関係は次のように説明される。AFP の結合している隙間の結晶表面は凸状になって安定する。この凸状表面の化学ポテンシャルは、その曲率に比例する (ケルビン効果)。この凸状表面にさらに水分子が結合するためのエネルギーコストは、通常の氷の成長する場合に比べ大きいため、凝固点が降下するのである。魚類の AFP はこれまでに、TypeI から TypeIV の 4 つのタイプが発見されている。我々は、その中でも低濃度で凝固点を効果的に下げる能力を有している RD3 と名付けられている AFP に注目した。

近年新規の AFP である RD3 が単離された。RD3 は、南極ゲンゲ (*Lycodichthys dearborni*) の血液から単離された Type III に属する AFP である。RD3 は、64 残基と 61 残基からなる 2 つのドメインから構成され、各々は既知の Type III AFP と高い相同性を有している。2 つのドメインは 9 残基からなる連結部位により結ばれている。このような分子内二量体を形成している AFP は、RD3 が唯一の例である。本研究においては多次元 NMR 法により、RD3 の水溶液中での立体構造解析を行った。また、その運動性を調べるために、¹⁵N-NMR 緩和時間解析を行った。さらに、RD3 の特徴的な活性発現様式と、得られた立体構造解析の関係を議論する。

実験方法及び結果

大腸菌大量発現系および各種クロマトグラフィーを用いて、高純度の RD3 を約 100 mg 得た。多次元 NMR 実験に必要な安定同位体 ¹⁵N 及び ¹³C/¹⁵N ラベル化試料をそれぞれ約 15 mg 得た。これらの試料を用いて、凝固点測定、顕微鏡観察、及び各種 NMR 実験を行った。

凝固点測定は、不凍活性の測定で標準的に使われている浸透圧計を用いる方法で行った。比較のために RD3 の N ドメインと連結部位を含む RD3-NI、およびリゾチームも

測定した。リゾチームの凝固点はモル凝固点降下に従って濃度に対し直線的に変化するのに対し、RD3 および RD3-NI の場合、低濃度域で大きく増大し、高濃度域で飽和に達するという結果を示した。この性質は他の AFP でも共通して観測されるもので、確かに我々の用意したサンプルが不凍活性を有していることが確かめられた。また、RD3 と RD3-NI を比較した場合、高濃度域での飽和した凝固点はほとんど変わらないのに対し、低濃度域での活性増加の度合いが RD3 のほうが大きく、同一濃度では最大 6 倍以上の活性を発現した。

顕微鏡観察は凝固点測定に用いたものと同じ試料を用いて行った。RD3 の場合、0.4 mM 以下の濃度では、顕微鏡で観察できる大きさのバイピラミッド型の結晶は観察されなかった。これらの濃度で観察できた結晶は針状結晶で、これは AFP 溶液をその凝固点以下まで温度を下げたときに、全体が凍るときに観察される形状である。これに対し、0.5 mM 以上の濃度では、バイピラミッド型の結晶が観測された。ここで観察された形状は、単量体の AFP が高濃度で存在するときに見られる形状であった。

NMR 実験は、非ラベル化および安定同位体ラベル化試料を用いて NMR 試料溶液を調製し、構造解析に必要な各種多次元実験を行った。NMR 実験は、氷に作用する温度域に近い 4℃で行った。NMR 分光計として JEOL JNM-A500、および VARIAN UNITY-500 を使用し、プロトンの共鳴周波数 500 MHz で行った。NMR データの処理とスペクトルの帰属は、ワークステーション上で、NMRPipe および PIPP プログラムを用いて行った。立体構造計算に用いる構造情報には、NOE1507 個、水素結合 40 個、2 面体角 ϕ 80 個を用いた。これらの情報を満足する立体構造を、X-PLOR 3.851 プログラムの Distance geometry/simulated annealing プロトコルを用いて計算した。合計 40 個の収束した構造を得た。N ドメイン、C ドメイン、連結部位の主鎖の RMSD は、それぞれ 0.65、0.61、および 1.07 Å であった。得られた RD3 の二つのドメインの立体構造は、それぞれ X 線および NMR 法で決定された他の AFP Type III と非常によく似た構造であった。RD3 の二つのドメインを結ぶ連結部位は大きく湾曲した構造を持っていることが示された。二つのドメインの空間的な位置の関係は、通常の二量体タンパク質でよく見られる、2 回軸を持った位置ではなく、並進の位置に配置していることが明らかになった。

連結部位の運動性を調べるために、安定同位体 ^{15}N でラベルされているアミド基の NMR 緩和時間を測定し、残基ごとの運動性の解析を行った。緩和時間の解析には、モデルフリー解析により Order parameter (S^2) および運動の相関時間を算出した。連結部位の運動性が N ドメインより高いことが示された。

考察

RD3 の二つのドメインの相対位置は、並進の関係にあることが示された。このことは、氷と結合する活性面の相補的な厳密性を変化させることなく、結合面の面積を 2 倍に増加させることを可能にしている。このドメイン間の位置関係のため、単量体の Type III AFP の場合バイピラミッド結晶を形成するのに必須である Asn¹⁴ が、両ドメイン間に挟まれる位置に存在しており、機能していないと考えられる。RD3 の場合、C ドメインの相同の位置にある Asn⁸⁴ がその役割を担っていると考えられる。

RD3 の活性発現の濃度依存性が、単量体の場合と異なっていることは、AFP の結晶成長阻害およびケルビン効果で説明することができる。RD3 が 0.4 mM 以下の場合、同濃度の単量体 AFP に比べ、吸着する表面積が約 2 倍である。そのため、AFP 分子間の隙間が狭く、そこに形成される凸状表面の曲率が大きくなる。このため RD3 は同濃度の単量体 AFP に比べ 6 倍程度まで高い活性を発現すると考えられる。これに対し、0.5 mM 以上の濃度では、RD3 の活性はほとんど飽和に達している。RD3 の活性面の表面積が約 2 倍であることから、AFP が吸着可能な残存氷結晶面が、単量体の AFP に比べ低い濃度のうちに飽和に達してしまうからであると考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査	教 授	新 田 勝 利
副 査	教 授	田 中 勲
副 査	助 教 授	佐々木 直 樹
副 査	助 教 授	出 村 誠
副 査	主任研究官	津 田 栄 (通産省北海道工業技術研究所)

学 位 論 文 題 名

NMR Study of Intramolecular Dimer Antifreeze Protein RD3

(分子内二量体不凍タンパク質 RD 3 の NMR 法による構造解析)

本研究は南極などの寒冷水域に生息する魚類の血漿中に存在するタンパク質である不凍タンパク質 (Antifreeze Protein、AFP) の溶液中での立体構造を核磁気共鳴法を用いて解明することを第 1 の目的とした。このタンパク質は、0℃以下の温度で血漿中に生成する氷結晶と結びつき、その結晶成長を妨げ、血漿の凝固点を下げる機能 (不凍機能) を持っている。

本研究の対象である RD3 は、南極ゲンゲ (*Lycodichthys dearborni*) の血液から単離された Type III に属する AFP である。RD3 は、64 残基と 61 残基からなる 2 つのドメインから構成され、各々は既知の Type III AFP と高い相同性を有している。2 つのドメインは 9 残基からなる連結部位により結ばれている。このような分子内二量体を形成している AFP は、RD3 が唯一の例である。本研究においては多次元 NMR 法により、RD3 の水溶液中での立体構造解析を行った。また、その運動性を調べるために、¹⁵N-NMR 緩和時間解析を行った。さらに、RD3 の特徴的な活性発現様式と、得られた立体構造解析の関係を議論した。

同位元素置換と多次元 NMR 法を駆使して合計 40 個の収束した構造を得て立体構造を決定した。N ドメイン、C ドメイン、連結部位の主鎖の RMSD は、それぞれ 0.65、0.61、および 1.07 Å であった。得られた RD3 の二つのドメインの立体構造は、それぞれ X 線および NMR 法で決定された他の AFP Type III と非常によく似た構造であった。RD3 の 2 つのドメインを結ぶ連結部位は大きく湾曲した構造を持っていることが示された。2 つのドメインの空間的な位置の関係は、通常二量体タンパク質でよく見られる、2 回軸を持った位置ではなく、並進の位置に配置していることが明らかになった。

RD3 の二つのドメインの相対位置は、並進の関係にあることが示された。このことは、氷と結合する活性面の相補的な厳密性を変化させることなく、結合面の面積を2倍に増加させることを可能にしている。このドメイン間の位置関係のため、単量体の Type III AFP の場合バイピラミッド結晶を形成するのに必須である Asn14 が、両ドメイン間に挟まれる位置に存在しており、機能していないと考えられる。RD3 の場合、C ドメインの相同の位置にある Asn84 がその役割を担っていると考えられる。

申請者は得られた結果を用いて凝固点降下のメカニズムを論議している。この2量体凝固点降下タンパク質の立体構造の解明によってメカニズム解明の進展が図られた。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を引用し、豊富な知識に基づいて質問に明快に回答した。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。