

学位論文題名

Structure and Thermodynamic Studies
of a Ca^{2+} -Binding Lysozyme:
Biophysical Characterization of Canine Milk Lysozyme

(カルシウム結合性リゾチームの構造学的及び熱力学的研究：
イヌミルクリゾチームの生物物理学的特性)

学位論文内容の要旨

近年の目覚ましい分子生物学及び構造生物学の発展に伴い、我々は以前までには理解し得なかった蛋白質の機能、構造及びそれら蛋白質間で引き起こされる様々な分子間相互作用について比較的容易に研究を進めていく事が可能になってきた。今日、蛋白質の重要性は医学、薬学、工学及び農学を含めた極めて幅広い分野に広がりつつあり、我々の生活を円滑に営んで行く上で絶対不可欠なものとなりつつある。しかしながら、このように生命にとって欠くことの出来ない蛋白質は、元をたせば20種類のアミノ酸が独自の一次配列でつながったポリペプチド鎖であり、これがある一定の安定な状態に落ち着いたものが独自の立体構造を形成し、その時に初めてその蛋白質固有の機能活性を獲得するのである。ここで、蛋白質の研究を進めて行く際に重要な問題として上げられるのが、ポリペプチド鎖から機能活性を有する蛋白質独自の立体構造を獲得するまでの過程、いわゆるフォールディング過程の解明である。特に、モルテングロブール(MG)状態に代表されるフォールディング中間体の概念は、蛋白質のフォールディング過程を解明していく上で極めて重要である。また、実際にそのフォールディングされた蛋白質は金属イオン、糖質、脂質、ペプチド及び蛋白質等のリガンド分子と相互作用することにより、特殊な立体構造変化を起こし、それ自身が活性化したり安定性の獲得をするような例が多々報告されている。このような背景にあって、申請者は、カルシウム結合性蛋白質の一種であるイヌミルクリゾチーム(CML)をモデル蛋白質として取り上げ、(1) CMLの大量発現系の構築、(2) CMLのフォールディング過程におけるMG状態の解析、及び(3) CMLのリガンド分子であるカルシウムイオンとの相互作用解析、を熱力学的手法及びX線結晶構造解析・NMR測定等の構造学的手法を用いて蛋白質の構造形成過程を明らかにする事を目的とし、本研究を行った。

まず第一章では、本研究を遂行していく上で必要不可欠であるCMLの大量調製法の構築に関して記述した。CMLのアミノ酸一次配列は既に決定されているにもかかわらず、その遺伝子の塩基配列は未だ決定されていなかったために、申請者は、DNAプライマーをアニーリングする事で目的のCMLの全配列をコードした化学合成遺伝子を作製し、大腸菌を宿主とした発現系により大量発現する事に成功した。一般的にCMLの様に、真核生物のジスルフィド結合を含む分泌型蛋白質を大腸菌等の原核生物で発現を試みると、不溶性顆粒(インクルージョンボディ)として発現し、このままの状態では目的蛋白質として利用する事ができない場合がほとんどである。CMLにおいてもその例外ではなく、目的の天然型蛋白質を得るために *in vitro* の巻き戻し反応を必要とした。申請者は、この巻き戻し反応に大腸菌由来チオレドキシンを用いる事で、CML試料を容易にしかも大量に調製する事を可能にした。実際にこの方法で調製した組換えCMLの生理活性(溶菌活性)及び円二色性(CD)スペクトルを測定したところ、天然型CMLのそれらの結果とほぼ同様の挙動を示す事を確認した。従って、以下の章で記述した実験結果は、全て第一章で構築した発現形を用いて遂行した。

次に第二章で、申請者は、CML の変性過程に蓄積する安定な中間状態に着目し、この状態をより詳細に追跡するために、示差走査熱量計(DSC)、CD スペクトル、蛍光スペクトル、NMR スペクトル、及び X 線結晶構造解析を用いてその物理化学的及び構造学的な特性について考察した。DSC を用いた熱変性実験の結果、CML の中間状態はその安定性が極めて高く、以前に報告されていたウマミルクリゾチーム(EML)のものと比較して変性温度で約 20°C も安定であることが示された。また、申請者は、CD スペクトル及び蛍光スペクトル測定の結果より、この安定な中間状態は MG 状態である事を確認した。さらに CML 及び EML の MG 状態における構造学的知見をそれぞれ比較する事で、申請者は CML における極めて安定な中間状態は、Val-98 及び Met-105 周辺で形成される芳香族クラスターが、かなり構造化している事を明らかにした。従って、これらの実験結果から、CML の中間状態は以前までに考えられていた MG 状態の概念とは著しく異なり、ネーティブ様の構造を保持している可能性が極めて高い事が示唆された。

第三章では、第二章に引き続き CML の MG 状態の熱安定性をさらに詳細に検討するために、DSC 測定から算出される熱力学的パラメーター(エントロピー、エンタルピー、及びギブス自由エネルギー)を定量的に解析し、ヒト α -ラクトアルブミン及び EML の MG 状態における熱安定性と比較検討した。その結果、申請者は、CML 及び EML の MG 状態は変性状態と異なる準安定な熱力学的状態であるのに対し、ヒト α -ラクトアルブミンのそれは変性状態と区別出来ない事を明らかにした。この事により、CML 及び EML 等に代表されるカルシウム結合性リゾチームの MG 状態と α -ラクトアルブミンのそれらでは構造的に異なる事が示唆された。また、申請者は CML の MG 状態で高い安定性及び天然状態に類似した構造を保持する一つの要因として、Val-98 及び Met-105 周辺で形成される芳香族クラスターの存在に着目し、X 線結晶構造解析の結果より考察される His-21, Ile-56, Ala-93, 及び Val-109 のアミノ酸残基を EML のそれらの残基に置換した 4 種類の変異体を作製し、同様の熱安定性を見積もった。これら変異体の内、H21G 及び V109K 変異 CML はその安定性($\Delta\Delta G$)がそれぞれ -2.0 kJ/mol 及び -1.8 kJ/mol 野生型 CML と比較して不安定化していた。申請者は、この結果から CML の安定な MG 状態形成には、 α -ドメイン内に存在する 4 種のヘリックス(A-, B-, C-, 及び D-)間相互作用が構造維持に寄与しているであろう、と推測した。

最後に第四章で、申請者は、CML のカルシウムイオン結合の際に生じる立体構造変化を X 線結晶構造及び NMR 測定から得られる構造情報を用いて解析し、その特徴を調べた。その結果、X 線結晶構造解析で CML の立体構造変化は、カルシウム結合部位(80-90 番目残基) 周辺及び β -ドメイン内の疎水性コア(60-70 番目残基)で局所的な立体構造変化が確認された。この事は、二次元 NMR スペクトル測定の結果からも支持されており、主としてカルシウムイオン結合の際に蛋白質表面の疎水性残基が蛋白質内部に埋没するという特徴を示していた。また、等温型熱量測定(ITC)により、CML のカルシウムイオン結合の際には大きな負のエンタルピー変化を引き起こす事が明らかになり、カルシウムイオン結合の際に生じる熱容量変化(ΔC_p)は -0.21 kcal/mol であった。上記の実験結果は、現在までに報告されているカルシウム結合性蛋白質の立体構造変化と異なっており、カルシウムイオン結合の際に生じる立体構造変化は蛋白質によって様々である事が示された。

以上のように申請者は、カルシウム結合性蛋白質の一種である CML の生物物理学的特性を研究する事で、MG 状態の安定性に寄与する物理的な要素を構造学的及び熱力学的観点から明らかにした。また、カルシウム結合性蛋白質のカルシウムイオン結合の際に生じる立体構造変化は蛋白質により様々であり、各蛋白質による共通性はあまりない事を明らかにした。

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	渡辺	信久
副査	教授	出村	誠

学位論文題名

Structure and Thermodynamic Studies of a Ca^{2+} -Binding Lysozyme: Biophysical Characterization of Canine Milk Lysozyme

(カルシウム結合性リゾチームの構造学的及び熱力学的研究：
イヌミルクリゾチームの生物物理学的特性)

蛋白質は、20種類のアミノ酸が固有の一次配列でつながったポリペプチド鎖であり、ある一定の安定な状態に落ち着いたものが独自の立体構造を形成し、初めて蛋白質固有の機能活性を獲得する。蛋白質の研究を進めて行く際に1つの重要な問題として上げられるのが、このポリペプチド鎖から機能活性を有する蛋白質独自の立体構造を獲得するまでの過程、いわゆるフォールディング過程の解明にある。特に、モルテングロブール(MG)状態に代表されるフォールディング中間体の概念は、蛋白質のフォールディング過程を解明していく上で極めて重要である。また、実際にそのフォールディングされた蛋白質は様々なリガンド分子と相互作用することにより、特殊な立体構造変化を起し、その機能活性や安定性に強く影響している例が多々報告されている。以上のような背景にあって、申請者は、カルシウム結合性蛋白質の一種であるイヌミルクリゾチーム(CML)をモデル蛋白質として取り上げ、(1) CMLの大量発現系の構築、(2) CMLのフォールディング過程におけるMG状態の解析、及び(3) CMLのカルシウムイオンとの相互作用解析について、熱力学的手法及びX線結晶構造解析・NMR測定等の構造学的手法を用いて体系的にまとめた。

申請者は、CMLの変性過程に蓄積する安定な中間状態に着目し、この状態をより詳細に追跡するために、示差走査熱量計(DSC)、CDスペクトル、蛍光スペク

トル, NMR スペクトル, 及び X 線結晶構造解析を用いてその物理化学的及び構造学的な特性について考察した. DSC を用いた熱変性実験の結果, CML の中間状態はその安定性が極めて高く, 以前に報告されていたウマミルクリゾチーム(EML)のものと比較して変性温度で約 20°C 安定であることを示した. また, 申請者は, CD スペクトル及び蛍光スペクトル測定の結果より, この安定な中間状態は MG 状態である事を確認した. さらに CML 及び EML の MG 状態における構造学的知見をそれぞれ比較する事で, CML における極めて安定な中間状態は, Val-98 及び Met-105 周辺で形成される芳香族クラスターが, かなり構造化している事を明らかにした. 従って, これらの実験結果から, CML の中間状態は以前までに考えられていた MG 状態の概念とは著しく異なり, ネーティブ様の構造を保持している可能性が極めて高い事を実験的に証明した. これらの結果は, 一般に多くの球状タンパク質のフォールディング反応初期に形成される MG 状態が, 必ずしも“三次構造の崩壊”と言う状態として結論づけられるものではない事を示唆しており, 今後のフォールディング研究の方向性を示したともいえよう.

また申請者は, CML のカルシウムイオン結合の際に生じる立体構造変化をカルシウム結合(ホロ型)及び非結合状態(アポ型)を X 線結晶構造解析により比較する事で, その特徴を調べた. その結果, CML の立体構造変化は, 全体構造には大きな変化は確認されなかったが, β -ドメイン内の疎水性コア領域(60-70 番目残基)及びカルシウム結合部位(80-90 番目残基)周辺で局所的な立体構造変化を確認し, 主として蛋白質表面の疎水性残基が蛋白質内部に埋没するという特徴を示していた. この立体構造変化の特徴は, 溶液構造を反映している二次元 NMR スペクトル測定の結果からも強く支持されていた. また, 申請者は CML のカルシウム結合に関する熱力学的パラメーターを得る為に熱量測定実験を行った. CML のカルシウムイオン結合の際には大きな負のエンタルピー変化を引き起こす事を明らかにし, カルシウムイオン結合の際に生じる熱容量変化(ΔC_p)が - 0.21 kcal/mol である事を示した. この実験結果は, カルシウム結合に伴う立体構造変化が CML の疎水性領域の減少を示しており, X 線回折及び NMR 測定で示された構造学的根拠を強く支持するものであると結論づけている. 上記の CML の立体構造変化について得られた研究結果は, 今まで曖昧な認識で捉えられていた蛋白質のカルシウム結合の特徴を生物物理学的に明らかにする重要な研究成果と言えよう.

学位論文の公開発表の質疑応答では, 申請者は自らの様々な実験経験や過去の参考文献等の引用し, 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, CML の構造学的及び熱力学的特徴を研究する事で, カルシウム結合蛋白質の立体構造変化における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あるものと認定した。