

## Studies on the Structural Stability of C-type Lysozyme

(C型リゾチームの構造安定性に関する研究)

## 学位論文内容の要旨

溶菌酵素として知られるC型リゾチームは、球状タンパク質あるいは酵素を代表するモデル試料として、例えばX線結晶学、酵素学、免疫学、分子進化学など、タンパク質研究のあらゆる場面において用いられてきた。生体内では主に細菌の感染に対する防御の役割を担う酵素であると考えられている。リゾチームが細菌の細胞壁を構成するN-アセチルグルコサミンとN-アセチルムラミン酸のグリコシド結合を切断すると、細胞壁が壊れ細菌が溶菌する。脊椎動物や昆虫を中心に、多くの後生動物から見つかったが、その中には独特の構造的または機能的特徴を持つリゾチームもいくつか報告されている。

## 1. Spontaneous Asparaginyl Deamidation of Canine Milk Lysozyme under Mild Conditions.

(温和な条件におけるイヌミルクリゾチームの自発的なアスパラギン脱アミド化反応について)

イヌミルクリゾチーム(canine milk lysozyme, CML)は主にタンパク質フォールディングの研究において注目されているタンパク質である。ニワトリ卵白リゾチームに代表される従来のC型リゾチームは、一般的な実験条件下では天然状態と変性状態を含む二状態転移を示す。一方で近縁タンパク質の $\alpha$ ラクトアルブミンは、天然状態ともランダムコイル様の変性状態とも異なる、部分的に変性した構造状態を含めた三状態間での平衡状態を示す。この部分変性状態はモルテングロビュール(MG)状態と呼ばれている。CMLやウマミルクリゾチームは、リゾチームでありながら $\alpha$ ラクトアルブミンと同様にMG状態を含めた三状態転移を示すことが知られていた。さらに、円二色性(CD)測定や示差走査熱量測定(DSC)等の結果によると、CMLのMG状態は $\alpha$ ラクトアルブミンよりも熱安定性が高く、より協同的に変性する事などが分かってきた。 $\alpha$ ラクトアルブミンやCMLのMG状態はフォールディング中間体と類似していると考えられるため、フォールディング研究において重要な手掛かりを与え得る。ただし実験に用いるCML試料は、溶液中で容易に不均一化を生じるという問題点を抱えていた。本研究では、CMLのフォールディング研究への利用に先立ち、この不均一化の問題を解消する事を試みている。

不均一化の原因として最も可能性が高かったのが、Asn残基の脱アミド化反応であった。ポリペプチド鎖中のAsn残基は、条件によって、自発的にAspあるいはisoAsp(イソアスパラギン酸)残基に変換する事がある。中性から塩基性の溶液条件で生じやすく、温度や溶液組成などの影響も受ける。Asn残基のC末端側に隣接するアミノ酸残基の種類や、Asn残基周辺の立体構造形成によって、反応性が大きく変わる事も過去に報告されている。負電荷が増加する反応であるため、構造や機能に影響を及ぼし得る。CMLの自発的不均一化についての特徴は、過去の文献に見られる脱アミド化反応の特徴とよく一致していた。

Gln残基はAsn残基と構造が類似しているものの、脱アミド化を生じにくい。そこで、Asn残基からGln残基への変異を導入する事で、不均一化の原因が脱アミド化反応である事の確認と、反応性を持つAsn残基の特定を図った。特定のAsn残基の置換によって実

際に不均一化が抑えられたため、Asn 残基が原因である事が確認された。反応性の pH 依存性や質量分析の結果と併せると、脱アミド化が不均一化の原因である可能性は非常に高い。複数の Asn→Gln 変異体を作製した結果、Asn 44, 47, 49, 68 が反応しやすい事を明らかにした。反応性が高い Asn 残基は、ループあるいは  $\beta$  シート上に位置し、X線結晶構造における温度因子が比較的高い等、構造の揺らぎが大きいと考えられる領域に存在していた。pH 6~8, 30°C という温和な溶液条件において脱アミド化反応が検出された事から、生体内でも反応が生じ得ると考えられる。

その後、脱アミド化反応をほとんど生じない変異体として N44/47/49/68/103Q (5NQ) を作製した。5NQ は pH 8.0, 30°C の溶液条件において、脱アミド化反応をほとんど起こさなかった。CD 測定や X線結晶構造解析から、この変異体が野生型と同様の天然状態および MG 状態を形成する事が確認された。この変異体を用いることで、より幅広い溶液条件で、より詳細に CML を用いた解析実験を行なう事が可能になった。

## 2. X-ray Crystallography and Structural Stability of Digestive Lysozyme from Cow Stomach.

(ウシの胃で発現する消化用リゾチームの X線結晶構造と構造安定性について)

ある種の動物は、リゾチームを消化酵素として利用していると考えられている。例えば多くの偶蹄類や葉食性のサルなどは、摂取したセルロースを栄養分として利用するために、前腸で発酵を行なう。発酵で増殖した細菌を、胃でリゾチームを用いて分解し、栄養を得ていると考えられる。消化用のリゾチームは、偶蹄類、サル、ツメバケイ、イエバエ等の動物がそれぞれ独自に獲得している。しかし種間で共通する特徴が見られるため、これは分子レベルでの収斂（あるいは平行）進化であるといえる。消化用リゾチームに共通して見られる主な特徴として、活性の至適 pH が酸性側に寄っている事、プロテアーゼ（ペプシンなど）に耐性を持つ事などが挙げられる。これらは消化管内の環境に対する適応の結果であると考えられるのだが、その分子レベルでのメカニズムについては、あまりよく分かっていない。

本研究では、酵母を用いてウシ胃リゾチーム 2 (BSL2) の組換え体を作製し、構造解析や熱力学的解析、活性測定などの生化学的な実験、そしてそれらの関連性についての議論を試みている。比較対象とする非消化リゾチームには、ニワトリ卵白リゾチーム (HEWL) を用いた。得られた X線結晶構造によると、BSL2 は典型的な C 型リゾチームの立体構造を形成していた。グアニジン変性実験や DSC 測定から、BSL2 は HEWL よりも高い熱安定性を持つ事が明らかになった。核磁気共鳴 (NMR) を用いた重水素交換実験からは、BSL2 が HEWL よりも全体にわたって堅固な構造を取っている可能性が示唆された。主鎖構造の安定性や柔軟性は、プロテアーゼによる切断の受けやすさと関連していると考えられている。したがって消化リゾチームのプロテアーゼ耐性は、立体構造の堅固さに由来するのではないかと推測できる。

また、結晶構造を見ると BSL2 の表面には負電荷に富む領域が存在する。しかし HEWL は全体的に正電荷に覆われており、分子内の電荷の反発が大きいと考えられる。細菌と相互作用するタンパク質は、負に帯電した領域を持つことは不利に働くと考えられている。溶菌活性測定を行ったところ、BSL2 は HEWL に比べて活性が低く、特に中性溶液中ではほとんど活性が見られない。以上の事から、BSL2 は負に帯電した表面を持つ事などで構造安定性を獲得し、その結果ペプシン耐性を得たが、代わりに中性環境下での溶菌活性を失ったのではないかと推測できる。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 河 野 敬 一  
副 査 教 授 田 中 勲 (生命科学学院)  
副 査 教 授 佐々木 直 樹  
副 査 教 授 出 村 誠 (生命科学学院)

## 学位論文題名

# Studies on the Structural Stability of C-type Lysozyme

(C型リゾチームの構造安定性に関する研究)

溶菌酵素として知られるC型リゾチームは、球状タンパク質を代表するモデル試料として、タンパク質研究のあらゆる場面において用いられている。脊椎動物や昆虫を中心に、多くの後生動物から見つかったが、その中には独特の構造的または機能的特徴を持つリゾチームもいくつか報告されている。

第一章では、イヌミルクリゾチーム(CML)に含まれる特定の Asn 残基が自ら修飾反応を起こす事、多くのタンパク質に共通して起こり得る自発的な化学修飾が、条件によって非常に速やかに生じる事を明らかにしている。第二章ではウシ胃リゾチーム(BSL)が有するペプシン耐性について、構造生物学的な面からそのメカニズムを解析している。以下に各章の概要を述べる。

1. 温和な条件におけるイヌミルクリゾチームの自発的なアスパラギン脱アミド化反応について

イヌミルクリゾチームは主にフォールディング研究において注目されているタンパク質である。従来のC型リゾチームは、一般的な実験条件下では天然状態と変性状態との二状態転移を示す。一方で近縁タンパク質の $\alpha$ ラクトアルブミンは、部分的に変性した構造状態、モルテングロビュール(MG)を含めた三状態間での平衡状態を示す。CMLはリゾチームでありながら $\alpha$ ラクトアルブミンと同様にMG状態を含めた三状態転移を示す事が知られていた。 $\alpha$ ラクトアルブミンやCMLのMG状態はフォールディング中間体と類似していると考えられるため、フォールディング研究において重要な手掛かりを与え得る。ただし実験に用いるCML試料は、溶液中で容易に不均一化を生じるという問題点を抱えていた。本研究では、CMLのフォールディング研究への利用に先立ち、この不均一化の問題を解消する事を試みている。

CMLの自発的不均一化についての特徴は、過去の文献に見られる脱アミド化反応の特徴とよく一致していた。そこで、Asn残基からGln残基への変異を導入する事で、不均一化の原因が脱アミド化反応である事の確認と、反応性を持つAsn残基の特定を図った。その結果、特定のAsn残基の置換によって不均一化が抑えられたため、Asn残基が原因である事が確認された。複数の変異体を作製した結果、Asn 44, 47, 49, 68が反応しやすい事が明らかになった。反応性が高いAsn残基は、構造の揺らぎが大きいと考えられる領域に存在していた。

その後、脱アミド化反応をほとんど生じない変異体としてN44/47/49/68/103Q(5NQ)を作製した。CD測定やX線結晶構造解析から、この変異体が野生型と同様の天然状態およびMG状態を形成する事が確認された。この変異体を用いる事で、より幅広い溶液条件で、より詳細にCMLを用いた解析実験を行なう事が可能になった。

## 2. ウシの胃で発現する消化用リゾチームのX線結晶構造と構造安定性について

ある種の動物は、リゾチームを消化酵素として利用していると考えられている。消化用のリゾチームは、偶蹄類、サル、イヌバエ等の動物がそれぞれ独自に獲得している。しかし種間で共通する特徴が見られるため、これは分子レベルでの収斂進化であるといえる。消化用リゾチームに共通して見られる主な特徴として、活性の至適 pH が酸性側に寄っている事、プロテアーゼに耐性を持つ事などが挙げられる。これらは消化管内の環境に対する適応の結果であると考えられるのだが、その分子レベルでのメカニズムについては、あまりよく分かっていない。

本研究では、消化用リゾチームである BSL と、非消化リゾチームであるニワトリ卵白リゾチーム(HEWL)について、構造解析や熱力学的解析、活性測定などの実験を行ない、両者を比較している。変性剤変性実験や DSC 測定からは、BSL が HEWL よりも高い熱安定性を持つ事が明らかになった。重水素交換実験からは BSL が全体にわたって堅固な構造を取っている可能性が示唆された。主鎖構造の安定性や柔軟性は、プロテアーゼによる切断の受けやすさと関連していると考えられている。したがって BSL のペプシン耐性は、立体構造の堅固さに由来するのではないかと推測できる。X線結晶構造によると、BSL は典型的な C 型リゾチームの立体構造を形成していた。また、BSL の表面には負電荷に富む領域が存在していた。一方で HEWL は全体的に正電荷に覆われており、分子内の電荷の反発が大きいと考えられる。BSL2 は負に帯電した表面を持つ事で構造安定性を獲得したのではないかと推測できる。

いずれの研究もタンパク質の立体構造形成とその安定性に関して注目すべき知見をもたらしている。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のあるものと認める。