

論文内容の要旨

論文題目：Studies on the Folding of Canine Milk Lysozyme
(イヌ・ミルク・リゾチームのフォールディングの解析)

氏名 中尾 正治

蛋白質のフォールディングは DNA からの転写、翻訳を経て得られたアミノ酸の一時配列が生体内で「蛋白質」としての機能を持つ天然の特異的な三次元立体構造に変換される過程であり、遺伝情報発現の最終段階と考えることができる。従って、蛋白質がフォールディングするメカニズムを明らかにすることは生物物理学にとって非常に重要なテーマの一つである。

平衡条件下における変性剤によるアンフォールディング転移が様々な蛋白質で測定された結果、いくつかの蛋白質で転移の中間体が観測された。この中間体は主鎖二次構造が天然構造類似で分子形態はコンパクト、さらに分子内部の側鎖のタイトなパッキングが失われているという共通特徴があったので、この中間体のことは「モルテン・グロビュール状態」と呼ばれるようになった。さらに、このモルテン・グロビュール状態が、様々な蛋白質における巻き戻りの速度過程の初期に蓄積する中間体であることが、実験の結果から考

えられている。

イヌ・ミルク・リゾチームは 129 残基、分子量およそ 14,600 のカルシウム結合蛋白質である。X 線結晶構造解析により構造はすでに明らかになっており、二つのドメイン、 α ドメイン、 β ドメインから構成されている。 α ドメインは主に 4 本の α ヘリックスからなり、 β ドメインは一連のループ構造と 3 本の反平行 β ストランドで構成されている。この構造は同じ構造ファミリーに属する他のカルシウム非結合型のリゾチームや α ラクトアルブミンと相同である。

イヌ・ミルク・リゾチームの平衡条件における熱変性実験の結果から、このリゾチームは熱変性の過程において他のリゾチームや α ラクトアルブミンと比較して、より安定でかつより天然構造類似なモルテン・グロビュール中間体を形成することが知られている。一方、同じ構造ファミリーに含まれる他のリゾチームや α ラクトアルブミンについて、変性剤である塩酸グアニジンを用いた平衡状況下でのアンフォールド実験で観測されるモルテン・グロビュール中間体の構造と、アンフォールド状態からの巻き戻し実験で観測される中間体の構造が一致することも知られている。したがって、(1) 前述の熱変性実験で観測されたより天然条件に近いモルテン・グロビュール中間体が、塩酸グアニジンを用いた平衡条件下でのアンフォールド実験においても観測されるかどうか、また、(2) もし観測されるのならば、巻き戻し実験で観測されるであろう中間体と構造の面でどのような関係があるのかを調べることは、非常に興味深いことである。そこで、イヌ・ミルク・リゾチームを大腸菌から発現、巻き戻し、精製を行って、その平衡論的、および速度論的解析を円二色性 (CD) およびトリプトファン残基の側鎖の蛍光をプローブとして行った。

まず、イヌ・ミルク・リゾチームの平衡条件における構造の様子を調べた。CD スペクト

ルの結果から、このリゾチームは変性剤非存在下で二次構造や芳香族側差のパッキングが存在し、十分変性剤濃度が高くなると、それらの構造は失われることがわかった。また、トリプトファン残基の蛍光スペクトルを調べると、変性剤濃度を上げていくに従って、(1) 蛍光強度が減少する、(2) 蛍光強度最大の波長の値が増大し、同時に蛍光強度も増える、という2段階の変化を示すことがわかった。そこで、222 nm、295 nm の CD、370 nm 以上の蛍光強度、350 nm 付近の蛍光強度の4つをプローブとして、平衡条件下におけるイヌ・ミルク・リゾチームのアンフォールディング転移曲線を測定した。その結果、222 nm の CD、370 nm 以上の蛍光強度では、見た目上一つの転移しか観測されなかったが、295 nm の CD および 350 nm 付近の蛍光強度では、明らかに二つの転移が存在することがわかった。得られた4つの転移曲線を解析するために、3状態モデルを仮定して解析を行い、平衡条件下での変性状態に対する天然状態、中間体の自由エネルギー変化を見積もることが出来た。結果、イヌ・ミルク・リゾチームの中間体は、同じ溶液条件で測定したウマリゾチーム（カルシウム結合型）やウシの α ラクトアルブミンと比較して、非常に安定であることが明らかになった。

次に、イヌ・ミルク・リゾチームのフォールディング反応を、222 nm の CD と 350 nm 付近の蛍光強度をプローブとして測定した。反応はストップフロー装置を用いて、塩酸グアニジン濃度を 7 M から 0.61 M にジャンプさせて反応を開始させた。結果、装置の不感時間内に形成されるバーストフェーズ中間体とは別に CD 値のオーバーシュートを生じさせる別の中間体の存在することがわかった。これは、バーストフェーズ中間体のみしか観測されないウマリゾチームや α ラクトアルブミンでは見られなかった現象である。それぞれの反応曲線における各相の強度の割合を比較してみると、CD で全変化のおよそ 10% の強度でオーバーシュートを生じさせる相においては、蛍光強度の変化が 1% 未満であることがわかった。従って、この相においては二次構造の再構成が行われていることが示唆される。

観測された二つの中間体をより特徴づけるために、フォールディング反応を、CDをプローブとして 215 nm から 240 nm まで 10 個の波長で測定を行った。得られた 10 個の反応曲線を同時に解析することにより、反応の二つの速度定数 $k_1 = 21.8 \pm 1.5 \text{ (s}^{-1}\text{)}$ 、 $k_2 = 0.531 \pm 0.011 \text{ (s}^{-1}\text{)}$ と、バーストフェーズ中間体およびその後形成される中間体の CD スペクトルを得ることが出来た。平衡条件における中間体の真の CD スペクトルを、天然状態、中間体がもっとも蓄積する濃度 (3.85 M)、および変性状態のスペクトル、さらに各状態の割合から計算してみると、その形はバーストフェーズ中間体のスペクトルと類似性が高いことがわかった。さらにその結果を確認するために、変性状態から平衡条件での中間体に巻き戻る反応を測定した。すると、装置の不感時間内にシグナルの変化が完了していた。以上から平衡条件での中間体は、巻き戻りの速度過程におけるバーストフェーズ中間体と同一であることがわかった。

得られた速度過程における各中間体のスペクトルから、バーストフェーズ中間体から速度過程での中間体への相、および速度過程での中間体から天然状態への相のそれぞれにおける差スペクトルを得ることが出来た。前者の相においては、二次構造成分の増加とチロシン残基やトリプトファン残基の側鎖の周りの環境が非対称になっていく過程であることがわかった。一方後者の相の差スペクトルを見ると、225 nm と 227.5 nm の中間を境に強度の符号が入れ替わるスペクトルが得られた。これは芳香族側鎖が接近することによって生じるエキシトンカップリングが起こっていることが示唆される。X線結晶構造解析で得られたイヌ・ミルク・リゾチームの構造を見てみると、28 番と 108 番のトリプトファン残基の側鎖、および、63 番と 64 番のトリプトファン残基の側鎖が互いに接近していることがわかる。以上のことから、速度過程での中間体から天然状態への相は、これらのトリプトファン残基のパッキングが起こっていると推測される。