

論文内容の要旨

論文題目 : Equilibrium and kinetics of the folding and unfolding of canine milk lysozyme

(イヌ・ミルク・リゾチームのフォールディングとアンフォ
ールディングの平衡論と速度論)

氏名 仲谷 博安

蛋白質フォールディングの分子機構解明は、生物物理化学における未解明の重要な課題である。一般に、100 残基以上よりなる球状蛋白質では、モルテン・グロビュール (MG) 状態として知られる中間構造状態が、ほどけた (U) 状態から天然 (N) 状態への巻き戻り反応初期に蓄積される。このようなフォールディング中間体を検出し、特徴付けることがフォールディング機構の実験的研究の主要なアプローチである。

イヌ・ミルク・リゾチームは 129 残基、分子量約 14500 の Ca^{2+} 結合蛋白質であり、 α -ラクトアルブミン/リゾチームファミリーに属している。立体構造は X 線結晶解析により判明しており、 α -ヘリックスに富む α ドメインと β シートに富む β ドメインが深いクレフトで分断された構造を取っている。

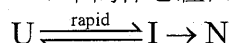
イヌ・ミルク・リゾチームの MG 状態は、現在まで知られている MG 状態の中で最も安定であり、熱変性およびグアニジン塩酸塩 (GdnHCl) 変性実験で安定に蓄積する。また、他の多くの蛋白質の MG 状態と異なり、その分子構造中一部に天然構造類似の特異的側鎖三次構造を有する。すなわち、この蛋白質の MG 状態は最も安定で最も N 状態に近い MG 状態として知られている。

本研究の第一の目的は、イヌ・ミルク・リゾチームの MG 状態がそのフォールディング反応においてどのような役割を果たすかを明らかにすることである。さらに、 Ca^{2+} がフォールディング反応へどのような影響を及ぼすかについても検討を加えた。これらの目的を達成するために、ホロ型 (10 mM CaCl_2 存在下) とアポ型 (EGTA 2 mM 存在下) 蛋白質の GdnHCl によるアンフォールディング反応の平衡論的 (熱力学的) 解析とリフォールディング/アンフォールディング反応の速度論的解析を行った。

大腸菌系で発現させた蛋白質には多くの場合 N 末端に余分のメチオニン残基が付加することが知られている。このメチオニン残基は平衡論や速度論に大きな影響を与えることが同一ファミリー中の蛋白質で知られている。このため本研究ではメチオニンの付加がないメタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* を発現系として用いた。酵母系を用いたときに起こる糖鎖付加を防ぐため、糖鎖付加配列中の 49 番残基をアスパラギンからアスパラギン酸に置換した変異体を作成して試料として用いた。

近紫外、遠紫外領域の CD (円二色性、波長 ; 222, 230, 295 nm) および 350 nm 付近の蛍光をプローブとして、ホロ型およびアポ型の平衡論的アンフォールディングを測定した。ホロ型のアンフォールディング転移は、見かけ上プローブによらず同一の転移領域で起こり、N 状態と U 状態とが蓄積する二状態モデルを用いて解析を行った。一方、アポ型では、近紫外 CD 及び蛍光で観測したアンフォールディング曲線に、二段階の転移が観測された。このためアポ型のアンフォールディング転移の解析では、N 状態、U 状態及び MG 状態の蓄積を仮定する三状態モデルを用いた解析結果は、実験結果とよく一致した。 m_{NU} 値は溶媒接触表面積に関係し、ホロ型とアポ型で一致すると予測されるが、得られた m_{NU} の値は、ホロ型の値が $1\text{kcalmol}^{-1}\text{M}^{-1}$ だけ小さい結果が得られた。

次にホロ型及びアポ型のリフォールディング反応をストップフロー CD 法を用いて測定した。リフォールディング反応は、GdnHCl の濃度ジャンプによって開始した。両方の型の蛋白質とも、リフォールディング反応は一つの指数関数で表された。また、両方の型で、反応曲線を時間ゼロに外挿した CD 値と平衡測定の結果から予測される U 状態の CD 値との間に大きな差 (バースト相) が観測された。これは装置の不感時間 (25 ms) 内に、バースト相中間体 (I_B) が蓄積することを意味している。また、GdnHCl による I_B の転移曲線はホロ型とアポ型で一致した。この結果は、 I_B は Ca^{2+} と結合しないことを示す。また二状態モデルで解析した I_B と U 状態との自由エネルギー差はアポ型の MG 状態と U 状態との自由エネルギー差と一致し、 m 値も一致した。このことは I_B がアポ型の MG 状態と同一であることを示している。ホロ型とアポ型ではリフォールディングの機構は共通であり、MG 状態と同一の中間体を経由する次のようなスキームで表されると考えられる。



スキーム 1

m_{NU} 値の不一致の原因を明らかにするため、ホロ蛋白質にも中間体を仮定し、そのパラメ

ータとして I_B の値を用いて三状態で解析した。その結果得られた m_{NU} の値はホロ型とアポ型でほぼ一致した。このことはホロ型にも MG 中間体が存在するが、蓄積量が小さいため検出が困難であることを示している。X 線結晶構造を観察すると、この蛋白質では α ドメインと β ドメインの間にある深いクレフトによって両ドメインが分断されており、それぞれが独立してアンフォールドするためにホロ型およびアポ型で三状態的な挙動を示すと考えられる。

ホロおよびアポ型のアンフォールディング反応をストップフローCD 法およびストップフロー蛍光法を用いて測定した。アンフォールディング反応は、GdnHCl 濃度ジャンプにより開始した。アンフォールディング反応ではホロ型とアポ型で明らかな相違が観測された。ホロ型のアンフォールディング反応は、一つの指数関数で表され、バースト相も見られなかった。これらの結果は、ホロ型のアンフォールディングは次のスキームによって表されることを示している。

$N \rightarrow U$

スキーム 2

これに対して、アポ型のアンフォールディング反応では、バースト相と単一指数関数的な反応曲線が観測された。また、アンフォールディング反応の速度定数に、GdnHCl 濃度依存性が殆ど認められなかった。フォールディングおよびアンフォールディング反応の速度定数の GdnHCl 濃度依存性は反応前後での蛋白質の溶媒接触表面積の変化に関係し、多くのアンフォールディング反応では GdnHCl 濃度依存性が観測される。従って、本実験の結果は、観測されている速度定数がアンフォールディング反応に由来するものではないことを示唆する。さらにバースト相での変化量と指数関数相の変化量の比が GdnHCl 濃度に関係なくほぼ一定であったことから、天然状態が不均一である次のようなスキームが一つの候補としてあげられる。

$N_s \rightleftharpoons N_f \rightarrow U$

スキーム 3

ここで N_s , N_f はどちらも天然状態であり、 N_f のみが直接アンフォールディングすることができ、アンフォールディングは不感時間内に起こる。しかし、上記の結果のみでは、不感時間内に蓄積するアンフォールディング中間体 X の存在を仮定する以下のようなスキームも否定できない。

$N \rightarrow X \rightarrow U$

スキーム 4

アポ型において天然状態が不均一であることを確認するため、ストップフロー蛍光装置を用いたダブルジャンプ実験を行った。最初に GdnHCl 濃度を 0 M から 6.6 M へジャンプして一定時間アンフォールディングさせたあと 1.0 M にジャンプして巻き戻した結果を観測した。アンフォールディング時間を変化させた時、全ての反応曲線は一つの指数関数で表され、その速度定数はアンフォールディング時間によらず不変であり、この速度定数はリフォールディング反応の速度定数 (2.6 s^{-1}) と一致した。また指数関数相の変化量のアンフォールディング時間依存性を調べると、これは 6.6 M GdnHCl におけるアンフォールディング速度定数の値 (1.6 s^{-1}) とアンフォールディングのスキーム 3 から予測される値とよく一致した。これはアポ型の天然状態の不均一性を示唆している。

ホロ蛋白質について平衡論測定の m_{IU} 、 m_{NU} 値および速度定数の変性剤濃度依存性から求められる遷移状態の m 値を用いて中間体および遷移状態での構造形成度を求めたところ、遷移状態での構造形成度はファミリー蛋白質で最も大きいことが判明した。さらに構造形成度は中間体から遷移状態にかけて大きくなり、これは U 状態から MG 状態、遷移状態そして N 状態の順に構造形成が進むことを示しており、スキーム 1 を強く支持する。

アポ型とホロ型で、リフォールディング反応の速度定数は、GdnHCl 濃度によらず殆ど変わらず、アンフォールディング速度は大きく異なった。この結果を定量的に解釈するため、 Ca^{2+} 結合部位の Φ 値を求めたところ、-0.15 となった。このことは、フォールディング反応の遷移状態では Ca^{2+} 結合部位の構造が形成されていないことを示している。イヌ・ミルク・リゾチームと配列の相同性があるウシ α -ラクトアルブミンでは、 Φ 値は 0.76 であり、遷移状態において Ca^{2+} 結合部位は構造形成していると考えられる。これらの結果は、同じファミリーに属する相同な蛋白質間でフォールディングの過程が異なることを示している。

以上の結果から、以下の結論が得られる。(1) イヌ・ミルク・リゾチームは、ホロ型でもアポ型でも MG 状態の蓄積を伴う三状態的な平衡論的アンフォールディング転移を示す。(2) リフォールディング反応で、ホロ型でもアポ型でもバースト相中間体が観測された。平衡条件下で観測された MG 状態の熱力学的特徴と比較することにより、この速度論的中间体は MG 状態と一致することが分かった。従って、ホロ型とアポ型は MG 状態を経由する共通の機構でフォールディングすると結論される。(3) Ca^{2+} 結合部位の形成は、中間体と天然状態の間の遷移状態では形成されていないことが判明した。このことは同一ファミリー内の蛋白質間でも構造形成の過程が異なっていることを示唆している。(4) ホロ型では天然状態が均一であるが、アポ型では天然状態が不均一であることも判明した。これは α -ラクトアルブミン/リゾチームファミリーでは初めて観測された事実である。