

学 位 論 文 題 名

NMR Study of Canine Milk Lysozyme:
Analysis of Folding Mechanism, and the Relationship
between Dynamics, Structure and Function

(イヌミルクリゾチームのNMRによる研究:
折り畳み機構および構造-機能-ダイナミクス相関の解析)

学位論文内容の要旨

1. 序

蛋白質は様々な生体反応に関する分子であり、その機能、構造、物性を多角的に研究することは生命現象を理解する上で重要である。蛋白質は生体内において一旦ポリペプチド鎖として合成された後に、その特異的な立体構造を獲得して初めて機能を発揮する。多くの蛋白質は生体内で自発的に立体構造を形成することが知られているが、そのメカニズムに関する詳細は不明である。

また、立体構造を獲得した蛋白質が機能を発揮する過程において様々なダイナミクスが関わっている。そのダイナミクスは様々なタイムスケール(ns~hour)および様々な振幅から成り立っており、例えば、ループ領域の局所的なダイナミクスからドメインごとの大きなダイナミクスなどから成る。しかしながら、それらダイナミクスの機能に対する直接的な役割に関しては研究例が少なく、不明な点が多い。

上記命題を解明する上で蛋白質の構造、ダイナミクスに関するアミノ酸残基レベルでの情報が不可欠である。本研究では NMR と他の様々な物理化学的手法を組み合わせることによりイヌミルクリゾチーム(CML)の構造、ダイナミクス、機能に関して詳細に調べた。

2. イヌミルクリゾチームの特徴

CML は細菌の細胞壁の構成成分であるペプチドグリカン中の *N*-acetylglucosamine と *N*-acetylmuramicacid の間の β -1,4 glycoside の加水分解反応を触媒することにより、溶菌作用を示す酵素である。CML は酸性条件下、適量の変性剤存在下において Molten Globule State(MG)とよばれる部分変性状態を形成する。MG は蛋白質の折り畳み中間体に類似していることが知られており、蛋白質の折り畳み機構を研究する上で格好のモデルである。これまでに、アミノ酸配列で 80%以上の相同性を示す蛋白質である、ウマミルクリゾチーム (EML)の MG に関して研究が行われてきたが、CML はそれに比べて著しく高い安定性を保持していることが知られている。本研究では2つの蛋白質の MG を比較することにより、MG の安定化機構、形成機構について検討した。

CML のその他の特徴としては1個の Ca^{2+} を結合し、それにより熱安定性が著しく向上することが挙げられる。CML に対する Ca^{2+} 結合の効果についてより詳細に知るために(1)溶菌活性の温度依存性、(2)立体構造、(3)ダイナミクス、(4)基質および反応生成物の類似体である *p*-aminophenyl-tri-*N*-acetyl- β -chitotrioside (PAP-tri-NAG)に対する結合および解離速度を Ca^{2+} -free および Ca^{2+} -bound state の両方について調べた。それらの結果から、酵素活性、ダイナミクス、耐熱性の相関を立体構造に基づいて検討した。

3. CML の折り畳み中間体に関する研究

CML の Native 状態の ^1H NMR スペクトルには環電流効果により 0 ppm 以下にシフトしたシグナルが存在し、芳香環を含む疎水性コアの存在を示唆している。CML が完全に MG である pH 2.0 においても 0 ppm 以下にシフトしたシグナルはブロード化されてはいるものの観測された (図 1)。一方で、EML の MG においては 0 ppm 以下にはシグナルは観測されない。このことより CML の MG においては芳香環を含む疎水性コアがまだ残っており、そのことが安定性に関わっていると考えられる。また、CML および EML の立体構造は A, B, C, D の 4 本の α -ヘリックスよりなる α -ドメインと、3 本の β -シートよりなる β -ドメインにより構成されているが、EML の MG においては β -ドメインの構造は壊れていて α -ドメインのみが残っているとされている。一方、CML の MG において観測される 0 ppm 以下のシグナルは全て C-ヘリックス周辺残基に由来しており、そのシフト値への β -ドメイン内の Trp 残基の関与が化学シフト値の計算値と実測値の比較から示唆された。このことは、CML の MG において β -ドメインの構造の一部が残っていることを示している。

次に主鎖アミドプロトンの重水素交換反応を行った。交換速度が速いほどその残基の溶媒露出性が高いことを示す。CML および EML の両方の MG において 4 本の α -ヘリックスの領域で交換速度が遅いという傾向が共通して見られた。しかしながら、2 つの蛋白質の交換速度を比較したとき、CML の方が著しく遅いことがわかった。このことは、 α -ヘリックス自体の安定性が CML の MG の方が高いことを示している。2 つの蛋白質のアミノ酸配列を比較したところ、CML の方が α -ヘリックス間の疎水性相互作用を強める残基への置換が起こっていることがわかった。このことより MG の安定化においてヘリックス間の協同的相互作用が重要であることがわかった。

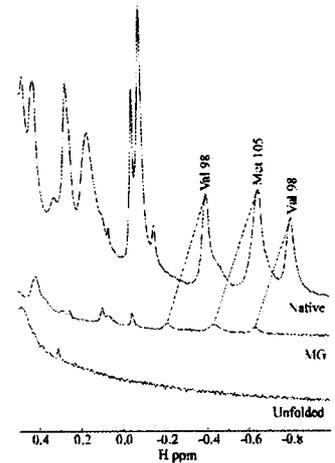


図 1: ^1H NMR spectra of CML in the native, MG and unfolded states.

4. CML の構造-機能-ダイナミクス相関に関する研究

Ca^{2+} -free CML(X-ray)と Ca^{2+} -bound CML(NMR)の構造を比較したところ、2 つの状態間で基本構造の変化は見られなかった(図 2)。しかしながら、局所的な構造変化がいくつかの領域に見られた。特筆すべき変化として Ca^{2+} -binding に伴う D-helix の分子内部の方への移動が挙げられる。これにより D-helix 近傍と疎水性コアとの間の相互作用が増加し、それにより D-helix 近傍の構造が安定化され、分子全体の耐熱性の向上をもたらしたと考えられる。また、D-helix 近傍において遅いタイムスケール(μs ~ ms)のダイナミクスの低下が観測されている。このことは D-helix 近傍の構造安定化と相関があると思われる。また、D-helix 近傍は基質結合領域を形成しているが、D-helix 近傍におけるダイナミクスおよび構造の変化は基質との相互作用に影響を与えることが予想される。実際、基質および生成物の類似体である PAP-tri-NAG に対する結合速度と解離速度は Ca^{2+} -binding に伴い低下していた(表 1)。また、速いタイムスケール(ps ~ ns)のダイ

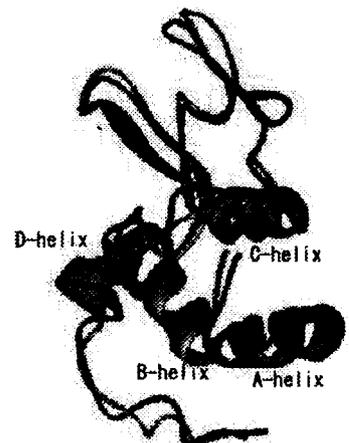


図 2: Superimposition of the structures of Ca^{2+} -bound (black) and Ca^{2+} -free CML(gray).

ナミクスに関しては、6 つある基質結合サブサイトのうち 3 つで低下したものの、分子全体ではあまり変化していなかった。

以上より、 Ca^{2+} の結合は CML の構造およびダイナミクスに対して、分子全体に均一というよりはむしろ局

表 1: Enzymatic characterization of Ca^{2+} -free and Ca^{2+} -bound CML.

	Ca^{2+} -free CML	Ca^{2+} -bound CML
Activation Energy (kJ/mol/K)	41.6	50.4
Optimum Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	35	50
k_{on} (1/s)	8.80×10^2	4.02×10^2
k_{off} (1/s)	2.69×10^{-3}	1.24×10^{-3}
Melting Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	39.0	65.1

所的に影響を与えることが明らかになった。そのダイナミクスの低下は主に基質結合領域に集中しており、それが CML の耐熱性の向上、基質結合速度および生成物解離速度の低下に関っていることが示唆された。

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 助 教 授 出 村 誠

学 位 論 文 題 名

NMR Study of Canine Milk Lysozyme: Analysis of Folding Mechanism, and the Relationship between Dynamics, Structure and Function

(イヌミルクリゾチームの NMR による研究:

折り畳み機構および構造-機能-ダイナミクス関連の解析)

蛋白質は、20 種類のアミノ酸が直鎖状につながったポリペプチド鎖であり、配列固有の立体構造を形成して初めて機能活性を獲得する。そのため、蛋白質がポリペプチド鎖から機能活性を有する独自の立体構造を獲得するまでの過程、いわゆる折り畳み過程の解明は生命科学の分野における重要な課題の一つである。多くの小型の球状蛋白質は部分的に折り畳まれた中間体を経て特異的な構造へと折り畳まれる。そのため、折り畳み中間体に関する蛋白質の折り畳み過程を解明していく上での手がかりとなる。一部の蛋白質では平衡状態において折り畳み中間体に類似した Molten Globule (MG) 状態と呼ばれる部分変性状態を安定に形成し、これまで折り畳み中間体のモデルとして研究が行われてきた。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、その MG 状態について NMR により調べた。また、特異的な立体構造に折り畳ま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こし、その機能活性や安定性を変化させる例が多々報告されている。そこで、CML に対する Ca^{2+} の結合の影響について、NMR による溶液構造およびダイナミクス解析、速度論的解析などにより調べ、その酵素学的性質との関係について体系的にまとめた。

申請者は、CML の MG 状態に着目し、この状態を残基レベルで詳細に追跡するために、CD スペクトル、蛍光スペクトル、NMR スペクトル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。CD スペクトルを用いた GuHCl 変性実験の結果、CML の中間状態の安定性は、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 1 kcal/mol 程度高いことを示した。また、申請者は、CML 及び EML の MG 状態における構造学的知見を比較する事で、CML の MG 状態において Val-98 及び Met-105 周辺で形成される芳香族クラスターがウマミルクリゾチームに比べて天然状態に近いことを示した。これらの実験結果から、CML の MG 状態はこれまで考えられていた MG 状態の概念とは著しく異なり、天然状態様の構造を保持している可能性が高いことを示した。このことは、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ことを示唆しており、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 Ca^{2+} の結合に伴う構造、機能、ダイナミクスの変化を NMR および速度論的手法により調べた。その結果、 Ca^{2+} の結合に伴い、酵素反応の活性化エネルギーおよび至適温度が上昇すること、基質類似体に対する結合および解離速度が低下することを示した。また、全体構造に関しては大きな変化はないものの、 α -ドメイン内の C-helix 末端に存在するループ領域 (100-102 番目残基) 及び D-helix(110-115 番目残基) 周辺で局所的な立体構造変化が起こることを示した。ダイナミクスに関しては、基質結合部位周辺においては ms \sim μ s の時間スケールの運動性が低下すること、触媒残基周辺においては ps \sim ns における運動性が低下することを示した。このように、 Ca^{2+} の結合は CML の構造およびダイナミクスに対して、分子全体に均一というよりはむしろ活性部位周辺に局所的に影響を与え、それが活性化エネルギーや至適温度などの酵素学的性質の変化と関連があることを示した。上記の研究結果は、今まで曖昧な認識で捉えられていた酵素の活性とダイナミクスの関係を生物物理学的に明らかにする上で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、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。