

学 位 論 文 題 名

Folding regulation of globular protein leads to a novel biological function

(タンパク質のフォールディング制御と新機能発現)

学位論文内容の要旨

タンパク質は外部環境によって構造形成、構造変性を可逆的にひきおこす。このタンパク質のフォールディング反応は立体構造の形成と安定性、その機能を発現するために重要なプロセスである。フォールディング機構を解析することにより、新しい機能をもつ構造形成を制御・発現することが期待できる。本研究では、水溶性タンパク質である α ラクトアルブミンを例に、フォールディング中間体の形成機能を利用した新たなアポトーシス誘導因子調製法の開発とその構造学的な特性を解析することを目的とした。

α ラクトアルブミンは哺乳動物の乳清に含まれる主要タンパク質で、ラクトース合成酵素の補因子である。 α ラクトアルブミンは123残基からなる約14 kDaの球状蛋白質である。天然状態では、4本のジスルフィド結合とカルシウムの結合によって立体構造が安定化されている。変性過程において、二次構造を天然状態と同様に保持しているが、三次構造が消失したモルテングロビュール (MG) と呼ばれる中間体構造をとることが知られている。MGはその柔軟な性質から結晶化やNMRによる可視化が困難であり、様々な側面から解析がされているが、その構造や機能は未だに議論が続いている。

近年、ヒトミルク中に癌細胞を細胞死へと誘導する成分が含まれ、その正体が α ラクトアルブミンと不飽和脂肪酸であるオレイン酸との複合体であることが明らかにされた。この複合体は *In vitro* において、 α ラクトアルブミンと脂質を単純に混合しても形成が困難である。しかし、アポ α ラクトアルブミンと脂質を陰イオン交換樹脂上で接触させ、NaClで溶出した一部のフラクションが活性な複合体になることが報告されている。複合体の形成には天然 α ラクトアルブミンの三次構造を安定化させているカルシウムの除去が必要である。複合体はMGと似た柔軟性の高い構造を生理条件下で維持することから、 α ラクトアルブミンのカルシウム除去による三次構造の不安定化が複合体の形成及び細胞への活性に重要な役割を果たしていることが示唆された。また、ウシミルク中には細胞死活性物質が発見されなかったものの、*In vitro* では、形成効率は低いながらも同様の活性複合体を形成できることが示唆されていた。

本研究ではウシ α ラクトアルブミン (BLA) からの効率的な細胞死誘導物質の生産のために、ヒト α ラクトアルブミン (HLA) を対照に、新規の複合体形成方法を検討した。第一に、MGをとりうる構造安定性が活性な複合体の形成に関与しているのではないかと考えた。そこでBLAとHLAの溶液に対してオレイン酸を加え、最適な活性複合体をとりうる反応条件を、温度を変化させて検討した。反応産物は直ちにリンパ性白血病細胞 (L1210) に対する細胞死活性評価を行った。結果として α ラクトアルブミンが特にMGをとりうる50°Cから60°Cの熱処理複合体が0.1mg/ml以上の濃度で活性を示し、強い活性を得ることに成功した。一次元NMRの測定により、反応溶液のオレイン酸は α ラクトアルブミンと

ともにブロードなスペクトルを示し、一体化した複合体を形成していることが示唆された。HLA は BLA に比べて生産物の細胞活性が高く、この差は活性複合体の生成効率に起因すると考えられることから、BLA にはさらに複合体形成の余地があることが想定された。大腸菌に HLA 及び BLA の発現ベクターを組み込み、発現させた蛋白質は N 末端にメチオンが付加するため、天然状態の熱安定性が低下し MG 形成が促進されることが報告されていた。そこで、大腸菌大量培養による組み替え体 (Recombinant) RHLA 及び RBLA を発現・精製し、上記と同様に熱処理複合体の活性を評価した。RBLA は熱安定性の低下によって複合体の形成がより低い温度で可能になったが、依然、HLA に比べて活性が弱く、RHLA では熱安定性低下による効果は確認できなかった。

複合体を含むと考えられる熱処理蛋白溶液の CD スペクトルを測定した結果、熱処理蛋白質は二次構造を保つものの、生理条件下で三次構造が消失した状態を示した。HLA 複合体は三次構造が完全に消失し、BLA 複合体は三次構造の消失が不完全であった。しかしながら、BLA 溶液に対して予めオレイン酸をよく分散させた溶液を滴定してゆくと、熱処理の有無にかかわらず三次構造が完全に消失した複合体が形成されることが観察された。これは、オレイン酸の攪拌による分散効果が溶液の疎水的環境を変化させ、BLA の三次構造に影響を及ぼすことを示唆している。

そこで、オレイン酸の物理化学的な変性効果を均一にするため、オレイン酸を超音波プローブで十分に分散させた溶液を BLA 溶液に対して加える操作を行った。反応条件は、未処理混合及び熱処理に加え、熱処理と比較して二次構造の崩壊が少ない MG をとりうる酸処理 (pH2) を追加した。生産物の細胞死活性評価からは、未処理混合で弱い活性、熱処理及び酸処理で強い活性が得られ、特に酸処理では HLA 複合体に匹敵する活性が得られた。BLA の熱処理は三次構造の崩壊による MG 形成のみならず、同時に二次構造の協同的な変性が起こるため、HLA のような細胞活性をもつ複合体の形成が制限されるものと推測された。一方、酸処理では二次構造が安定に保持されるため、BLA から HLA 同様の活性をもつ複合体が形成できると考えられた。興味深いことに、未処理混合、熱処理、酸処理の複合体はそれぞれ活性に違いがあるものの、分光学的に不可分であることが明らかになった。即ち、CD や蛍光分光法の測定結果は、いずれの処理方法で得た複合体でも三次構造が完全に消失した MG 状態のスペクトルを示した。従来までの研究では、 α ラクトアルブミン-オレイン酸活性複合体は、単純な二状態の構造変化により形成されと考えられていたが、本研究結果は細胞死活性の獲得が分光学的な構造変化と等価ではないことを示している。さらに、活性複合体はリポソーム膜溶解能をもつが、興味深いことに、BLA 複合体と HLA 複合体では明らかに膜との相互作用が異なることが示唆された。

これらの複合体を陰イオン交換クロマトグラフィーによって分析した。複合体フラクションは陰イオン交換クロマトグラフィーにより分離することが示され、高濃度の塩が三次構造を安定化させ、逆に MG をとる複合体を不安定化させることが示唆された。一方、熱処理及び酸処理は高濃度の塩による不安定化を避けることができる。細胞活性の弱い未処理複合体は天然 α ラクトアルブミン同様に陰イオン交換カラムを素通りする成分が主であった。熱処理や酸処理はカラムに強く吸着する性質をもった活性な複合体を多く生成すると考えられる。

α ラクトアルブミンは構造変化を伴ってオレイン酸と結合し、安定な複合体を形成する。しかしながら、分光学的に同様の性質を示すカルシウムキレート、熱変性及び酸変性の MG 構造が、それぞれに異なる複合体形成能をもつことが明らかになった。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 出 村 誠
副 査 教 授 田 中 勲
副 査 教 授 西 村 紳一郎
副 査 准教授 相 沢 智 康 (理学院)

学 位 論 文 題 名

Folding regulation of globular protein leads to a novel biological function

(タンパク質のフォールディング制御と新機能発現)

タンパク質の立体構造は、生理的な条件で鍵と鍵穴のように原子座標の揺らぎが少ない部分やしなやかに運動して揺らいでいる部分がある。その立体構造は外部環境によって変化し、部分構造の揺らぎがタンパク質全体の折りたたみ方（フォールディング）にも影響する。このタンパク質のフォールディング反応は立体構造の形成と安定性、その機能を発現するために重要なプロセスである。フォールディング機構を解析することにより、新しい機能をもつ構造形成を制御・発現することが期待できる。

α ラクトアルブミンは哺乳動物の乳清に含まれる主要タンパク質で、ラクトース合成酵素の補因子である。 α ラクトアルブミンは 123 残基からなる約 14 kDa の球状タンパク質である。天然状態では、4 本のジスルフィド結合とカルシウムの結合によって立体構造が安定化されている。変性過程において、二次構造を天然状態と同様に保持しているが、三次構造が消失したモルテングロビュール (MG) と呼ばれる中間体構造をとることが知られている。MG はその柔軟な性質から、結晶化や NMR による可視化が困難であり、様々な側面から解析がされているが、その構造や機能との関係は未だに議論が続いている。本研究では、水溶性タンパク質である α ラクトアルブミンのフォールディング中間体の形成機能を利用した新たなアポトーシス誘導因子調製法の開発とその構造学的な特性を解析することを目的とした。

本研究ではウシ α ラクトアルブミン (BLA) からの効率的な細胞死誘導物質の生産のために、ヒト α ラクトアルブミン (HLA) を対照に、新規の脂肪酸複合体形成方法を検討した。第一に、MG をとりうる構造安定性が活性な複合体の形成に関与しているのではないかと考えた。そこで BLA と HLA の溶液に対してオレイン酸を加え、最適な活性複合体をとる反応条件を、温度を変化させて検討した。反応産物は直ちにリンパ性白血病細胞 (L1210) に対する細胞死活性評価を行った。結果として α ラクトアルブミンが特に MG をとりうる

50℃から 60℃の熱処理複合体が 0.1mg/ml 以上の濃度で活性を示し、強い活性を得ることに成功した。一次元 NMR の測定により、反応溶液のオレイン酸は α ラクトアルブミンとともにブロードなスペクトルを示し、一体化した複合体を形成していることが示唆された。HLA は BLA に比べて生産物の細胞活性が高く、この差は活性複合体の生成効率に起因すると考えられることから、BLA にはさらに複合体形成の余地があることが想定された。大腸菌大量培養による組み替え体 (Recombinant) RHLA 及び RBLA を発現・精製し、上記と同様に熱処理複合体の活性を評価した。大腸菌発現させたタンパク質は N 末端にメチオニンが付加するため、予想通り RBLA は熱安定性の低下によって複合体の形成がより低い温度で可能になった。

オレイン酸の物理化学的な変性効果を均一にするため、オレイン酸を超音波プローブで十分に分散させた溶液を BLA 溶液に対して加える操作を行った。反応条件は、未処理混合及び熱処理に加え、熱処理と比較して二次構造の崩壊が少ない MG をとりうる酸処理 (pH 2) を追加した。生産物の細胞死活性評価からは、未処理混合で弱い活性、熱処理及び酸処理で強い活性が得られ、特に酸処理では HLA 複合体に匹敵する活性が得られた。BLA の熱処理は三次構造の崩壊による MG 形成のみならず、同時に二次構造の協同的な変性が起こるため、HLA のような細胞活性をもつ複合体の形成が制限されるものと推測された。一方、酸処理では二次構造が安定に保持されるため、BLA から HLA 同様の活性をもつ複合体が形成できると考えられた。興味深いことに、未処理混合、熱処理、酸処理の複合体はそれぞれ活性に違いがあるものの、分光学的に不可分であることが明らかになった。即ち、CD や蛍光分光法の測定結果は、いずれの処理方法で得た複合体でも三次構造が完全に消失した MG 状態のスペクトルを示した。従来までの研究では、 α ラクトアルブミン-オレイン酸活性複合体は、単純な二状態の構造変化により形成され则认为されていたが、本研究結果は細胞死活性の獲得が分光学的な構造変化と等価ではないことを示すことができた。さらにこの結果は、複合体の陰イオン交換クロマトグラフィーによる分析からも支持され、最終的に BLA をモデルにした MG 形成とその新機能発現のためのフォールディング制御モデルを提案した。

これを要するに、著者は、ウシ α ラクトアルブミンの細胞死誘導因子の簡易製造法を確立し、タンパク質フォールディング制御に関する新知見を得たものであり、タンパク質科学分野の発展に対してきわめて高く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 (生命科学) の学位を授与される資格あるものと認める。