

論文内容の要旨

論文題目:ヤギ α ラクトアルブミンの安定性とフォールディングに及ぼすN末端アミノ酸残基の影響

(The effect of the N-terminal amino-acid residue on stability and folding of goat α -lactalbumin)

氏名 友 寄 克 亮

蛋白質のフォールディングはDNAから転写、翻訳を経て得られたアミノ酸の一次配列が生体内で「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、蛋白質フォールディングメカニズムを明らかにすることは生物物理学の重要なテーマである。

α ラクトアルブミンは123残基、分子量およそ1,4000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、二つのドメインすなわち α ドメインと 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。

本研究では、ヤギ α ラクトアルブミンのN末端残基がその熱力学的安定性やフォールディングとアンフォールディングの速度過程にどのような影響を及ぼすかを定量的に調べることを第一の目的とする。

本研究では上記目的を達成するため以下の三種類の蛋白質を用いた。(1) 新鮮なヤギ乳から抽出精製した真性体ヤギ α ラクトアルブミン、(2) 大腸菌による組換え体(N末端に余分なメチオニン残基(Met)が付加してN末端の位置が一残基分ずれている)、(3) $\Delta E1$ 変異体(N末端がMetだがN末端の位置は真性体と同じ)。

大腸菌を用いて発現させた組み換えヤギ α ラクトアルブミンの天然状態の安

定性は、真性体と比べて著しく不安定化することが、塩酸グアニジンを用いた平衡条件下でのアンフォールディング実験で明らかになっている。一方、この組み換え体の N 末端のグルタミン酸 (Glu) を遺伝子工学的に除去した組換え体 $\Delta E1$ 変異体は安定性が回復することが知られている。これらの事実から真性体や $\Delta E1$ 変異体と N 末端に余分な Met が付加した組み換え体との間における安定性の違いと、Met や Glu の有無を利用し、ヤギ α ラクトアルブミンのフォールディングに及ぼす N 末端の影響を調べることができる。これら三種類の蛋白質の塩酸グアニジンによるアンフォールディング転移の平衡論的解析、アンフォールディング反応とフォールディング反応の速度論的解析を行った。また、N 末端残基の違いが、 Ca^{2+} 結合に及ぼす影響を調べるため、 Ca^{2+} 存在下 (ホロ型) および Ca^{2+} 非存在下 (アポ型) で同様の解析を行った。逆に、ホロ型とアポ型それぞれの N 末端の構造組織化度を調べることにより、フォールディングにおいて Ca^{2+} 存在 / 非存在が N 末端領域の構造形成に与える影響も調べた。

上記平衡条件下における解析の結果、大腸菌由来の組み換え体は、真性体に比べて天然状態が不安定化し、 $\Delta E1$ 変異体は真性体に比べて天然状態の安定性が回復することを確認した。ホロ型の見かけの転移中点における塩酸グアニジン濃度は、三つの蛋白質 (1)、(2)、(3) それぞれ約 3.2 M、2.6 M、3.3 M であった。一方、アポ型の見かけの転移中点における塩酸グアニジン濃度は、三つの蛋白質 (1)、(2)、(3) それぞれ、約 1.6 M、1.1 M、1.7 M であった。 $\Delta E1$ 変異体の安定性の回復により、 $\Delta E1$ 変異体の天然状態の安定性は、真性体と酷似していることが分かった。また、見かけの速度定数 (対数) の塩酸グアニジン依存性 (シェブロンプロット) 測定の結果、大腸菌由来の組み換え体の速度論的描像に比べて $\Delta E1$ 変異体は、より真性体に近いことが分かった。このことより $\Delta E1$ 変異体は、蛋白質工学の手法を用いて α ラクトアルブミンのフォールディング機構を研究する上で、良い擬野性型蛋白質となることも分かった。

上記三種類の塩酸グアニジンによるフォールディングおよびアンフォールディングのストップフロー円二色性 (CD) による速度論的な解析結果から、N 末端残基の違いによらず、フォールディング反応で約 65%、アンフォールディング反応では、25%-35% のバースト相 (ストップフロー CD 装置の不感時間 (25 msec) 内に起こる実質的な CD 変化) が観測された。またフォールディング反応のバースト相とアンフォールディング反応のバースト相のいずれにおいてもこれらの変化量の塩酸グアニジン依存性には協同性が観測された。これまでの研究では、フォールディング反応のバースト相の存在はすでに明らかになっており、これは、フォールディングの初期中間体によってもたらされており、平衡条件下の中間状態と一致することが知られている。一方、アンフォールディングのバースト相はこれまで明らかにされていなかった。このアンフォールデ

イングのバースト相変化量の塩酸グアニジン濃度依存性の結果から、N 末端残基の違いによらず、ホロ型は塩酸グアニジン濃度 3 -4 M、アポ型では塩酸グアニジン濃度 2 -3 M において転移が観測された。また、シェブロンプロットの転移領域から変性領域にかけて、見かけの速度定数（対数）の塩酸グアニジン濃度に対する線形性依存性からのずれ（ロールオーバー）が観測された。これらの結果から、変性状態（U）、フォールディング初期中間体（I_B）、アンフォールディング中間体（I_N）、天然状態（N）の逐次的四状態モデルを仮定した熱力学的安定性の解析を行った。

N 末端残基の違いが、Ca²⁺結合にどのような影響を与えるかを調べるために、三つの蛋白質のホロ型とアポ型の測定結果を用いて、Ca²⁺結合部位の構造組織化度（ ϕ 値解析の評価）を評価した。その結果、各状態と遷移状態（‡）における ϕ 値は、真性体では、 $\phi_{I_B}=0.12$ 、 $\phi_{‡}=0.42$ 、 $\phi_{I_N}=0.64$ 、大腸菌由来の組み換え体では、 $\phi_{I_B}=0.17$ 、 $\phi_{‡}=0.51$ 、 $\phi_{I_N}=0.79$ 、 $\Delta E1$ 変異体では、 $\phi_{I_B}=0.20$ 、 $\phi_{‡}=0.47$ 、 $\phi_{I_N}=0.68$ となった。また各状態における Ca²⁺結合定数（K）を評価した結果、真性体では、 $K_{I_B}=1.9\times 10^3 M^{-1}$ 、 $K_{‡}=4.1\times 10^4 M^{-1}$ 、 $K_{I_N}=2.9\times 10^5 M^{-1}$ 、 $K_N=6.7\times 10^6 M^{-1}$ 、大腸菌由来の組み換え体では、 $K_{I_B}=1.6\times 10^3 M^{-1}$ 、 $K_{‡}=1.8\times 10^4 M^{-1}$ 、 $K_{I_N}=9.6\times 10^4 M^{-1}$ 、 $K_N=3.3\times 10^5 M^{-1}$ 、 $\Delta E1$ 変異体では、 $K_{I_B}=5.8\times 10^3 M^{-1}$ 、 $K_{‡}=9.5\times 10^4 M^{-1}$ 、 $K_{I_N}=7.7\times 10^5 M^{-1}$ 、 $K_N=1.7\times 10^7 M^{-1}$ となった。これらの結果より、ヤギ α ラクトアルブミンの Ca²⁺結合部位の構造は、N 末端残基の違いによらず I_B、‡、I_N、N の順に構造組織化してゆくことが分かった。

ヤギ α ラクトアルブミンのフォールディングの各状態における N 末端の構造組織化を調べるために、N 末端の ϕ 値解析を行った。その結果、ホロ型では $\phi_{I_B}=-0.09$ 、 $\phi_{‡}=-0.14$ 、 $\phi_{I_N}=0.34$ となり、アポ型では $\phi_{I_B}=0.25$ 、 $\phi_{‡}=0.22$ 、 $\phi_{I_N}=0.76$ となった。これらの結果は、N 末端部位の構造形成安定化は、フォールディングの最終段階で起こることを示している。また、アポ型の N 末端部位の各状態における安定化エネルギーレベルが、ホロ型に比べて高くなっており、ホロ型とアポ型の構造形成安定化の開始部位が異なることが分かった。

以上の結果から以下の結論に至った。

- (1) 三つの蛋白質のアンフォールディングのストップフローCD による解析から、N 末端残基の違いによらずアンフォールディングのバースト相が存在し、それは、アンフォールディングの初期中間体（I_N）によってもたらされていることが初めて明らかになった。
- (2) Ca²⁺結合部位の ϕ 値解析および Ca²⁺結合定数の評価を行った結果、N 末端残基によらず、ヤギ α ラクトアルブミンのフォールディングは、フォールディング中間体（I_B）とアンフォールディング中間体（I_N）の間に存在す

る遷移状態 (‡) によって律速されるとする逐次的四状態モデルに従うことが分かった。

(3) N 末端部位の ϕ 値解析の結果から、アポ型の N 末端部位の各状態の安定化エネルギーレベルが、ホロ型に比べて高くなっており、ホロ型とアポ型の構造形成安定化の開始部位が異なることが分かった。

(4) 本研究で採用した、大腸菌由来の組み換え体の N 末端から 2 番目の Glu を遺伝子工学的に除去した組換え体 $\Delta E1$ 変異体は安定性が回復し、その安定性および速度論的描像は真性体と酷似している。したがって、 $\Delta E1$ 変異体は良い擬似野生型蛋白質となり得ることが分かった。