

学 位 論 文 題 名

Studies on the Molten Globule State in Canine Milk Lysozyme:
Analysis of Volumetric Behavior and Folding Mechanism

(イヌミルクリゾチームのモルテングロビュール状態に関する研究：
体積挙動とフォールディング機構について)

学位論文内容の要旨

タンパク質が機能を発現するためには、特異的な立体構造に折り畳まれなければならない、その過程が自発的であることは Anfinsen によって示されている。多くの球状タンパク質は、その立体構造形成過程において部分的に折り畳まれた中間体を蓄積した後で、天然構造へと折り畳まれる。そのために、タンパク質の立体構造の形成機構を知る上で折り畳み中間体に関する知見を得ることは重要である。しかし、折り畳み反応は一般的に数 ms～数十 s で終了するために、中間体を詳細に調べることは困難である。近年、 α -ラクトアルブミンおよびカルシウム結合性リゾチームの一種であるイヌミルクリゾチームにおいて、立体構造の形成過程において蓄積する折り畳み中間体と、平衡論的な変性過程において蓄積する中間状態のモルテングロビュール(MG)状態が同一であることが示された (図 1)。

以下の 2 つからなる本研究では、カルシウム結合性タンパク質の α -ラクトアルブミン～リゾチームスーパーファミリーの MG 状態、その中でもイヌミルクリゾチーム (Canine Milk Lysozyme: CML) の MG 状態をモデルとして用いることにより、折り畳み反応の中間体の構造、物性および安定性に寄与する相互作用を明らかにし、タンパク質の立体構造の形成過程における中間体の意義およびタンパク質が自発的に折り畳まれるメカニズムについて議論することを目的とする。

第一章：CML の MG 状態における体積挙動：圧力変性における温度依存性の検討

一般にリゾチームの変性機構は Native (N)-Unfold (U) の 2 状態モデルで表されるが、CML とその相同タンパク質の α -ラクトアルブミン(LA)の場合は N-MG-U の 3 状態モデルで表され、変性過程において安定な MG 状態を取ることが知られている。MG 状態は速度論的研究による折り畳み反応の初期に見られる中間体と等価であることが明らかにされている。CML と LA では MG 状態の挙動は大きく異なり、示差走査熱量測定(DSC)において CML では協同的な熱転移が観測されるが、LA においては観測されないことが報告されている。これまで中間状態の挙動を観察するために温度、pH、尿素、グアニジン塩酸塩などによる変性実験が行われているが、圧力を利用した例は少ない。しかし、圧力を利用することによりタンパク質の体積挙動に関する情報を直接得ることが出来る。一般に、タンパク質は高圧にさらされると体積が減少するが、そのメカニズムは主に疎水性水和によって説明されている。疎水性水和に関する情報は、DSC により算出された熱容量変化 ΔC_p がこれまで利用されてきたので、 ΔC_p と体積変化 ΔV の間に何らかの相関が期待される。また、これらの

知見はタンパク質のフォールディングやダイナミクスを理解する上で重要な要素となり得る。

本研究は、CML の MG 状態をモデルとし、疎水性残基の水和と体積挙動を理解するために、変性における圧力の効果を得られる ΔV や断熱膨張率変化 $\Delta\alpha$ などの熱力学的パラメータにより、LA などの他の球状タンパク質と比較・検討することを目的とする。CML の MG 状態における体積挙動を観察するために、UV スペクトルを用いて追跡した。MG-U 転移を pH 2.0 の条件下で、温度変性曲線として常圧から 100 MPa の範囲で求めたところ、体積変化 ΔV は負の値を示し、20℃から 60℃の範囲で昇温につれてその値が小さくなる温度依存性が認められた。また、MG-U 転移における CML の体積挙動は相同タンパク質であるウシ α -ラクトアルブミン(BLA)とは異なる結果を示した。MG-U 転移における体積変化 ΔV は、25℃において CML では観察されたのに対し(-39.5 cm³/mol)、BLA では殆ど観察されなかった(0.9cm³/mol) (表 1)。過去の NMR 測定において、CML の MG 状態は BLA と比較した時に高い安定性を持ち、N 状態に近いことが報告されている。

本研究では、BLA が MG 状態において膨潤した疎水性のコアを保持するのに対して、CML の MG 状態は水分子が入り込めないタイトにパッキングされた疎水性のコアを持つことを明らかにした。2つの相同タンパク質の MG 状態における挙動の違いに対して新たな要素を与えた。

第二章：CML の MG 状態における non-native な α -ヘリックスの形成および安定性

CML の N および MG 状態を CD (円二色性) スペクトルを用いて調べた。MG 状態における波長 222 nm の負の楕円率の絶対値が N 状態より増加した。このことは、MG 状態での二次構造 (α -ヘリックス) の含量が N 状態より高まったことを示唆する。この結果は、LA や CML と同様にカルシウム結合を持つウマリゾチームについても過去に報告されている。しかしながら、これらのタンパク質の MG 状態のどこの部位に α -ヘリックスが形成されるのかは不明である。そこで、本研究では α -ラクトアルブミン〜リゾチームスーパーファミリーに対して2次構造予想プログラムである AGADIR を用いて計算を行った。N 状態では、3本目の β -Sheet を形成している領域に、MG 状態では helical propensity が全てのタンパク質において観測された。これより、CML の MG 状態において non-native な α -ヘリックスが形成されることが示唆された。このヘリックスの存在を実証するために、アミノ酸の 58 番目 (CML では3本目の β -Sheet 内に位置する) のグルタミンを、ヘリックスを壊すアミノ酸として知られるプロリンに変換した Q58P 変異体を作製した (図 2)。その結果、3本目の β -sheet 領域の周辺で MG 状態における helical propensity が著しく減少した。この変異体は MG 状態における波長 222 nm の負の楕円率の絶対値が野生型よりも減少し、non-native な α -ヘリックスがこの領域に形成される可能性が示唆された。また、MG-U 転移を塩酸グアニジン変性によって解析したところ、野生型と変異体で熱力学的な安定性と転移の協同性に大きな差は観測されなかった。このことは 3 本目の β -Sheet 領域周辺に形成される non-native な α -helix が近隣のアミノ酸残基間の非協同的な相互作用のみで形成され、MG 状態の安定性に寄与していないことを示唆している。今回作成した変異体は、誤った折り畳みが原因とされるアミロイド病の原因タンパク質であるヒトのリゾチームの突然変異部位とアミノ酸配列上近傍の位置にあるので、このヘリックスとアミロイド線維形成に何らかの相関があり、アミロイド線維に関する知見を得る大きな手がかりになることが期待される。

本研究では、折り畳みの過程で存在する non-native な α -ヘリックスの存在を CML において実験的に証明し、それが形成される場所を初めて特定出来た。また、その安定性のメカニズムも MG 状態を用いることにより解明出来たので、折り畳みのメカニズムに新たな知見を与えたと言える。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 新 田 勝 利
副 査 教 授 河 野 敬 一
副 査 助 教 授 渡 邊 信 久
副 査 助 教 授 出 村 誠

学 位 論 文 題 名

Studies on the Molten Globule State in Canine Milk Lysozyme: Analysis of Volumetric Behavior and Folding Mechanism

(イヌミルクリゾチームのモルテングロビュール状態に関する研究：
体積挙動とフォールディング機構について)

タンパク質が機能を発現するためには、特異的な立体構造に折り畳まれなければならない。その過程が自発的であることは Anfinsen によって示されている。多くの球状タンパク質は、その立体構造形成過程において部分的に折り畳まれた中間体を蓄積した後で、天然構造へと折り畳まれる。そのために、タンパク質の立体構造の形成機構を知る上で折り畳み中間体に関する知見を得ることは重要である。しかし、折り畳み反応は一般的に数 msec～数十 sec で終了するために、中間体を詳細に調べることは困難である。近年、 α -ラクトアルブミンおよびカルシウム結合性リゾチームの一種であるイヌミルクリゾチームにおいて、立体構造の形成過程において蓄積する折り畳み中間体と、平衡論的な変性過程において蓄積する中間状態のモルテングロビュール(MG)状態が同一であることが示された。

本論文では、カルシウム結合性タンパク質の α -ラクトアルブミン～イヌミルクリゾチーム(Canine Milk Lysozyme: CML)の MG 状態をモデルとして用いることにより、折り畳み反応の中間体の構造、物性および安定性に寄与する相互作用を明らかにし、タンパク質の立体構造の形成過程における中間体の意義およびタンパク質が自発的に折り畳まれるメカニズムについて議論することを目的とする。

第一章：CML の MG 状態における体積挙動：圧力変性における温度依存性の検討

CML の MG 状態における体積挙動を観察するために、UV スペクトルを用いて追跡した。MG-U 転移を pH 2.0 の条件下で、温度変性曲線として常圧から 100 MPa の範囲で求めたところ、体積変化 ΔV は負の値を示し、20℃から 60℃の範囲で昇温に

つれてその値が小さくなる温度依存性が認められた。また、MG-U 転移における CML の体積挙動は相同タンパク質であるウシ α -ラクトアルブミン(BLA)とは異なる結果を示した。MG-U 転移における体積変化 ΔV は、25°CにおいてCML では観察されたのに対し(-39.5 cm³/mol)、BLA では殆ど観察されなかった(0.9cm³/mol)。過去の NMR 測定において、CML の MG 状態は BLA と比較した時に高い安定性を持ち、N 状態に近いことが報告されている。

本研究では、BLA が MG 状態において膨潤した疎水性のコアを保持するのに対して、CML の MG 状態は水分子が入り込めないタイトにパッキングされた疎水性のコアを持つことを明らかにした。2 つの相同タンパク質の MG 状態における挙動の違いに対して新たな要素を与えた。

第二章：CML の MG 状態における non-native な α -ヘリックスの形成および安定性

CML の MG 状態を CD (円二色性) スペクトルを用いて調べた。MG 状態での二次構造 (α -ヘリックス) の含量が N 状態より高まった。この結果は、 α -ラクトアルブミンやウマリゾチームでも報告されている。しかし、MG 状態のどこの部位に α -ヘリックスが形成されるのかは不明である。そこで、2 次構造予想プログラムを用いて計算を行った。天然状態では 3 本目の β -Sheet を形成している領域に、MG 状態では non-native な α -ヘリックスが形成されることが示唆された。このヘリックスの存在を実証するために、遺伝子変異体を作製した。CD 測定より MG 状態における波長 222 nm の負の楕円率の絶対値が野生型よりも減少し、non-native な α -ヘリックスがこの領域に形成される可能性が示唆された。また、変性実験より、3 本目の β -Sheet 領域周辺に形成される non-native な α -helix が MG 状態の安定性に寄与していないことが分かった。

本研究では、折り畳みの過程で存在する α -ヘリックスの存在を CML において実験的に証明し、それが形成される場所を初めて特定できた。また、その安定性のメカニズムも MG 状態を用いることにより解明出来たので、折り畳みのメカニズムに新たな知見を与えたと言える。

これを要するに、著者は、タンパク質の折り畳み中間状態において圧力変性や折り畳み過程の新知見を得たものであり、折り畳み問題に対して貢献するところ大なるものがある。

よって著者は、北海道大学 (理学) の学位を授与される資格あるものと認める。