

# Mutational analysis of function of $\text{Ca}^{2+}$ -dependent type II antifreeze protein from Japanese smelt

(ワカサギ由来カルシウム依存性II型不凍タンパク質の  
変異導入による機能解析に関する研究)

## 学位論文内容の要旨

不凍タンパク質(AFP)は、過冷却状態の溶液中に生成する氷結晶の表面に特異的に結合してその結晶成長を抑制し、その結果、溶液の融点を変化させずに非束一的な凝固点降下を引き起こすユニークな機能を有する物質である。溶液の融点と凝固点の温度差を熱ヒステリシスと呼び、AFPの活性の指標として一般的に用いられている。AFPはこれまでに、寒冷環境下で棲息する魚類や昆虫等の多様な生物種の体液中から発見されており、アミノ酸配列の特性に基づいて数種類の型に分類される。その一種である魚類II型AFPは、カルシウム依存型レクチンの糖鎖結合ドメインと類似した立体構造を示し、機能発現のカルシウムイオン( $\text{Ca}^{2+}$ )に対する依存性の有無によって2種類の型に細分類される。II型AFPの中でカルシウム依存性を示すもの(AFP II)は、ニシン、キュウリウオ、そしてワカサギから発見されている。これらは約80%の配列相同性を示し、カルシウム依存型レクチンに見られる1個の $\text{Ca}^{2+}$ 結合部位が保存されている。これまでに、ニシン由来AFP IIのX線結晶構造解析及び部位特異的変異解析より、Thr96, Thr98と $\text{Ca}^{2+}$ 結合残基のAsp94, Glu99の4残基で氷結晶結合部位を構成していることが示唆され、これらの残基は既知のAFP II間で保存されている。Thr残基は、側鎖に疎水性のメチル基と親水性の水酸基を持ち、他の型のAFPでは氷結晶結合残基として寄与していることが知られている。例えば、I型カレイAFPでは $\alpha$ -ヘリックスの一方の面に並ぶThr残基のメチル基が氷結晶と疎水性相互作用やファンデルワールス相互作用を介して結合し、一方で、水酸基は氷結晶結合に重要ではないことが部位特異的変異解析により提唱されている。また、昆虫AFPでは2列の梯子状に並ぶThr残基のメチル基と水酸基両方が氷結晶の酸素原子の配列と空間的に適合するモデルが提唱されている。しかしながら、AFP IIではThr残基の側鎖のメチル基と水酸基が氷結晶結合に対してどのように寄与しているかはまだ詳しく解明されていない。

本研究では、AFP IIの氷結晶結合機能発現に対するThr96及びThr98の側鎖の水酸基及びメチル基の役割を明らかにすることを目的として、ワカサギAFPの組換えタンパク質発現系を構築し、Thr96及びThr98を個々にSer, Val, Alaに置換した単変異体を作製して、それらの $\text{Ca}^{2+}$ 結合特性及び熱ヒステリシス活性を測定して野生型のものと比較した。

まず、発現系構築を行う前に、魚体から精製した天然ワカサギAFPにはN型の糖鎖が付加していることを見出し、質量分析の結果による分子量がアミノ酸配列より計算される分子量よりも大きいのはこの糖鎖修飾のためであることが示された。このN型糖鎖修飾は同じAFP IIのキュウリウオAFPでも観察され、ワカサギAFPの場合も同様にN型糖鎖は氷結晶結合機能に関与しないと考えられる。

次に、ワカサギ AFP をコードする DNA を最適化したコドンを用いてアミノ酸配列に基づいて合成し、メタノール酵母を宿主とした発現系を構築した。組換えワカサギ AFP には、精製を容易にするために His タグを付加し、分子不均一化をもたらす天然体と異なる N 型糖鎖の付加を防ぐために Asn12 を Asp に置換して糖鎖修飾コンセンサス配列を削除した。高密度培養法によって組換え体を発現し、Ni アフィニティークロマトグラフィーとゲル濾過クロマトグラフィーを用いて精製した。天然体と組換え体の熱ヒステリシス活性を様々な  $\text{Ca}^{2+}$  濃度下及び様々なタンパク質濃度下で比較した。熱ヒステリシス活性測定は、温度コントローラー付きの低温顕微鏡を用いて、試料溶液中に生成される氷の単結晶の融点及び結晶成長が抑制される最低限界温度(凝固点)を測定することによって行った。糖鎖付加型の天然体と糖鎖非付加型の組換え体は同等の熱ヒステリシス活性を示すことが確認された。

構築した発現系を用いて、Thr96 及び Thr98 を個々に Ser, Val, Ala に置換した 6 個の変異体を作製した。機能発現に  $\text{Ca}^{2+}$  を必須とするワカサギ AFP の変異による  $\text{Ca}^{2+}$  結合能に対する影響を調べるために、野生型とそれぞれの変異体について  $\text{Ca}^{2+}$  結合部位近傍の Trp 残基をプローブとした蛍光測定を様々な  $\text{Ca}^{2+}$  濃度下で行い、 $\text{Ca}^{2+}$  結合定数を求めた。野生型及び T96S, T96V, T96A, T98S 変異体では  $\text{Ca}^{2+}$  結合定数が  $2\text{-}3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$  であったが、T98V, T98A 変異体では  $6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  とやや低下した。この  $\text{Ca}^{2+}$  結合親和性の低下の影響を考慮せずにアミノ酸変異の氷結晶結合機能に与える効果を議論できるように、野生型及び全ての変異体の熱ヒステリシス活性は過剰量の  $\text{Ca}^{2+}$  存在下で測定した。

タンパク質濃度 1 mM における熱ヒステリシス活性を野生型のものと比較した結果、T96S 変異体では野生型の 90% の活性を維持したが、T96V 変異体では 45%、T96A 変異体ではわずか 10% と著しい活性低下が観察された。また、T98S 変異体では、野生型と同等の活性を示したが、T98V 及び T98A 変異体では野生型の 20% まで活性が低下した。Thr96, Thr98 どちらの残基も、メチル基を欠くが Thr と同様に水酸基を持つ Ser に置換した場合は野生型と同程度の活性を維持し、水酸基を持たない Val や Ala に置換した場合は著しく活性が低下したことから、氷結晶結合部位に位置する 2 つの Thr 残基のメチル基よりも水酸基の方が AFP II の氷結晶結合に寄与し、Thr 残基の水酸基と氷結晶との水素結合が活性発現に不可欠であることが示唆された。この結果は、近年提唱されたニシン AFP の Thr96, Thr98 及び  $\text{Ca}^{2+}$  結合残基 Asp94, Glu99 が氷結晶表面の酸素原子と水素結合しているモデルを支持している。この AFP II の水素結合による氷結晶結合モデルは、疎水性相互作用やファンデルワールス相互作用が水素結合よりも重要であるというこれまでに他の型の AFP で提唱されてきた氷結晶結合モデルとは大きく異なる。例えば I 型カレイ AFP では、 $\alpha$ ヘリックス面に等間隔に並ぶ 4 残基全ての Thr を同時に Val に置換しても活性が完全に維持され、中央 2 残基のみの Thr を Ser に置換するとほとんど活性が失われることから、水酸基による水素結合ではなくメチル基による疎水性相互作用やファンデルワールス相互作用が氷結晶結合に重要であると考えられている。III 型 AFP や昆虫 AFP では、氷結晶結合面に位置する Thr 残基の水酸基は立体構造において分子表面に突出しておらず氷結晶と十分に水素結合ができないことが指摘されている。本研究で得られた結果より、AFP II の氷結晶結合残基である Thr96 及び Thr98 の水酸基が機能発現に対して重要であることが部位特異的変異による機能解析によって結論づけられた。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 出 村 誠  
副 査 教 授 河 野 敬 一  
副 査 教 授 佐々木 直 樹  
副 査 教 授 津 田 栄

学位論文題名

## Mutational analysis of function of $\text{Ca}^{2+}$ -dependent type II antifreeze protein from Japanese smelt

(ワカサギ由来カルシウム依存性II型不凍タンパク質の  
変異導入による機能解析に関する研究)

不凍タンパク質(AFP)は、過冷却状態の溶液中に生成する氷結晶の表面に特異的に結合してその結晶成長を抑制し、その結果、溶液の融点を変化させずに非束一的な凝固点降下を引き起こすユニークな機能を有する物質である。溶液の融点と凝固点の温度差を熱ヒステリシスと呼び、AFPの活性の指標として一般的に用いられている。AFPはこれまでに、寒冷環境下で棲息する魚類や昆虫等の多様な生物種の体液中から発見されており、アミノ酸配列の特性に基づいて数種類の型に分類される。その一種である魚類II型AFPは、カルシウム依存型レクチンの糖鎖結合ドメインと類似した立体構造を示し、機能発現のカルシウムイオン( $\text{Ca}^{2+}$ )に対する依存性の有無によって2種類の型に細分類される。II型AFPの中でカルシウム依存性を示すもの(AFP II)は、ニシン、キュウリウオ、そしてワカサギから発見されている。これらは約80%の配列相同性を示し、カルシウム依存型レクチンに見られる1個の $\text{Ca}^{2+}$ 結合部位が保存されている。これまでに、ニシン由来AFP IIのX線結晶構造解析及び部位特異的変異解析より、Thr96, Thr98と $\text{Ca}^{2+}$ 結合残基のAsp94, Glu99の4残基で氷結晶結合部位を構成していることが示唆され、これらの残基は既知のAFP II間で保存されている。Thr残基は、側鎖に疎水性のメチル基と親水性の水酸基を持ち、他の型のAFPでは氷結晶結合残基として寄与していることが知られている。例えば、I型カレイAFPでは $\alpha$ ヘリックスの一方の面に並ぶThr残基のメチル基が氷結晶と疎水性相互作用やファンデルワールス相互作用を介して結合し、一方で、水酸基は氷結晶結合に重要ではないことが部位特異的変異解析により提唱されている。また、昆虫AFPでは2列の梯子状に並ぶThr残基のメチル基と水酸基両方が氷結晶の酸素原子の配列と空間的に適合するモデルが提唱されている。しかしながら、AFP IIではThr残基の側鎖のメチル基と水酸基が氷結晶結合に対してどのように寄与しているかはまだ詳しく解明されていない。

本研究では、AFP IIの氷結晶結合機能発現に対するThr96及びThr98の側鎖の水酸基及びメチル基の役割を明らかにすることを目的として、ワカサギAFPの組換えタンパク質発現系を構築し、Thr96及びThr98を個々にSer, Val, Alaに置換した単変異体を作製して、それらの $\text{Ca}^{2+}$ 結合特性及び熱ヒステリシス活性を測定して野生型のものと比較した。

魚体から精製した天然ワカサギAFPにはN型の糖鎖が付加していることを質量分析、コンセンサス配列、酵素処理の結果から見出した。このN型糖鎖修飾は同じAFP IIのキュウリウ

オ AFP でも観察され、ワカサギ AFP の場合も同様に N 型糖鎖は氷結晶結合機能に関与しないと考えられる。

次に、ワカサギ AFP をコードする DNA を最適化したコドンを用いてアミノ酸配列に基づいて合成し、メタノール酵母を宿主とした発現系を構築した。組換えワカサギ AFP には、精製を容易にするために His タグを付加し、分子不均一化をもたらす天然体と異なる N 型糖鎖の付加を防ぐために Asn12 を Asp に置換して糖鎖修飾コンセンサス配列を削除した。高密度培養法によって組換え体を発現し、Ni アフィニティークロマトグラフィーとゲル濾過クロマトグラフィーを用いて精製した。天然体と組換え体の熱ヒステリシス活性を様々な  $\text{Ca}^{2+}$  濃度下及び様々なタンパク質濃度下で比較した。熱ヒステリシス活性測定は、温度コントローラー付きの低温顕微鏡を用いて、試料溶液中に生成される氷の単結晶の融点及び結晶成長が抑制される最低限界温度(凝固点)を測定することによって行った。糖鎖付加型の天然体と糖鎖非付加型の組換え体は同等の熱ヒステリシス活性を示すことが確認された。

構築した発現系を用いて、Thr96 及び Thr98 を個々に Ser, Val, Ala に置換した 6 個の変異体を作製した。機能発現に  $\text{Ca}^{2+}$  を必須とするワカサギ AFP の変異による  $\text{Ca}^{2+}$  結合能に対する影響を調べるために、野生型とそれぞれの変異体について  $\text{Ca}^{2+}$  結合部位近傍の Trp 残基をプローブとした蛍光測定を様々な  $\text{Ca}^{2+}$  濃度下で行い、 $\text{Ca}^{2+}$  結合定数を求めた。野生型及び T96S, T96V, T96A, T98S 変異体では  $\text{Ca}^{2+}$  結合定数が  $2.3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$  であったが、T98V, T98A 変異体では  $6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  とやや低下した。この  $\text{Ca}^{2+}$  結合親和性の低下の影響を考慮せずにアミノ酸変異の氷結晶結合機能に与える効果を議論できるように、野生型及び全ての変異体の熱ヒステリシス活性は過剰量の  $\text{Ca}^{2+}$  存在下で測定した。

タンパク質濃度 1 mM における熱ヒステリシス活性を野生型のものと比較した結果、T96S 変異体では野生型の 90% の活性を維持したが、T96V 変異体では 45%、T96A 変異体ではわずか 10% と著しい活性低下が観察された。また、T98S 変異体では、野生型と同等の活性を示したが、T98V 及び T98A 変異体では野生型の 20% まで活性が低下した。Thr96, Thr98 どちらの残基も、メチル基を欠くが Thr と同様に水酸基を持つ Ser に置換した場合は野生型と同程度の活性を維持し、水酸基を持たない Val や Ala に置換した場合は著しく活性が低下したことから、氷結晶結合部位に位置する 2 つの Thr 残基のメチル基よりも水酸基の方が AFP II の氷結晶結合に寄与し、Thr 残基の水酸基と氷結晶との水素結合が活性発現に不可欠であることが示唆された。この結果は、近年提唱されたニシン AFP の Thr96, Thr98 及び  $\text{Ca}^{2+}$  結合残基 Asp94, Glu99 が氷結晶表面の酸素原子と水素結合しているモデルを支持している。この AFP II の水素結合による氷結晶結合モデルは、疎水性相互作用やファンデルワールス相互作用が水素結合よりも重要であるというこれまでに他の型の AFP で提唱されてきた氷結晶結合モデルとは大きく異なる。例えば I 型カレイ AFP では、 $\alpha$ -ヘリックス面に等間隔に並ぶ 4 残基全ての Thr を同時に Val に置換しても活性が完全に維持され、中央 2 残基のみの Thr を Ser に置換するとほとんど活性が失われることから、水酸基による水素結合ではなくメチル基による疎水性相互作用やファンデルワールス相互作用が氷結晶結合に重要であると考えられている。III 型 AFP や昆虫 AFP では、氷結晶結合面に位置する Thr 残基の水酸基は立体構造において分子表面に突出しておらず氷結晶と十分に水素結合ができないことが指摘されている。本研究で得られた結果より、AFP II の氷結晶結合残基である Thr96 及び Thr98 の水酸基が機能発現に対して重要であることが結論づけられた。

これを要するに、著者は、カルシウム依存性 II 型不凍タンパク質について遺伝子工学の手法と熱ヒステリシス解析をもとに氷結晶成長の抑制に重要なアミノ酸残基の特定とその AFP 活性との関係を解明し、この成果は今後の不凍タンパク質の基礎と応用分野への貢献するところ大なるものがある。

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