

学位論文題名

Low-Temperature-Induced Changes in Human Lysozyme Elucidated by Multi-Dimensional NMR Spectroscopy

(多次元 NMR 法によるヒトリゾチームに与える低温効果に関する研究)

学位論文内容の要旨

1. 序論

通常、至適温度以下の温度領域において、酵素活性は温度の低下に伴って指数関数的に減少する。この温度領域における酵素活性の値の差が小さいものは、一般的に低温活性酵素と呼ばれている。近年、低温活性酵素の生化学的性質や機能発現メカニズムは工業利用などの観点から重要視されている。これまでに、一次配列上の特徴などから、低温活性酵素は柔軟性に富む構造を有することなどが指摘されてきたが、この酵素の低温下でのふるまいや、高活性を維持するメカニズムに関する詳細な研究はなされていない。これまでに、蛋白質構造の温度低下に伴う変化は、酵素ではない筋肉タンパク質トルポニンCについてのみ解析されている。それによると、温度低下に伴い分子内空隙（キャビティ）の収縮、および機能発現部位である蝶つがい領域周辺の構造変化が局所的に起こることが報告されている。このような温度低下に伴う球状タンパク質の分子内空隙の収縮は他のタンパク質についても報告されているが、温度低下に伴う部位特異的な構造と機能の変化が調べられた例はない。本研究では、モデル酵素としてヒトリゾチームを選び、35 °C および 4 °C での異種核および同種核多次元 NMR 実験に基づいて両温度下での 3 次元構造決定を行い、この酵素なかでも機能発現部位だけが温度の低下に伴って特異的に変化するか否かを検討した。さらに、ヒトリゾチームの糖分解活性の温度依存性を調べることで、温度低下に伴う酵素の構造、分子運動性、機能の変化を詳細に検討した。

2. ヒトリゾチームの特徴

ヒトリゾチームは、分子量 14,300 の 130 アミノ酸残基からなる溶菌酵素で、菌体細胞壁を構成するペプチドグリカン中の *N*-acetylglucosamine、*N*-acetylmuramic acid 間の β -(1-4) 結合を加水分解する。リゾチーム構造に関する構造解析は多くなされており、ヒトリゾチームの立体構造も 1.5 Å の分解能における X 線結晶構造が報告されている。ヒトリゾチームは Chicken-type (C-type) リゾチーム構造の特徴である四本のヘリックス (A; Arg⁵-Arg¹⁴, B; Leu²⁵-Glu³⁵, C; Ala⁹⁰-Val⁹⁹, D; Val¹¹⁰-Cys¹¹⁶)、および三本鎖逆平行 β シート (β 1; Ala⁴²-Asn⁴⁶, β 2; Ser⁵¹-Ile⁵⁶, β 3; Ile⁵⁹-Ser⁶¹) を持っており、 α ヘリックスに富む α -domain、 β ストランドに富む β -domain から構築される。また、基質類似体 (Hexa-*N*-acetylglucosamine) との複合体に対する X 線構造解析が行われており、 α -domain と β -domain に挟まれた活性部位の配置と 6 個の糖環が結合する部位がそれぞれ決定され更に活性発現メカニズムも提唱されている。

ヒトリゾチームの NMR 信号は、35 °C および 40 °C 下で ¹H と ¹⁵N について帰属されている。また、tri-*N*-acetylglucosamine 結合状態、非結合状態における各アミノ酸の主鎖アミドの ¹⁵N 緩和時間測定も解析されている。変異体および他の C-type リゾチームにおける ¹⁵N

緩和時間測定との比較によって、Val¹⁰⁰-Cys¹¹⁶ 残基で構成される活性部位の“口びる”領域の運動性が、活性の強弱に関係していることが指摘されている。NMR 法を用いたリゾチームの溶液構造はニワトリ卵白リゾチーム (PDB 1E8L) とイヌミルクリゾチーム (PDB 1I56) についてのみ決定されており、ヒトリゾチームについては決定されていない。近年、*Pichia pastoris* を用いたヒトリゾチーム大量発現系が構築された。そこで本研究では、ヒトリゾチームの ¹⁵N ラベルおよび ¹³C/¹⁵N 二重ラベル化リゾチームを発現・精製し、35 °C および 4 °C における各 ¹H、¹³C、¹⁵N 信号の帰属を行い、それぞれの温度における溶液構造を決定したうえで、それらの詳細な比較検討を行った。

3. 35 °C および 4 °C における ¹H、¹³C、¹⁵N-resonance の帰属

両温度において主鎖原子 ¹H_N、¹³N、¹³C_α、¹H_α および側鎖原子 C_β、H_β のほぼ全てについて帰属した。Ser⁸² の C_β 原子のみ両温度ともに帰属できなかった。35 °C における ¹H_α、¹H_N resonance は、既報の値と一致した。¹⁵N は他種の C-type リゾチームにおいて保存されている残基間では、大きな違いが無かったが、ヒトリゾチームにおける既報の値とはおよそ 2.1 ppm の差が認められたが、これは ¹⁵N 側化学シフトの観測中心決定法の差によることが判明した。

温度低下に伴って、¹H_N および ¹⁵N の化学シフトは、低磁場側に移動した。また、¹H_α、¹³C_α、¹³C_β も含め、化学シフト移動度は各残基ごとで異なっていた。これらのことから、温度低下に伴ってリゾチームの立体構造が変化することが示唆された。

4. 35 °C および 4 °C における溶液構造および分子運動性

各温度下において、異種核および同種核多次元 NMR 測定を行い、NOE による距離束縛条件および二対角束縛条件を基にそれぞれ溶液構造を決定した。各温度における立体構造の基本骨格は、既報の X 線結晶構造 (PDB 1LZ1) や両温度間でほぼ同じであった。温度低下によって、ヒトリゾチーム分子全体の体積および表面積は、減少した

	35 °C	4 °C
Interhelical angles (degree)		
A B	126 ± 4	130 ± 3
A C	79 ± 4	72 ± 3
A D	117 ± 7	119 ± 6
B C	100 ± 4	110 ± 2
B D	117 ± 6	110 ± 4
C D	97 ± 5	84 ± 3
Total volume (Å ³)	14922.93 ± 462.93	14262.11 ± 390.85
Accessible surface area (Å ²)	6835.17 ± 159.31	6676.49 ± 99.92

(表 1)。これは、分子内空隙の減少による。温度低下に伴う局所的構造変化が“口びる”領域 (Val¹⁰⁰-Cys¹¹⁶) において観測された。図 1 に示したように、D-ヘリックス (Val¹¹⁰-Cys¹¹⁶) が温度低下によって、基質結合部位方向に向かって移動している。ヒトリゾチームでは同領域の構造は、基質結合・解離時に大きく変化するが、低温活性型リゾチームであるニジマスリゾチームでは、その変化が小さい事が知られている。これらの事から、同領域の温度変化に伴う構造変化が低温活性の違いを与える事が示唆された。

表 1 Comparison of interhelical angles, accessible surface area, and total volume of human lysozyme between 35 °C and 4 °C

各温度下において、主鎖アミドの ¹⁵N 緩和時間測定を行い、分子運動性の解析を行った。柔軟性の指標であるオーダーパラメーター S^2 の各温度における平均値は、35 °C (0.841) よりも 4 °C (0.879) において高かった。これは分子内部の運動性が温度効果により低下したことを示唆している。また、D-ヘリックスを構成する残基において R_{ex} (exchange contribution to line shape) の項が連続して観測された。これは、この領域の異方性 (rotational diffusion anisotropy) の特異的変化によるものと推察された。

5. 結論

本研究は、ヒトリゾチームの活性部位 (口びる領域) の構造が、温度低下により“閉じる”方向に特異的変化を起こすことを明らかにした。このことは温度低下に伴って酵素活性が低下するメカニズムについて、初めての構造生物学的知見を与えると同時に

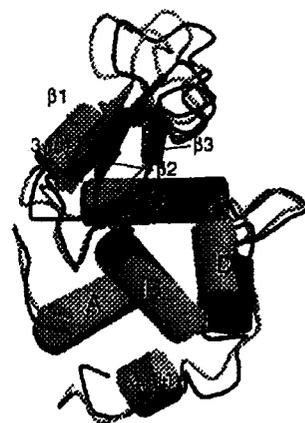


図 1 Superimposition of the structure of human lysozyme at 35 °C (Black) and 4 °C (Gray).

に、低温下でも機能する酵素を設計創出する上での重要な手がかりを与えると考えられる。

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 出 村 誠

学 位 論 文 題 名

Low-Temperature-Induced Changes in Human Lysozyme Elucidated by Multi-Dimensional NMR Spectroscopy

(多次元 NMR 法によるヒトリゾチームに与える低温効果に関する研究)

酵素の工業的な利用が盛んに行われるようになってから久しい。高温、界面活性剤存在下など一般的な酵素利用の条件から外れた条件下で利用しうる酵素は、目的の酵素以外の、通常の酵素の活性を抑えることができ利用価値が高い。低温で活性な酵素の場合にはさらに酵素が関係しない化学反応の反応速度をも抑制することができて、望まれない副反応を極力抑制できる点で利用価値がさらに高まることが期待できる。低温活性酵素は柔軟性に富む構造を有することが指摘されてきたが低温活性酵素の低温化でのふるまい、高活性維持のメカニズムに関する研究は少なかつた。申請者はタンパク質が低温環境下におかれた場合の特性の変化を知る目的でヒトリゾチームの4℃における水溶液中の構造と常温における構造との比較を、同種核および異種核多次元核磁気共鳴実験に基づいて行い、さらに低温における分子運動性をも検討した。

申請者はメタノール資化酵母(*Pichia pastoris*)を用いたヒトリゾチーム発現系を構築し、 ^{13}C , ^{15}N 二重標識ヒトリゾチームを得た。4℃および35℃で多次元 NMR 測定を行って両温度における主鎖原子 $^1\text{H}_\text{N}$, ^{15}N , $^{13}\text{C}_\alpha$, $^1\text{H}_\alpha$ および側鎖原子 C_β , H_β のほぼすべてを帰属した。35℃における化学シフトの値は既報のものと大部分はよい一致を示した。温度低下に伴って $^1\text{H}_\text{N}$ および ^{15}N の化学シフトは低磁場側に移動した。また、 $^1\text{H}_\alpha$, $^{13}\text{C}_\alpha$, $^{13}\text{C}_\beta$ も含めて化学シフトの移動度は各残基ごとで異なっていた。これらの事実から温度の低下に伴ってリゾチームの立体構造が変化することが示唆された。

申請者は各温度下における異種核および同種核多次元核磁気共鳴測定を行い、NOE による距離束縛条件および二面体角束縛条件をもとにそれぞれの溶液構造を決定した。各温度における立体構造の基本骨格は既報の X 線結晶構造解析の結果と大略同じであったが、温度低下によってヒトリゾチーム分子全体の体積および表面積は減少した。これを分子内空隙(cavity)の減少によるものとした。また、D-ヘリックス(Val¹¹⁰ ~ Cys¹¹⁶)が温度低下によって基質結合部位に向かって移動している。ヒトリゾチームの同部位は器質の結合・解離によって大きく変化することが知られているが、低温活性型リゾチームであるニジマスのリゾチームではその変化は小さい。申請者はこの変化に注目して低温活性の違いを論じている。35℃から 4℃へ冷却した場合のヒトリゾチームの溶液中の構造の変化は予想を上回るものであった。これがタンパク質の一般的な性質であるものか、あるいはリゾチームに特有のものであるかは今後の研究の成果を待たねばならない。この分野の発展が待たれる。

さらに各温度下において、主鎖アミドの ¹⁵N の緩和時間を測定して分子運動の解析を行っている。柔軟性の指標であるオーダーパラメーター S^2 の各温度における平均は 35℃(0.841)よりも 4℃(0.879)における方が高かった。これを分子内部の運動性が低温効果によって低下したものとしている。また、D-ヘリックスを構成する残基の R_{ex} (exchange contribution to line shape) の項が連続して観測された。これはこの領域の異方性(rotational diffusion anisotropy) の特異的变化によるものと推察している。

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。

以上のように申請者は、タンパク質の低温における立体構造の特性についていくつかの重要な知見を示し、今後の関連の研究に対しても大きな貢献をしたと言える。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。