

東海大学大学院平成 29 年度博士論文

乳清に含まれるジスルフィド含有タンパク
質の酸化的フォールディングに関する研究

指導 岩岡 道夫 教授

東海大学大学院総合理工学研究科

総合理工学専攻

篠崎 玲奈

略字

ACN	Acetonitrile
AEMTS	2-Aminoethyl methanethiosulfonate
α LA	α -Lactalbumin:
BisTris	Bis(2-hydroxyethyl)imino-tris(hydroxymethyl)methane
β LG	β -Lactoglobulin
BPTI	Bovine pancreatic trypsin inhibitor
BSA	Bovine serum albumin
BSE	Bovine spongiform encephalopathy
B4GalT1	β (1,4)-Galactosyltransferase
CJD	Creutzfeldt-Jakob disease
cyt c	Cytochrome c
D	Denaturated state
Dsb	Disulfide bond formation factor
DHS ^{ox}	<i>trans</i> -3,4-Dihydroxyselenolane oxide
DTT ^{ox}	<i>trans</i> -4,5-Dihydroxy-1,2-dithiane
DTT ^{red}	Dithiothreitol
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid
EGTA	Ethylene glycol tetraacetic acid
EML	Equine milk lysozyme
ESI-MS	Electrospray ionization mass spectrometry
FAD	Flavin adenine dinucleotide
GdmCl	Guanidinium chloride
GlcNAc	<i>N</i> -Acetylglucosamine
GSH	Reduced glutathione
GSSG	Oxidized glutathione
HAMLET	Human α -lactalbumin made lethal to tumor cells
HEL	Hen egg white lysozyme
LYZ	Lysozyme
MG	Molten globule state
MurNAc	<i>N</i> -Acetylmuramic acid
N	Native state or native form
NMR	Nuclear magnetic resonance
OVA	Ovalbumin
PDI	Protein disulfide isomerase
PrP	Prion protein
R	Fully reduced form

RNase A	Ribonuclease A
RP-HPLC	Reverse-phase high performance liquid chromatography
SS	Disulfide
TFA	Trifluoroacetic acid
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride
UDP-Gal	Uridine diphosphate galactose
UQ	Ubiquinone
UV	Ultraviolet

目次

第1章 序論	7
1-1 神経変性疾患の発症基盤へのアプローチ	7
1-2 タンパク質の誕生と死	8
1-3 フォールディング反応とタンパク質の安定性	9
1-4 タンパク質の安定性に関わる要因	10
1-4-1 温度の影響	11
1-4-2 pHの影響	11
1-4-3 塩濃度の影響	11
1-4-4 変性剤の影響	12
1-4-5 界面活性剤の影響	12
1-4-6 金属キレート剤の影響	12
1-5 フォールディングの基本原理と問題提起	12
1-6 モルテン・グロビュール状態の定義	13
1-7 フォールディングのファネル理論	14
1-8 初期フォールディング過程における二次構造の形成モデル	15
1-9 酸化的フォールディングの反応機構	16
1-10 細胞内のSS形成の仕組み	18
1-11 試験管内のSS形成とその問題点	19
1-12 酸化的フォールディングにおける極端なモデル	20
1-13 本研究の目的	22
1-14 参考文献	23
 第2章 Hen egg white lysozyme の酸化的フォールディング	26
2-1 緒言	26
2-2 実験操作	27
2-2-1 R型の精製	27
2-2-2 DHS ^{ox} を用いた酸化的フォールディング	27
2-2-3 HPLCによる分析	27
2-2-4 ESI-MSによる解析	28
2-3 結果	28
2-3-1 温度の影響	28
2-3-2 酸化的フォールディングに伴うコンフォメーション変化	30
2-3-3 des 中間体の構造的な安定性	31
2-4 結論	33
2-5 参考文献	34

第 3 章	Bovine α-lactalbumin の酸化的フォールディング	36
3-1	緒言	36
3-2	実験操作	38
3-2-1	R 型の精製	38
3-2-2	DHS ^{ox} を用いた酸化的フォールディング	38
3-2-3	HPLC による分析	38
3-2-4	ESI-MS による解析	38
3-3	結果	39
3-3-1	DHS ^{ox} を使った定量的な R 型の酸化	39
3-3-2	フォールディング中間体の SS 交換	41
3-3-3	金属イオンの影響	42
3-3-4	I-1 と I-2 の同定	44
3-3-5	I-1 と I-2 の構造的な安定性	45
3-3-6	温度と変性剤の影響	47
3-3-7	α LA と HEL の酸化的フォールディング経路の比較	49
3-4	結論	51
3-5	参考文献	52
第 4 章	Bovine β-lactoglobulin の酸化的フォールディング	55
4-1	緒言	55
4-2	実験操作	56
4-2-1	R 型の精製	56
4-2-2	DHS ^{ox} を用いた酸化的フォールディング	56
4-2-3	HPLC による分析	56
4-2-4	ESI-MS による解析	56
4-3	結果	57
4-3-1	β LG の遺伝的変異体	57
4-3-2	DHS ^{ox} を用いた酸化的フォールディング	58
4-3-3	SS 中間体の同定	59
4-3-4	AI4 及び AI5 から N 型への酸化	61
4-3-5	温度の影響	63
4-3-6	変性剤の影響	64
4-4	結論	65
4-5	参考文献	66
第 5 章	総括	68

補足	70
DHS ^{ox} の合成	70
2-Aminoethyl methanethiosulfonate (AEMTS) の合成	71
DHS ^{red} の ¹ H-NMR スペクトル	72
DHS ^{red} の ⁷⁷ Se-NMR スペクトル	73
DHS ^{ox} の ¹ H-NMR スペクトル	74
DHS ^{ox} の ⁷⁷ Se -NMR スペクトル	75
業績一覧	76
謝辞	79

第1章 序論

1-1 神経変性疾患の発症基盤へのアプローチ

生命機能を支える重要なタンパク質は20種類のアミノ酸が鎖状に繋がり、それが折りたたまれて固有の立体構造を形成(フォールディング)することで初めて生理学的機能を発現する。しかしながら、本来の立体構造を獲得できず、誤って折りたたまれた(ミスフォールド)状態になると著しく凝集性が増加する。その結果、これらが中枢神経内で微細線維凝集塊(アミロイド線維)を異常形成することで、神経細胞に対して致死的な傷害性を発揮することがある。クロイツフェルト・ヤコブ病(Creutzfeldt-Jakob disease: CJD)、ハンチントン病(Huntington's disease: HD)、アルツハイマー型認知症(Alzheimer's disease: AD)、パーキンソン病(Parkinson's disease: PD)など、様々な病理所見にアミロイド線維の形成が指摘されている¹。また、2001年に日本を騒がせたプリオン病に分類されるBSE (Bovine Spongiform Encephalopathy: ウシ海綿状脳症)、所謂、狂牛病は正常型プリオンタンパク質 (Prion Protein Cell: PrP^C)に対して異常型プリオンタンパク質 (Prion Protein Scrapie: PrP^{Sc})が鋳型として働き、連続的に構造変化を誘導する中枢神経疾患である^{2,3}。これらはタンパク質の構造変化がトリガーとなって生物を死へと至らしめる病、フォールディング病である(Table 1-1)。

分子生物学の飛躍的な発展により様々な神経変性疾患の発症基盤が解明され、1997年に伝達性海綿状脳症の病原性物質であるプリオンの発見及びその病的意義に関する実験的検証の功績に対してS. B. Prusinerにノーベル生理学・医学賞が与えられた。しかしながら、依然としてミスフォールディングによって引き起こされるプリオン病の発症メカニズムについて不明な点は多く、有効な治療法が確立されていないのが現状である。従って、フォールディング反応の詳細な分子機構を研究することは、タンパク質の物性の基礎研究としての重要性のみならず、生理学的にも医学的にも非常に重要なことである。

Table 1-1 代表的なフォールディング病¹

Disease	Protein	Site of folding
Huntington's disease	Huntingtin	Cytosol
Marfan syndrome	Fibrillin	ER
Sickle cell anaemia	Haemoglobin	Cytosol
Scurvy	Collagen	ER
Alzheimer's disease	Amyloid β -peptide/ tau	ER
Parkinson's disease	α -Synuclein	Cytosol
Scrapie/ Creutzfeldt-Jakob disease	Prion protein	ER
Familial amyloidoses	Transthyretin/ lysozyme	ER
Cancer	P53	Cytosol

1-2 タンパク質の誕生と死

タンパク質は細胞内のリボソームで合成される(Figure 1-1)。DNA から転写された遺伝情報は mRNA によってリボソームに伝えられ、読み取った情報を基に tRNA がアミノ酸を運搬し、アミノ酸配列に翻訳される。並べられたアミノ酸はペプチド結合によって鎖状に繋がっており、その多くは小胞体内腔でシグナルペプチドの切断や立体構造の形成が行なわれる。その後、ゴルジ体で糖や脂質の修飾を得てタンパク質の目的に応じた適切な場所へと輸送される。タンパク質の働きは多岐に渡り、代謝に関する酵素や免疫機構に関与するタンパク質、酸素や脂質を運ぶ輸送タンパク質として機能する。一方、生体内で役割を終えたタンパク質や正しい立体構造を形成できなかったタンパク質はユビキチンシステムなどにより迅速に分解される。細胞内のタンパク質の発現量は合成と分解によって調節されている。細胞内でタンパク質が凝集せずに機能を維持できるのは分子シャペロンの働きによるものである⁴。分子シャペロンとはタンパク質の誕生から死に至るまでの様々な過程における介添えタンパク質全般を示す用語である。シャペロニンで有名なのが大腸菌の GroEL である⁵。GroEL と補助因子の GroES の複合体内部には疎水性の空洞が存在し、ポリペプチド鎖が運び込まれる。この空洞内で凝集体の形成を防ぎながらタンパク質の立体構造の形成が行なわれる。

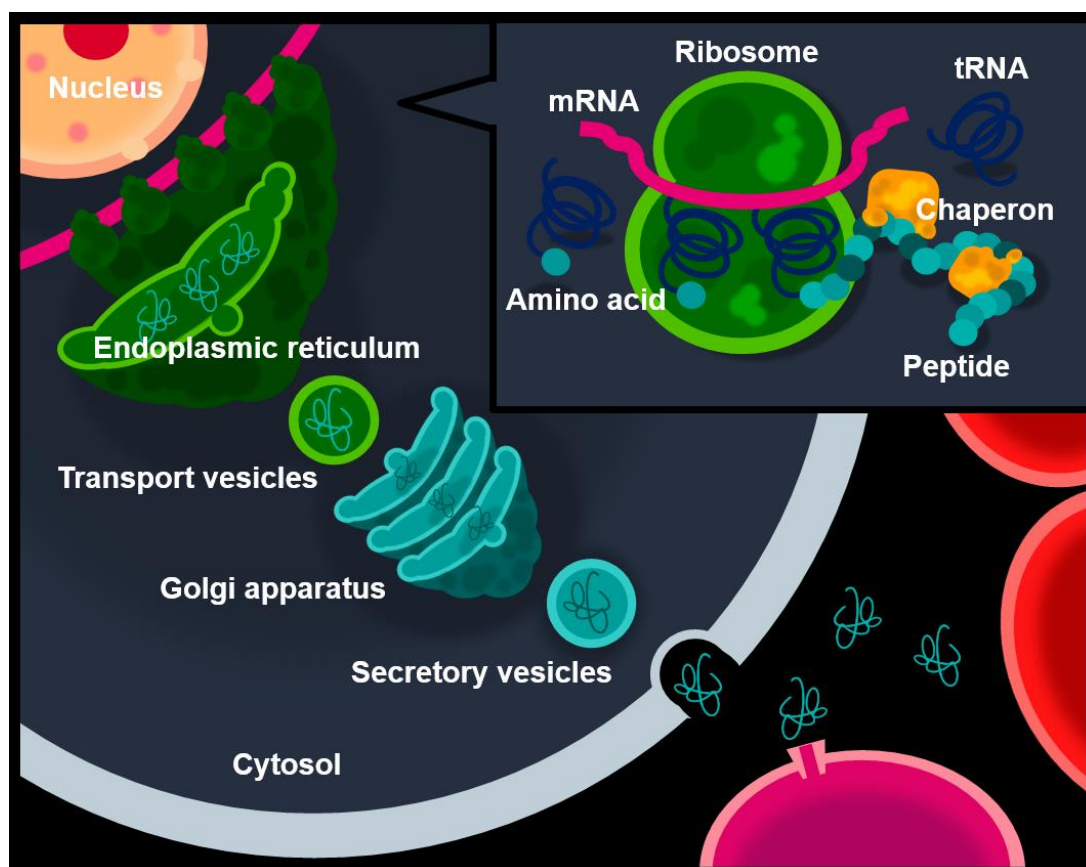


Figure 1-1 細胞内におけるタンパク質の流れ

1-3 フォールディング反応とタンパク質の安定性

高度な変性状態(denatured state: D)のペプチド鎖が元の規則的な天然状態(native state: N)に折り畳まれる現象をフォールディングと云う (Figure 1-2)。タンパク質のフォールディング反応は基本的に可逆的な化学反応である。

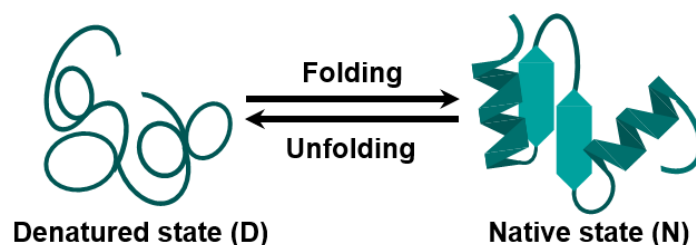


Figure 1-2 タンパク質のフォールディング(二状態転移)

タンパク質がその形を保持する力は、熱力学の定量的な指標であるギブスの自由エネルギー変化(ΔG)で表される。ギブスの自由エネルギー変化量はタンパク質の安定性と相関する。

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S = -RT \ln K \quad (1)$$

ここで、 ΔH はフォールディング反応に伴うエンタルピー変化、 ΔS はコンフォメーションのエントロピー変化、 R は気体定数、 T は絶対温度、 $K(=[D]/[N])$ は平衡定数を示す。

タンパク質の立体構造は安定化しようとする力と不安定化しようとする力の絶妙なバランスによって成り立っている。安定性を高める力の大部分は疎水的相互作用、ファンデルワールス力、静電的相互作用、水素結合などの弱い極性相互作用である。その他にも、ジスルフィド(SS)結合や側鎖官能基への金属イオンの配位結合などが挙げられる。極性相互作用の寄与は非常に弱いものであるが、数十、数百のアミノ酸からなる高分子のタンパク質にはこの相互作用が多数存在するので、総合的な寄与は非常に大きいものとなる。一方、タンパク質を不安定化する力で代表的なものが、コンフォメーションのエントロピー変化である。タンパク質を特定の構造に固定するよりも、変性させて様々な構造を取れる様にした方がコンフォメーション数は圧倒的に多く、エントロピーは増大してギブスの自由エネルギーの減少を^{もたら}す。また、規則的な立体構造を取った時に生じる歪み^{ゆが}も、D状態の方が有利に働くことになる。これらの安定化・不安定化の力の寄与によって相殺された正味の安定性は僅かであり、タンパク質の立体構造はマージナルスタビリティ(marginal stability: ぎりぎりの安定性)によって保たれている。故に、熱や酸に対するタンパク質の変性は狭い温度範囲内で一気に進行してD状態とN状態の二状態転移であることが多く、中間的な構造が検出され難い。

1-4 タンパク質の安定性に関わる要因

タンパク質を構成する 20 種類のアミノ酸はそれぞれ物理的・化学的性質が異なり、非極性アミノ酸、極性アミノ酸に大別できる(Table 1-2)。タンパク質には解離基や極性基が多く存在し、pH によって電荷状態は変化する。タンパク質全体の電荷が 0 の時の pH を等電点 (isoelectric point : pI) と呼ぶ。pI ではタンパク質分子間の疎水的な引力が最も大きくなるので溶解度は最小になる。タンパク質の水に対する溶解度はタンパク質分子表面に露出するアミノ酸の種類やタンパク質のコンフォメーションに依存する。中性 pH で正電荷を帯びる Arg や Lys の塩基性アミノ酸や負電荷を帯びる Asp や Glu の酸性アミノ酸を分子表面に多く持つタンパク質は、分子全体の大きな誘電率と双極子モーメントによってタンパク質と水分子との静電的な相互作用が強められ、結果としてタンパク質分子間の相互作用が弱められる。同様に、Asn や Gln などの極性アミノ酸を多く持つタンパク質も、極性官能基と水分子の間に水素結合が形成され、水との親和性が増す。反対に、Leu や Ile などの疎水性の強いアミノ酸を多く持つタンパク質は、水分子がこれら疎水性官能基の周りに籠状の特殊な構造(水分子間の水素結合ネットワーク)を作り、水から排除されて溶け難くなる。

Table 1-2 タンパク質を構成するアミノ酸

	Amino acid	Abbr.		Side chain
Nonpolar amino acids	Alanine	Ala	A	Nonpolar
	Glycine	Gly	G	Nonpolar
	Valine	Val	V	Nonpolar
	Leucine	Leu	L	Nonpolar
	Isoleucine	Ile	I	Nonpolar
	Proline	Pro	P	Nonpolar
	Phenylalanine	Phe	F	Nonpolar
	Methionine	Met	M	Nonpolar
	Tryptophan	Trp	W	Nonpolar
	Cysteine	Cys	C	Nonpolar
Polar amino acids	Aspartic acid	Asn	N	Negative
	Glutamic acid	Gln	Q	Negative
	Arginine	Arg	R	Positive
	Lysine	Lys	L	Positive
	Histidine	His	H	Positive
	Asparagine	Asn	N	Uncharged polar
	Glutamine	Gln	Q	Uncharged polar
	Serine	Ser	S	Uncharged polar
	Threonine	Thr	T	Uncharged polar
	Tyrosine	Tyr	Y	Uncharged polar

タンパク質の立体構造の安定性や水への溶解性に影響を及ぼす要因には、上述したタンパク質分子自体の構造的な特徴に加えて、温度、pH、塩濃度、タンパク質自身の濃度、界面活性剤、カオトロピック塩などの変性剤、金属キレート試薬、プロテアーゼ阻害剤の共存など様々な要因が挙げられる。

1-4-1 温度の影響

タンパク質が高温に曝されると、激しい分子振動によって立体構造を維持している弱い相互作用が切断されて熱変性(heat denaturation)する。タンパク質の熱変性は狭い温度範囲で迅速に N 状態から D 状態に変化する。この時の変化の midpoint 温度を融解温度(T_m)と云う。一方、低温に曝されることで起こる変性を低温変性(cold denaturation)と云う。

1-4-2 pH の影響

タンパク質には解離基や極性基が多く存在し、pH によって電荷状態は変化する。各アミノ酸残基の電荷状態はアミノ酸側鎖の pK_a と溶液の pH から決定され、溶液の pH によってタンパク質の溶解度や生理活性は大きく異なる。タンパク質を扱う際は常に至適な pH を維持できる様な緩衝溶液(buffer)を選択する(Table 1-3)。Buffer の持つ緩衝能は緩衝剤の pK_a と同じ pH で最大となり、 pK_a と pH が離れると小さくなる。一般的には緩衝剤の $pK_a \pm 0.5$ 程度の pH 範囲で有効な緩衝作用が得られる。弱酸(弱塩基)とその塩から作られる buffer には対となる塩の成分が共存することになるので、実験への影響を考慮する必要がある。

Table 1-3 代表的な緩衝溶液

Buffer	pK_a	Optimum pH range	
Glycine-HCl	2.35	1.85~2.85	(± 0.5)
Acetate-NaOH	4.76	4.26~5.26	(± 0.5)
Phosphate-NaOH	7.22	6.72~7.72	(± 0.5)
HEPES-NaOH	7.55	7.05~8.05	(± 0.5)
Tris-HCl	8.30	7.80~8.80	(± 0.5)
Borate-NaOH	9.24	8.74~9.74	(± 0.5)
Glycine-NaOH	9.57	9.07~10.07	(± 0.5)

1-4-3 塩濃度の影響

適当な低濃度の塩が溶液中に共存することで、タンパク質の解離基と塩から生じたイオンとの間に静電的な相互作用が働き、タンパク質の水に対する溶解度は増加する。しかし、高濃度の塩はタンパク質から水分子を奪ってしまい、タンパク質間の相互作用を増加させてしまう。水に対するタンパク質の溶解度や安定性は塩の種類や濃度によって左右され、順序は塩析のホフマイスター系列と一致する(Figure 1-3)。一般的に $(NH_4)_2SO_4$ や KH_2PO_4 はタンパク質の N 状態を安定化させ、KSCN や LiBr は不安定化させる。故に、塩析を利用した

分離沈殿では特に $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ が使用される。

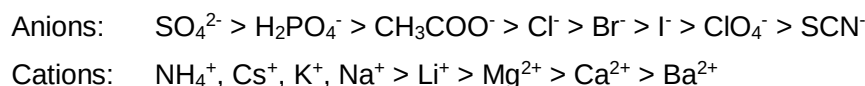


Figure 1-3 ホフマイスター系列

1-4-4 変性剤の影響

タンパク質の構造を破壊してその機能を失わせる物質を変性剤と呼ぶ。広義には界面活性剤、有機溶媒、還元剤を含むが、*in vitro* におけるタンパク質のフォールディング研究では変性剤と云えばグアニジン塩酸塩や尿素が有名である。グアニジウムイオン(Gu^+)と尿素に、ホフマイスター系列の中で特に変性効果の高い I^- 、 ClO_4^- 、 SCN^- 、 Li^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Ba^{2+} を加えた塩類をカオトロピック塩と呼ぶ。カオトロピック試薬は塩析作用がなく、タンパク質間の水素結合や疎水的な力を妨げ、非極性アミノ酸の水に対する溶解度を高める。

1-4-5 界面活性剤の影響

膜タンパク質の様に疎水性が強いタンパク質を可溶化する時には界面活性剤が使われる。少量の界面活性剤を水に溶かすと界面活性剤の分子は単量体の状態で溶解し、濃度を大きくすると界面活性剤の分子は液体の界面に吸着する。さらに濃度を大きくすると、単量体が集合してミセルが形成され始める。この時の濃度が臨界ミセル濃度(critical micelle concentration: CMC)である。ミセル中の界面活性剤は親水基が外側、疎水基が内側に向いており、ミセル内部の疎水領域に膜タンパク質の疎水領域が入り込むことで、膜タンパク質は水に可溶化する。その反面、立体構造を維持する上で重要な疎水的な相互作用を弱めるので、界面活性剤はタンパク質に対して強い変性作用を示す。陰イオン性界面活性剤としては、ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)に用いられるドデシル硫酸ナトリウム(Sodium dodecyl sulfate: SDS)が有名である。

1-4-6 金属キレート剤の影響

金属イオンの配位はタンパク質の立体構造を安定化させる。特に二価金属イオンは生化学反応で重要な役割を担っていることが多く、buffer 中に含まれる僅かな金属イオンもタンパク質の酵素活性に影響を与える。二価金属イオンを除去したい場合はエチレンジアミン四酢酸(ethylene diamine tetraacetic acid: EDTA)やグリコールエーテルジアミン四酢酸(ethylene glycol tetraacetic acid: EGTA)などの金属キレート剤を使用する。両キレート剤は金属イオンに対する特異性がそれぞれ異なり、EGTAは Mg^{2+} よりも Ca^{2+} や Cd^{2+} に対して選択的に働く。

1-5 フォールディングの基本原則と問題提起

タンパク質のフォールディングを研究する上で最も重要な基本原則と問題提起がアンフインセンのドグマとレービンタール・パラドックスである。1950 年代に C. B. Anfinsen は

126 残基からなるウシ膵臓リボヌクレアーゼ A (ribonuclease A: RNase A)の溶液に変性剤である尿素を添加して酵素活性を失活させた後、尿素を透析で除去することで失活させた酵素活性が回復することを実験で証明した⁶。この結果はタンパク質の立体構造はアミノ酸配列(一次構造)によって規定されることを示唆した。つまり、比較的小さなタンパク質のフォールディング反応は自発的な反応であり、N 状態はギブスの自由エネルギーが最少状態であると言い換えられる。この基本原理をアンフィンセンのドグマと云う。一方、1960 年代に C. Levinthal は次の物理化学的な問題を提起した。タンパク質(ポリペプチド鎖)が取り得るコンフォメーションは膨大な数であり、網羅的に N 状態を探すには天文学的な時間が必要である。しかし、現実のタンパク質は極めて短時間でフォールディングが完結する。この矛盾はレービンタル・パラドックスと呼ばれ、彼はフォールディングには無駄なコンフォメーションを回避し、熱力学的に最も安定な状態に到達するための特定の経路(pathway)が存在することを示唆した^{7,8}。この問題提起に影響され、多くの研究者達によってフォールディングの中間状態を明らかにすることによってフォールディング経路を理解しようとする試みが行われた。しかしながら、中間状態を解明することは決して容易なことではない。なぜなら、タンパク質のフォールディング反応は N 状態と D 状態の二状態転移であることが多く、中間状態は蓄積されないからである。それでも、シトクロム c (cytochrome c: cyt c)、アポミオグロビン(apomyoglobin)、 α -ラクトアルブミン(α -lactalbumin: α LA)を始めとするいくつかのタンパク質は、酸や低濃度の変性剤が存在すると部分的にコンパクトな構造を含む中間的な構造、モルテン・グロビュール状態(molten-globule state: MG)を取ることが分かった^{9,10}。

1-6 モルテン・グロビュール状態の定義

D 状態と N 状態の中間状態が観測されて以後、タンパク質のフォールディング反応は二状態転移だけでなく、中間状態を含めた三状態転移の複雑なモデルであると考えられる様になり (Figure 1-4)、中間状態の立体構造や生物学的意義まで論じられる様になった。



Figure 1-4 タンパク質のフォールディング(三状態転移)

今日、フォールディング中間体の名称として頻繁に用いられる様になった MG 状態は、M. Ohgushi と A. Wada が酸性 pH で cyt c が D 状態と N 状態の中間の立体構造を取ることを発見した際に用いられた用語である⁹。しかし、それ以前にも O. B. Ptitsyn が酸性 pH 或いは低濃度のグアニジン塩酸塩(GdmCl)などの比較的マイルドな変性条件で α LA が中間的な構

造を取ることを報告しており、彼らは compact globule と提唱していた¹¹。また、K. Kuwajima と S. Sugai は α LA における D 状態と N 状態以外の状態に A 構造と云う言葉を使っていた¹⁰(Table 1-4)。

Table 1-4 実験結果に基づく α LA の MG 状態の特徴

	D state	MG state	N state
Secondary structure	Absent	Present	Present
Tertiary structure	Absent	Absent	Present
Molecular size	Swelling	Compact	Compact
H/D exchange	Present	Absent	Absent (very)

どの用語も D 状態と N 状態とは異なる第三の状態を示す言葉ではあるものの、MG 状態と云う言葉で一括りに定義することはできない。なぜなら、cyt c の MG 状態は塩濃度の高い条件でのみ安定であるが、 α LA の酸性 pH での MG 状態は塩濃度に関係なく安定だからである。様々なタンパク質で研究が行なわれた結果、MG 状態の実体は M. Ohgushi と A. Wada が最初に提案したものとは異なり、タンパク質の種類によって多様であることが明らかになった。本論文では MG 状態と云う言葉がタンパク質の研究の歴史を反映した重要な用語であることに重きを置き、N 状態と同様の二次構造を部分的に持った中間的な構造に対して MG 状態と云う言葉を用いることとする。

1-7 フォールディングのファネル理論

レービンタール・パラドックスの影響から、タンパク質のフォールディング過程には特異的な中間体を形成し、素早く N 状態へと導く経路が存在すると考えられた。従って、初期のフォールディング研究ではこの特異的な中間体の特徴付けが盛んに行なわれた。この様な考え方を古典的捉え方(classic view)と呼ぶ。しかしながら、全てのタンパク質が必ずしも中間体を形成する訳ではない。特に 100 残基以下の小さなタンパク質は D 状態と N 状態だけの二状態転移であることが多く、この様なタンパク質は中間体を形成する三状態転移よりも速くフォールディングが完結する。中間体を形成せずにフォールディングするタンパク質がある以上、特異的な中間体はフォールディングを理解するのには必要なものではない。そこで、タンパク質のフォールディングを上手く説明できる理論として、タンパク質のコンフォメーション空間におけるエネルギー地形が N 状態を導く形をしていると考えられるようになった。この様な考え方を新しい捉え方(new view)と呼ぶ。エネルギー曲面全体は漏斗(ファネル)の様な形をしており、ファネルの淵が D 状態、ファネルの底が N 状態になる。フォールディングが開始されると上部の D 状態から下部の N 状態へと緩い曲線を描きながら流れる。レービンタール・パラドックスで問題となったランダム検索は行われない。エネルギー曲面全体が N 状態に向けてバイアスの掛かった形をしているので最後は同じ N 状態に辿り着く。一方で、フォールディング中間体の研究におけるストップフロー法による

CD 測定や水素交換パルスラベル法による二次元 NMR の結果は、MG 状態がタンパク質のフォールディング経路上にある真の中間体であることを示している¹²⁻¹⁴。これはフォールディング・ファネル理論が単純化された理想モデルである為に、現実のタンパク質フォールディングのエネルギー地形を正確には表現することができないことを示している。K. Kuwajima と M. Arai は普遍的なフォールディングのモデルとして 2 段階階層モデルを提案した¹⁵(Figure 1-5)。タンパク質のフォールディングは D 状態から MG 状態を形成する段階 I と MG 状態から N 状態が形成する段階 II で表される。段階 I では主鎖に沿った局所的な相互作用と非特異的な疎水性相互作用が働いて分子全体の大まかな構造が決定される。段階 II では鎖に沿った非局所的な相互作用によって側鎖の特異的なパッキングが行われる。三状態転移のタンパク質は段階 II が律速段階であるが、二状態転移のタンパク質は一般にサイズが小さく、獲得しなければならぬ非局所的な相互作用が減る為に段階 I が律速段階になる。そこで、2つの段階に関わる構造の種類やエネルギー特性の違いをファネルの形の違いとして表現した。段階 I でのコンパクト化は ΔS の大きな減少をもたらすので最初のファネルの淵は段階 II の淵よりも大きく広がっている。段階 II でのパッキング化は数多くのエンタルピー的な障壁が存在し、エネルギー地形の起伏は大きく凹凸している。現在、タンパク質のフォールディングは Figure 1-5 に示す様な階層的な分子機構で進行していると考えられている。

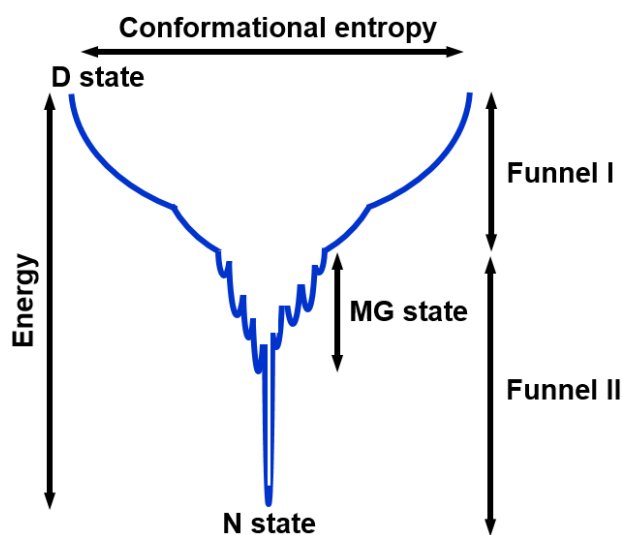


Figure 1-5 フォールディングのファネル理論

1-8 初期フォールディング過程における二次構造の形成モデル

三次構造の形成に先行して二次構造が形成される時のモデルとしてフレームワークモデル (framework model) と疎水性凝縮モデル (hydrophobic collapse model) が提案されている^{16,17}(Figure 1-6)。フレームワークモデルは二次構造が局所的な相互作用によって形成された後に、ランダムな拡散と衝突によって三次構造が形成される。最初に枠組みを大まかに作り、後から肉を付ける形である。一方、疎水性凝縮モデルは先行するポリペプチド鎖の疎水的な

凝集によって二次構造が後から形成されると考えられており、フレームワークモデルとは二次構造が形成されるタイミングが異なる。また、両モデルの特徴を併せ持つ、部分的な傾向はあるものの自由に二次構造を形成する核形成・成長モデル(nucleation-condensation model)も存在する。初期フォールディング段階における二次構造の形成は一般に非常に速く、フォールディング研究で用いられるストップフロー法や連続フロー法の不感時間内で完結してしまい、これらのモデルを見分けることは容易でない。

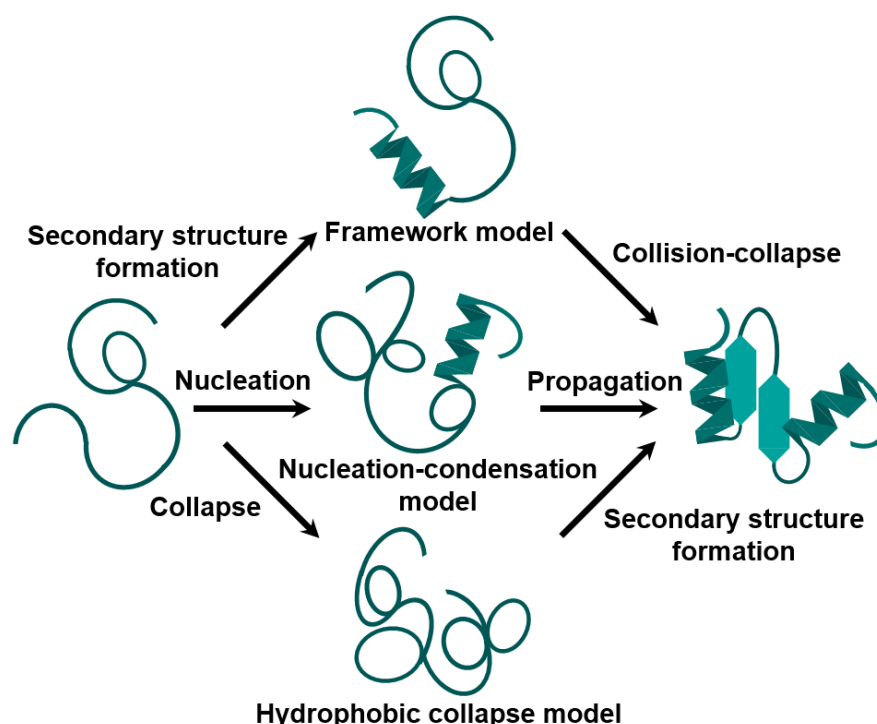


Figure 1-6 初期フォールディングにおける形成モデル

最近、これらの単純モデルと対照的なフォールディングが β -ラクトグロブリン(β -lactoglobulin: β LG)で報告された¹⁸。 β LG は 162 残基の β シートを多く含む樽型の立体構造を持つタンパク質である。 β LG のフォールディングは極めて短い時間内に過剰の α ヘリックスを形成し、ゆっくりと β シートに転換する。この反応では、局所的な相互作用が優勢だった状態からある段階で非局所性な相互作用が支配的になり、見かけの構造が大きく変化する。 β LG の $\alpha \rightarrow \beta$ 転移は BSE や CJD の原因とされる PrP でも起こっており、異常な構造変化の伝播やフォールディング病の発病に関与していることが示唆されている²。あるアミノ酸配列のペプチド鎖が複数の立体構造を取る場合を、別の折り方(alternate fold)やコンフォメーションスイッチ(conformational switch)と呼ぶ。

1-9 酸化的フォールディングの反応機構

Cys 残基に由来する 2 つの SH 基が酸化されて形成される硫黄原子間の共有結合は SS 結合と呼ばれ、フォールディングだけでなく、タンパク質の安定性や機能においても重要な

役割を担う。SS 非含有タンパク質は数 μ 秒から長くても数秒でフォールディングが完結するのに対し、SS 含有タンパク質は数秒から数分の時間スケールでフォールディングが行なわれる。従って、初期フォールディングの研究では不感時間内で形成される重要な中間体(バースト相中間体)の観測が難しいと云う問題点があったが、SS 含有タンパク質のフォールディングでは SS 中間体を化学的にトラップすることが可能となる。タンパク質分子内の SS 結合を開裂した還元型(reduced form: R)に適切な酸化剤を加えると、再度 SS 結合を形成させて天然型(native form: N)を構築する(Figure 1-7)。この酸化的フォールディング反応はランダムに SS 結合を架橋する SS 形成反応(Phase 1)と、架橋した SS 結合を熱力学的に安定な SS 結合に組み換える SS 交換反応(Phase 2)によって進行する。ペプチド鎖内にランダムに SS 結合を掛けるだけでなく、N 型が持つ正しい SS 結合に掛け直す必要があり、生体内では SS 結合を効率良く導入する為の触媒システムが存在する。また、*in vitro* の実験では redox 試薬が使われる。

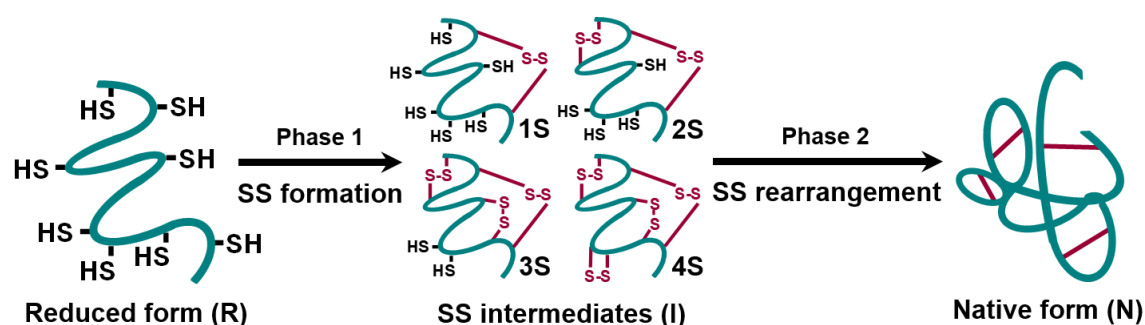
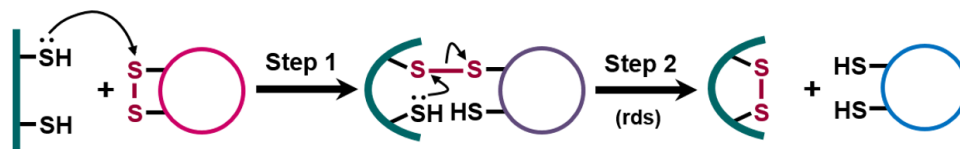


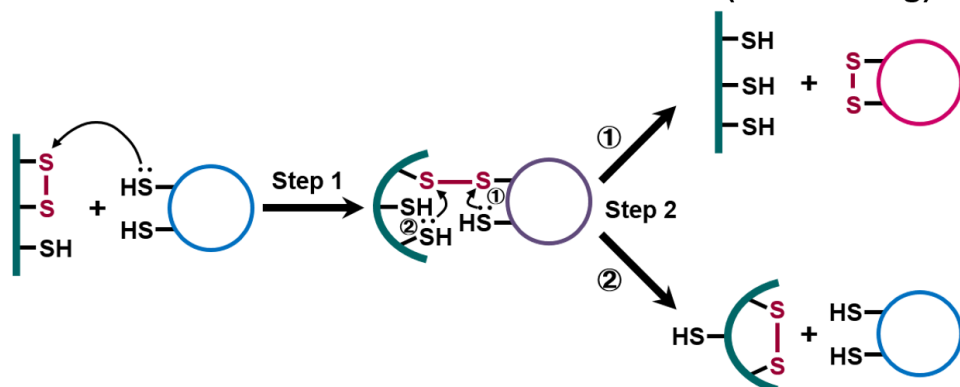
Figure 1-7 タンパク質の酸化的フォールディング

酸化的フォールディング反応は共有結合の形成と解離を含む複雑なプロセスから成り立つ(Figure 1-8)。SS 形成はタンパク質の酸化であり、タンパク質内の SH 基が redox 試薬(タンパク質)の SS 結合を攻撃し、生じた中間体にタンパク質内の別の SH 基が分子間 SS 結合を攻撃することでタンパク質内に SS 結合が導入される。反対に、タンパク質内の SS 結合が redox 試薬(タンパク質)の SH 基から攻撃を受けた場合、生じた中間体において redox 試薬(タンパク質)側の SH 基が分子間 SS 結合を攻撃すればタンパク質の SS 結合は還元され、タンパク質側の SH 基が分子間 SS 結合を攻撃すればタンパク質の SS 結合は異性化される。

Oxidation (SS formation)



Reduction (SS breaking)



Isomerization (SS rearrangement)

Figure 1-8 酸化的フォールディング反応の分子機構

1-10 細胞内の SS 形成の仕組み

大腸菌などの原核細胞では disulfide bond formation factor (Dsb)と呼ばれる一連の酵素が酸化的フォールディングを行なっている(Figure 1-9)。DsbA はタンパク質に SS 結合を導入する働きを持つ。基質を酸化して自身が還元型になると、内膜タンパク質 DsbB が再度 DsbA を酸化する。DsbB が受け取った電子は呼吸鎖成分であるユビキノン(UQ)に受け渡され、最終的にはユビキノール酸化酵素を介して酸素が電子受容体になる。時に DsbA は間違った SS 結合を導入するが、異性化酵素の DsbC が SS 結合の組み換えを行なう。DsbC が働くには酸化酵素である DsbA とは逆に還元型でなければならない。その還元力はサイトゾルのチオレドキシシステムに由来する電子がチオレドキシシステムから内膜タンパク質 DsbD を介して DsbC へと受け渡されることによって生じる。

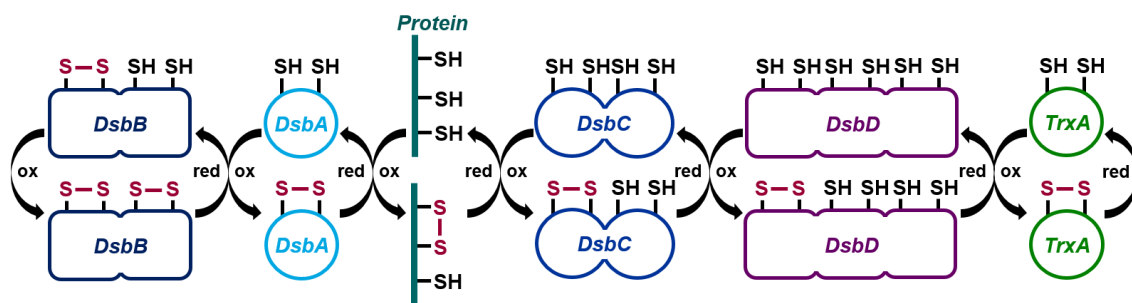


Figure 1-9 原核細胞における SS 形成機構

真核細胞の場合、SS 結合導入酵素として小胞体の protein disulfide isomerase (PDI)が働く¹⁹⁻²¹(Figure 1-10)。PDI の酸化には Ero1 が flavin adenine dinucleotide (FAD)の酸化力を得て行なう。即ち、原核細胞の DsbA-DsbB-UQ と真核細胞の PDI-Ero1-FAD は機能的に相同な関係にある。Ero1 は PDI を酸化する際に活性酸素種の H_2O_2 を副産物として発生する為に、過剰に働かない様に調整されている。哺乳類では Ero1 以外に酸化能を持つ 4 種類の酸化酵素 (Prx4、VKOR、Gpx7、Gpx8)が新たに報告された²²⁻²⁵。In vivo には SS 形成の複雑なネットワークが存在するが、システムの解明や酵素の機能的な働きについて不明な点も多い。

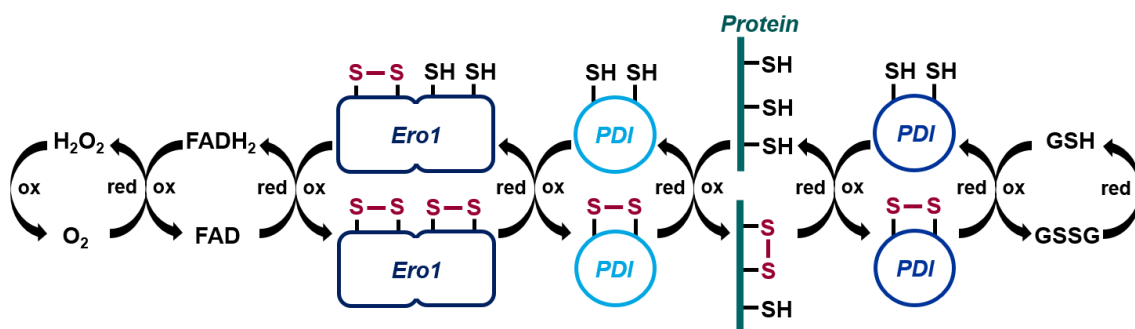


Figure 1-10 真核細胞内における SS 形成機構

1-11 試験管内の SS 形成とその問題点

In vitro の実験では酸化型グルタチオン(oxidized glutathione: GSSG)や酸化型ジチオスレイトール(trans-4,5-Dihydroxy-1,2-dithiane: DTT^{ox})、シスチン(cystine)でペプチド鎖内に SS 結合を形成させ、還元型グルタチオン(reduced glutathione: GSH)や還元型ジチオスレイトール(dithiothreitol: DTT^{red})、システイン(cysteine)で間違った SS 結合の切断と交換を促す(Figure 1-11)。しかし、これらの試薬は酸化能力が低く、SS 形成反応と SS 交換反応が競合して進行する為に、フォールディングの鍵となる SS 中間体を観測することは困難である。

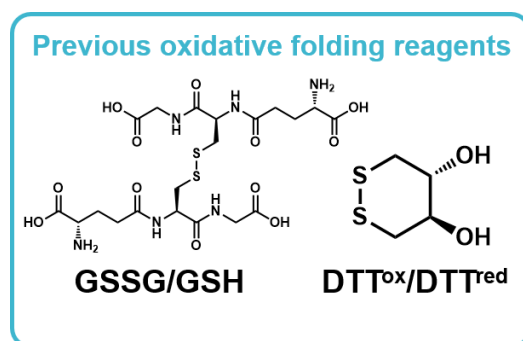


Figure 1-11 一般的な redox 試薬

そこで、本研究では M. Iwaoka によって合成された trans-3,4-Dihydroxyselenolane oxide (DHS^{ox})を酸化剤に用いることにした²⁶。DHS^{ox}は高い酸化能力を持ち、SS 形成反応が 1 分以内に素早く完結し、その後の SS 交換反応はタンパク質自身が持つ熱力学的な要因でゆっ

くりと進行する。従って、SS 中間体を容易に観測することが可能である(Figure 1-12)。

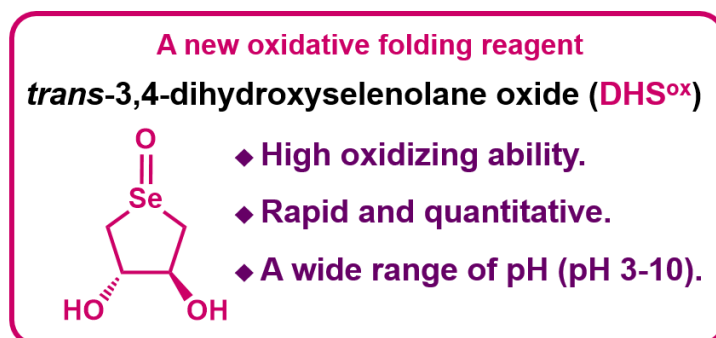


Figure 1-12 本研究で使用する酸化剤 DHS^{ox} の特徴

DHS^{ox} による SS 形成反応ではタンパク質の SH 基が DHS^{ox} の Se 原子を攻撃することで、S-Se-O が直線上に並んだチオセレンラン中間体が生成される。この中間体は非常に不安定であり、直ぐにタンパク質内の別の SH 基が分子間 S-Se 結合の S 原子を攻撃し、DHS^{red} と水が脱離してタンパク質内に SS 結合が導入される(Figure 1-13)。この反応の律速段階は Step1 であり、一般的に使用される redox 試薬の律速段階が Step2 であるのと対照的である。DHS^{ox} を用いるタンパク質の酸化は定量的且つ瞬時に進行する²⁷。K. Arai らは DHS^{ox} を RNase A の酸化的フォールディングに応用し、準安定的な 4 種類の SS 中間体(des[26-84]、des[40-95]、des[58-110]、des[65-72])の観測に成功している²⁸。

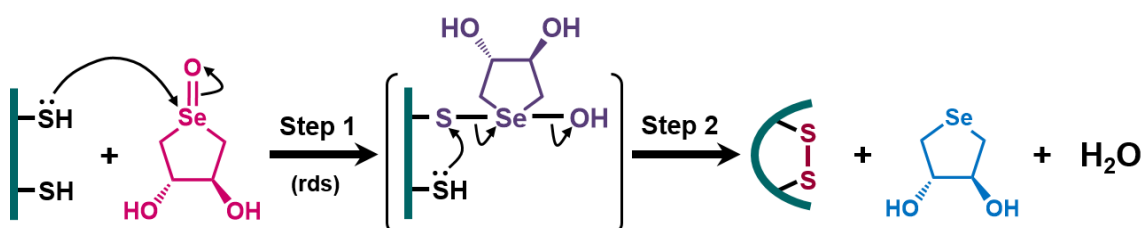


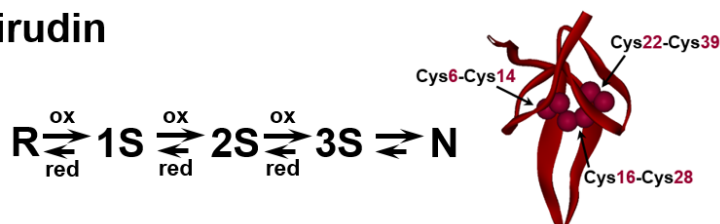
Figure 1-13 DHS^{ox} による SS 形成機構

1-12 酸化的フォールディングにおける極端なモデル

酸化的フォールディング研究では、タンパク質のフォールディング機構を 2 つの極端なモデルで議論することがある²⁹(Figure 1-14)。ヒルの顎下腺から分泌される血液凝固を阻害する働きを持つ hirudin は N 型に巻き戻る過程において同定が不可能な程多数の中間体を形成する。これは特異的な中間体を生成せずに SS 形成と SS 交換の try-and-error を繰り返しながら N 型を模索する経路である³⁰。これとは対照的に、ウシ膵臓トリプシンインヒビター (bovine pancreatic trypsin inhibitor: BPTI) は取り得ることが可能な組み合わせの中で限られた SS 中間体だけを特異的に形成しながら N 型へと巻き戻る^{31,32}。フォールディング経路上の des 中間体とは N 型が持つ SS 結合の内、[] に示す SS 結合を欠損させた中間体のことを示し、準安定的な立体構造を持っている。この des 中間体は残りの SS 結合を架橋することで

N 型を形成する。BPTI が形成する 3 種類の des 中間体の内、des[14-38]からの酸化で N 型が形成されるのは、des[30-51]と des[5-55]が持つ立体構造では遊離 SH 基が分子内部に埋もれており、redox 試薬(タンパク質)の接近が不可能だからである。

Hirudin



BPTI

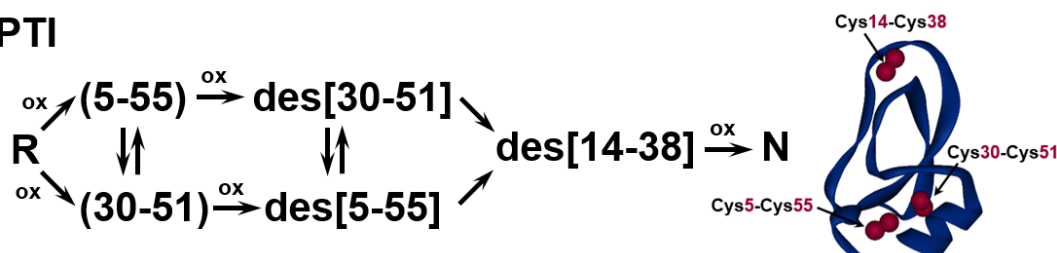


Figure 1-14 酸化的フォールディングにおける極端なモデル

Hirudin と BPTI は R 型がランダムな構造を取り、高次構造の形成が SS 結合の形成と連動しているタンパク質である。一方で、R 型が完全に折り畳まれた構造を取るオボアルブミン (ovalbumin: OVA) や部分的に折り畳まれた構造を取るウシ血清アルブミン (bovine serum albumin: BSA) など、分子内に SS 結合と遊離 SH 基が混在するタンパク質は、高次構造の形成に SS 結合の形成が必ずしも必要でない³³。OVA を N 型のまま D 状態にすると間違った SS 結合を持つ分子種が多数形成されるが、R 型にして SS 結合を再形成させると容易に N 型を形成する^{34,35}。これは R 型の立体構造が N 型と同じである為に、D 状態でなければ R 型の酸化で正しい SS 結合を形成することが可能であることを示す (Figure 1-15)。N 状態の高次構造を維持する上で SS 結合への依存度はタンパク質の種類によって様々である。

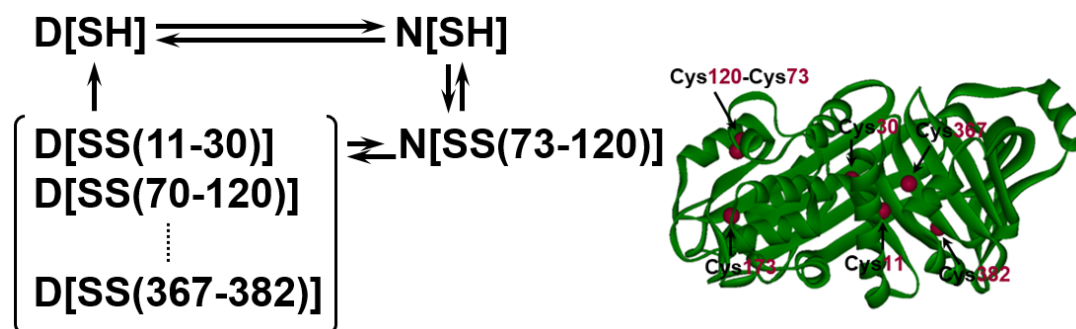


Figure 1-15 OVA のフォールディング経路

1-13 本研究の目的

本論文では迅速且つ化学量論的に SS 結合を形成することが可能な DHS^{ox}を酸化剤に用いて、乳清に含まれる 3 種類のタンパク質、リゾチーム(lysozyme: LYZ)、 α LA、 β LG の酸化的フォールディング経路を明らかにし、これらの乳清タンパク質のフォールディング経路の特徴を比較することを目的として研究を行なった。本研究では、乳清由来の LYZ の代わりに、ほぼ同じアミノ酸配列を持ち入手が容易なニワトリ卵白リゾチーム(hen egg white lysozyme: HEL)を用いて実験を行なうこととした。

乳清タンパク質(whey protein)とは哺乳類が幼児の初期発育で栄養を与える為に母体を作り出す分泌液、乳(milk)に含まれるタンパク質の中で水溶性のタンパク質のことである。牛乳中のタンパク質の 80%は乳固形分の casein、20%が乳清タンパク質(whey protein)である。前者の casein (α s1-, α s2-, β -, κ -casein の 4 種類)では大部分の Ser 残基がリン酸化されている。その結果、分子全体は負電荷を帯びており、Ca²⁺や Na⁺と結合し易い。4 種類の casein は複合体を形成し、乳中では casein の中で特に水溶性の高い κ -casein の働きによって複合体はさらにミセルを形成している。一方、後者の乳清タンパク質の大部分は β LG と α LA であり、その他の成分として免疫グロブリン、血清アルブミン、ラクトフェリン、リゾチームなどの多種多様なタンパク質が含まれる。

古くから乳清タンパク質の α LA は比較的マイルドな変性条件で MG 状態を形成することが知られていたものの^{10,11,36}、多くの研究者達は MG 状態の生物学的な意義を見出せなかった。しかし、2000 年以降になって、幼児が摂取した乳が胃で消化される際に α LA の MG 状態が乳脂肪のオレイン酸と複合体を形成し、その複合体が腫瘍細胞に対して致死的な働きを持つことが発見された^{37,38}。即ち、 α LA は乳糖合成に関与する酵素である一方、そのフォールディング変異体の脂肪酸複合体は腫瘍細胞を致死する(human alpha-lactalbumin made lethal to tumor cells: HAMLET)機能を持つ。このことは、 α LA は同じアミノ酸配列でも異なる立体構造を形成することが可能であり、それによって生理学的機能や分子の挙動に大きな変化を^{もたら}すことを示している。また、これと同様な現象は β LG でも報告されている。 β LG の N 状態の再形成過程では、フォールディングの初期に N 状態とは異なる過剰の α ヘリックスが形成された後、 $\alpha \rightarrow \beta$ 転移を経て本来の N 状態を形成することが知られている¹⁸。

以上に述べた乳清タンパク質の性質を踏まえ、本論文では以下の 3 つの項目を明らかにすることを達成目標として設定した。

1. HEL の酸化的フォールディング

酸化剤に DHS^{ox}を用いて酸化的フォールディング研究を行ない、以前に提案された HEL の酸化的フォールディング経路と比較し、観測される 3 種類の des 中間体の熱力学的な安定性について議論する。

2. α LA の酸化的フォールディング

同じ SS トポロジーを持つ HEL と α LA の酸化的フォールディング経路を比較し、アミノ酸配列と高次構造形成の関係について議論する。

3. β LG の酸化的フォールディング

SS 結合と遊離 SH 基を混在させる β LG の酸化的フォールディング経路の研究から、遊離 SH 基がフォールディング機構にどの様に関与し、働いているのか、品質管理(クオリティーコントロール)や凝集(アグリゲーション)の観点を踏まえて議論を行なう。

1-14 参考文献

- (1) Dobson, C. M. (2004) Principles of protein folding, misfolding and aggregation. *Semin. Cell Dev. Biol.* 15, 3–16.
- (2) Prusiner, S. B. (1997) Prion diseases and the BSE crisis. *Science* (80-.). 278, 245–251.
- (3) Colby, D. W., and Prusiner, S. B. (2011) Prions. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3, 1–22.
- (4) Vainberg, I. E., Lewis, S. A., Rommelaere, H., Ampe, C., Vandekerckhove, J., Klein, H. L., and Cowan, N. J. (1998) Prefoldin, a chaperone that delivers unfolded proteins to cytosolic chaperonin. *Cell* 93, 863–873.
- (5) Hartl, F. U., and Manajit, H.-H. (2002) Molecular chaperones in the cytosol: From nascent chain to folded protein. *Science* (80-.). 295, 1852–1858.
- (6) Anfinsen, C. B., Haber, E., Sela, M., and White, F. H. (1961) The kinetics of formation of native ribonuclease during oxidation of the reduced polypeptide chain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 47, 1309–1314.
- (7) Levinthal, C. (1968) Are there pathways for protein folding? *J. Chim. Phys.* 65, 44–45.
- (8) Karplus, M. (1997) The levinthal paradox: Yesterday and today. *Fold. Des.* 2, S69–S75.
- (9) Ohgushi, M., and Wada, A. (1983) “Molten-globule state”: A compact form of globular proteins with mobile side-chains. *FEBS Lett.* 164, 21–24.
- (10) Kuwajima, K. (1989) The molten globule state as a clue for understanding the folding and cooperativity of globular-protein structure. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* 6, 87–103.
- (11) Dolgikh, D. A., Gilmanshin, R. I., Brazhnikov, E. V, Bychkova, V. E., Semisotnov, G. V, and Ptitsyn, O. B. (1981) α -lactalbumin: Compact state with fluctuating tertiary structure? *FEBS Lett.* 136, 311–315.
- (12) Jean, B., Dobson, C. M., Evans, P. A., and Claire, H. (1989) Characterization of a partly folded protein by NMR methods: Studies on the molten globule state of guinea pig α -lactalbumin. *Biochemistry* 28, 7–13.
- (13) Hughson, F. M., Wright, P. E., and Baldwin, R. L. (1990) Structural characterization of a partly folded apomyoglobin intermediate. *Science* (80-.). 249, 1544–1548.
- (14) Jeng, M. F., Englander, S. W., Elöve, G. A., Roder, H., and Wand, A. J. (1990) Structural description of acid-denatured cytochrome c by hydrogen exchange and 2D NMR. *Biochemistry* 29, 10433–10437.

- (15) Arai, M., and Kuwajima, K. (2000) Role of the molten globule state in protein folding. *Adv. Protein Chem.* 53, 209–282.
- (16) Udgaonkar, J. B. (2008) Multiple routes and structural heterogeneity in protein folding. *Annu. Rev. Biophys.* 37, 489–510.
- (17) Chang, J. (2011) Diverse pathways of oxidative folding of disulfide proteins: Underlying causes and folding models. *Biochemistry* 50, 3414–3431.
- (18) Hamada, D., Segawa, S., and Goto, Y. (1996) Non-native α -helical intermediate in the refolding of β -lactoglobulin, a predominantly β -sheet protein. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 3, 868–873.
- (19) Gilbert, H. F. (1997) Protein disulfide isomerase and assisted protein folding. *J. Biol. Chem.* 272, 29399–29402.
- (20) Gilbert, H. F. (1998) Protein, disulfide isomerase. *Methods Enzymol.* 290, 26–50.
- (21) Gething, M. J. H., and Sambrook, J. F. (1992) Protein folding in the cell. *Nature* 355, 33–45.
- (22) Zito, E., Melo, E., Yang, Y., and Wahlander, Å. (2010) Oxidative protein folding by an endoplasmic reticulum localized peroxiredoxin. *Mol. Cell* 40, 787–797.
- (23) Tavender, T. J., Springate, J. J., and Bulleid, N. J. (2010) Recycling of peroxiredoxin IV provides a novel pathway for disulphide formation in the endoplasmic reticulum. *EMBO J.* 29, 4185–4197.
- (24) Schulman, S., Wang, B., Li, W., and Rapoport, T. A. (2010) Vitamin K epoxide reductase prefers ER membrane-anchored thioredoxin-like redox partners. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 15027–15032.
- (25) Nguyen, V. D., Saaranen, M. J., Karala, A. R., Lappi, A. K., Wang, L., Raykhel, I. B., Alanen, H. I., Salo, K. E. H., Wang, C. C., and Ruddock, L. W. (2011) Two endoplasmic reticulum PDI peroxidases increase the efficiency of the use of peroxide during disulfide bond formation. *J. Mol. Biol.* 406, 503–515.
- (26) Quan, S., Schneider, I., Pan, J., Von Hacht, A., and Bardwell, J. C. A. (2007) The CXXC motif is more than a redox rheostat. *J. Biol. Chem.* 282, 28823–28833.
- (27) Arai, K., Dedachi, K., and Iwaoka, M. (2011) Rapid and quantitative disulfide bond formation for a polypeptide chain using a cyclic selenoxide reagent in an aqueous medium. *Chem. - A Eur. J.* 17, 481–485.
- (28) Arai, K., Kumakura, F., and Iwaoka, M. (2012) Kinetic and thermodynamic analysis of the conformational folding process of SS-reduced bovine pancreatic ribonuclease A using a selenoxide reagent with high oxidizing ability. *FEBS Open Bio* 2, 60–70.
- (29) Arolas, J. L., Aviles, F. X., Chang, J., and Ventura, S. (2006) Folding of small disulfide-rich proteins: Clarifying the puzzle. *Trends Biochem. Sci.* 31, 292–301.
- (30) Chatrenet, B., and Chang, J. (1993) The bisulfide folding pathway of hirudin elucidated by stop/go folding experiments. *J. Biol. Chem.* 268, 20988–20996.
- (31) Creighton, T. E. (1977) Conformational restrictions on the pathway of folding and unfolding of the pancreatic trypsin inhibitor. *J. Mol. Biol.* 113, 275–293.
- (32) Weissman, J. S., and Kim, P. S. (1991) Reexamination of the folding of BPTI: Predominance of native intermediates. *Science (80-.)*. 253, 1386–1393.

- (33) Takahashi, N., Koseki, T., Doi, E., and Hirose, M. (1991) Role of an intrachain disulfide bond in the conformation and stability of ovalbumin. *J. Biochem* 109, 846–851.
- (34) Takahashi, N., and Hirose, M. (1992) Reversible denaturation of disulfide-reduced ovalbumin and its reoxidation generating the native cystine cross-link. *J. Biol. Chem.* 267, 11565–11572.
- (35) Tatsumi, E., Takahashi, N., and Hirose, M. (1994) Denatured state of ovalbumin in high concentrations of urea as evaluated by disulfide rearrangement analysis. *Biol. Chem.* 296, 28062–28067.
- (36) Kuwajima, K. (1977) A folding model of α -lactalbumin deduced from the three-state denaturation mechanism. *J. Mol. Biol.* 114, 241–258.
- (37) Svensson, M. K., Mossberg, A.-K., Pettersson, J., Linse, S., and Svanborg, C. (2003) Lipids as cofactors in protein folding: Stereo-specific lipid-protein interactions are required to form HAMLET (human α -lactalbumin made lethal to tumor cells). *Protein Sci.* 12, 2805–2814.
- (38) Kuwajima, K., and Nakamura, T. (2016) Antitumor complexes formed by oleic acid and molten globule intermediates of proteins. *Mol. Sci. Fluctuations Toward Biol. Funct.*

第2章 Hen egg white lysozyme の酸化的フォールディング

2-1 緒言

リゾチム(LYZ)はヒトの涙、鼻汁、母乳などに含まれている。基質特異性と立体構造からニワトリ型(C型)、グース型(G型)、無脊椎動物(I型)、ファージ型、細菌型の5種に大別される¹。C型の中でも鳥類の受精卵に侵入してきた細菌を溶解する溶菌酵素として働くのが hen egg white lysozyme (HEL)である。HELは129残基、分子量14,307 Daのタンパク質であり、構成するアミノ酸は酸性アミノ酸(Asp、Glu)よりも塩基性アミノ酸(Arg、Lys)の方が多い²。真性細菌のグラム陽性菌の細胞壁は、*N*-アセチルグルコサミン(GlcNAc)と *N*-アセチルムラミン酸(MurNAc)が β -1,4結合した多糖類を主成分とするペプチドグリカン層から形成されており、HELはGlcNAcとMurNAc間の結合を特異的に加水分解する^{3,4}。

HELは3つの α ヘリックス(5-14、26-34、88-100残基)と逆平行型の β シート(42-47、50-54、57-60残基)を含み、分子内に存在する4つのSS結合(Cys6-Cys127、Cys30-Cys115、Cys64-Cys80、Cys76-Cys94)によって安定な立体構造が保たれている(Figure 2-1)。LYZの中で特にHELは乳清タンパク質である α LAのアミノ酸配列と強い類似性を示すが^{5,6}、 Ca^{2+} 結合部位を持たない。一方、同じC型に分類されるウマやハト由来のLYZは Ca^{2+} 結合部位を持つことが知られており、結合定数はそれぞれ $10^{6.4} \text{ M}^{-1}$ 、 $10^{7.2} \text{ M}^{-1}$ である⁷。

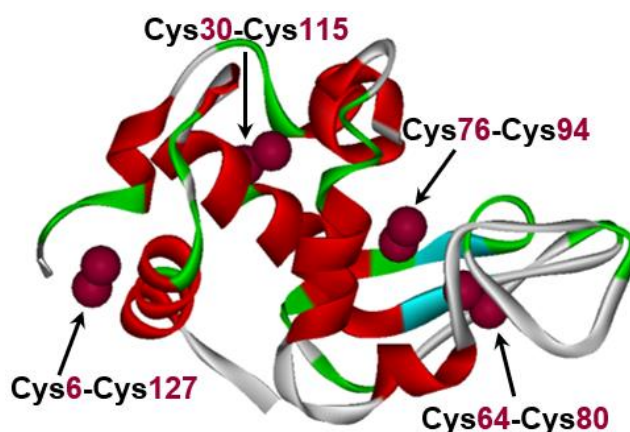


Figure 2-1 HELの立体構造

B. V. D. BergはpH 8.0、20℃、2 M尿素共存下で実験を行ない、Figure 2-2に示すHELの酸化的フォールディング経路を提唱した^{8,9}。R型は非特異的な種々の1SSと2SS中間体を生成し(Phase I)、3種類のdes中間体(des[76-94]、des[64-80]、des[6-127])を形成した後(Phase II)、ゆっくりとN型へと酸化する(Phase III)。Phase IIIはdes[64-80]とdes[6-127]からN型へと酸化され、des[76-94]はPDIによるSS交換を介して他のdes中間体へと異性化する。

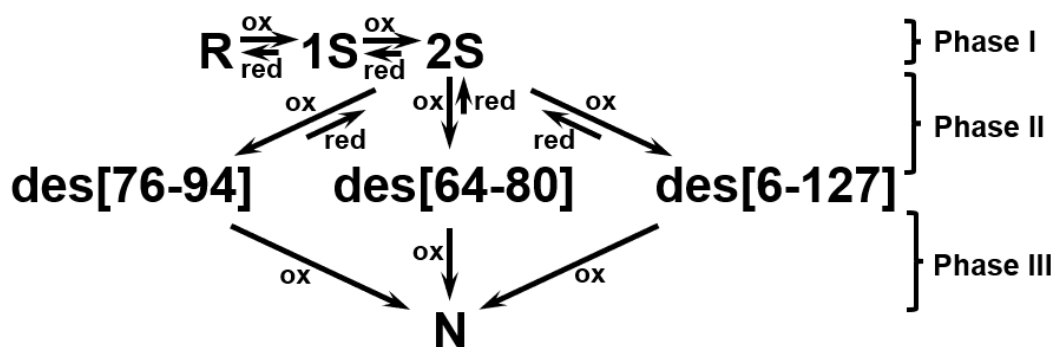


Figure 2-2 以前に提案された HEL の酸化的フォールディング経路

しかしながら、以前に提案されたフォールディング経路では Phase II における des 中間体の前駆体や生理学的条件に近い温度での des 中間体から N 型への酸化プロセス(Phase III)に関して幾つかの疑問が残っていた。そこで、本章では酸化剤に DHS^{ox}を応用し、HEL の酸化的フォールディング経路の詳細な解明を行なった。

2-2 実験操作

2-2-1 R 型の精製

HEL (10 mg)を 700 μ L の 8 M 尿素と 1 mM EDTA を含む 0.1 M Tris buffer (pH 8.0)で溶解し、DTT^{red}(10 mg)を加えて 40 °C で 2 時間還元した。0.1 M AcOH で平衡化させた Shephadex G-25 Fine (1.5×30 cm)で脱塩し、フラクションを 14 mL 分取した。凍結乾燥した後、R 型(1.5 mg)を 4 M 尿素と 1 mM EDTA を含む 0.1 M Tris buffer (pH 8.0)に溶解して UV 測定から濃度を決定し(ϵ_{280} : 33890 cm⁻¹M⁻¹)、40 μ M になる様に 4 M 尿素と 1 mM EDTA を含む 0.1 M Tris buffer (pH 8.0)で希釈した。

2-2-2 DHS^{ox}を用いた酸化的フォールディング

R 型を 100 μ L ずつ分注し、100 μ L の 4 M 尿素と 1 mM EDTA を含む 120 μ M DHS^{ox}を加え、200 μ L の 1 mM EDTA を含む 0.1 M Tris buffer (pH 8.0)で希釈した。5 °C または 35 °C で 1 分から 5 時間フォールディングした。反応停止の際は 300 μ L の 40 mM AEMTS を加えて 25 °C で 10 分間処理し、10 μ L の AcOH を加えた。0.1 M AcOH で平衡化させた Shephadex G-25 Fine (1.5×30 cm)で脱塩し、フラクションを 10 mL 分取した。凍結乾燥した後、1.1 mL の 0.1% TFAaq で溶解した。

2-2-3 HPLC による分析

AEMTS クエンチしたサンプルは Tosoh 製の TSKgel ODS-100V C-18 カラム(4.6×150 mm, 5 μ m)を用いて RP-HPLC で分析を行なった。移動相 A を 0.1% TFAaq、移動相 B を 0.1% TFA/ACN とし、後者の濃度を 14 分間で 20%から 34%、16 分間で 34%から 35%、30 分間で 35%から 38%に増加させて分離した。流速を 0.5 mL/min、カラム恒温槽を 35 °C、UV 波長を 280 nm とした。

2-2-4 ESI-MS による解析

AEMTS クエンチしたサンプルを凍結乾燥した後、0.1% 蟻酸と 0.1% 蟻酸/ACN の混合溶液に溶解させた。Jeol 社製 JMS-100LP 装置を使用して ESI(+)法でイオン化し、質量分析を行なった。標準物質として angiotensin I ($[M+H]^+$: 1296.685)を用いて校正した。

2-3 結果

2-3-1 温度の影響

R 型に対し 3 当量の DHS^{ox} を 5 °C で 2 M の尿素と 1 mM EDTA を含む 0.1 M Tris buffer (pH 8.0)中で反応させた。得られた生成物の遊離 SH 基を AEMTS で修飾して RP-HPLC で分析したところ(Figure 2-3A)、3 種類の間mediateと N 型が観測された。これらの intermediate は Thermolysin による酵素処理からそれぞれ des[76-94]、des[64-80]、des[6-127]であることが明らかになっている¹⁰。DHS^{ox} は R 型に存在する SH 基と迅速且つ定量的に反応して SS 結合を形成するので¹¹、des intermediate は 2SS intermediate からではなく、3SS intermediate の異性化によって生成されることが示唆された。同様の実験を 35 °C で行なったところ(Figure 2-3B)、des[76-94]のみ観測された。

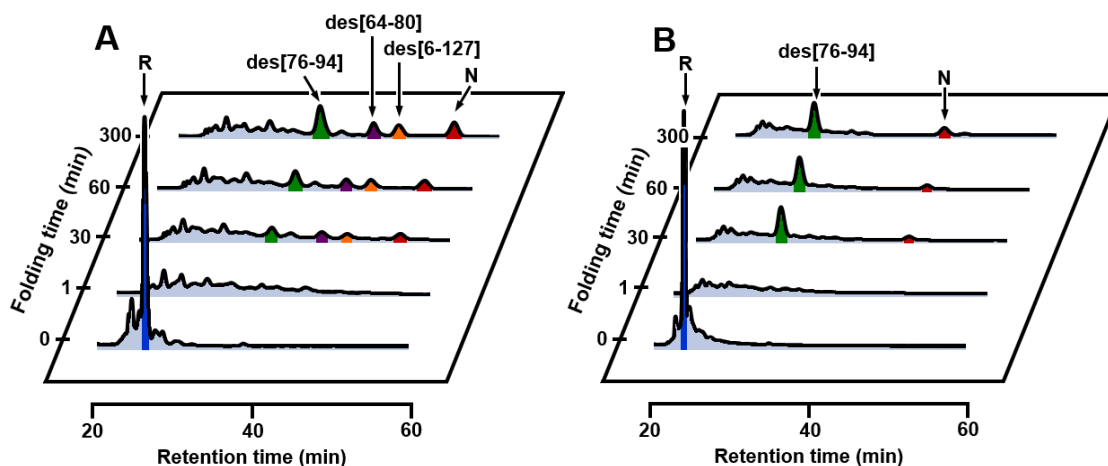


Figure 2-3 酸化的フォールディングから得られた HPLC クロマトグラム

HEL の R 型に対して 3 当量の DHS^{ox} を 2 M の尿素と 1 mM EDTA を含む 0.1 M Tris buffer (pH 8.0)中で反応させ、一定時間後に AEMTS で反応を停止させた。A は 5 °C、B は 35 °C の条件下で行なった時の HPLC クロマトグラムを示す。

Figure 2-4 はフォールディング時間に対する N 型、3 種類の des intermediate の相対的な生成量を示す。des[64-80]と des[6-127]の生成量に 5 °C と 35 °C で有意な差があることが分かる。この結果は 3 種類の des intermediate が異なる熱力学的な安定性を持つことを明確に示した。

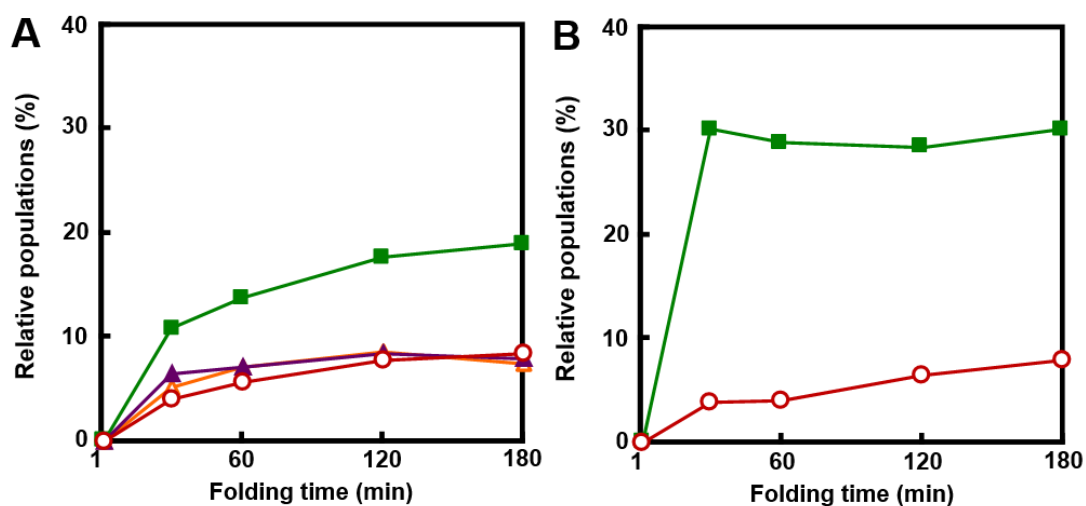


Figure 2-4 フォールディング時間に対する各成分の相対的な生成量の変化
色と記号はN型(赤, ○)、des[76-94](緑, ■)、des[64-80](紫, ▲)、des[6-127](橙, △)を表す。Aは5°C、Bは35°Cの条件下で行なった時の相対的な生成量の変化を示す。

N型の形成はdes[64-80]とdes[6-127]からの酸化と考えられていたが、35°CでもN型が形成されていることから、des[76-94]からN型へ酸化される可能性が示唆された。実際にHELの熱変性曲線(Figure 2-5)は60°Cまで立体構造を保持できることを示している。

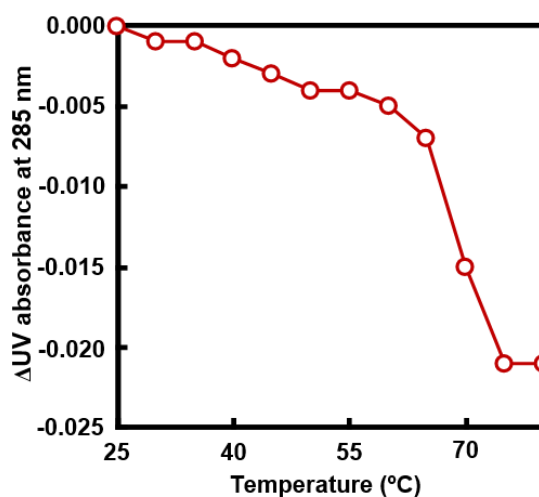


Figure 2-5 HELの熱変性曲線

HELのN型を2Mの尿素と1mM EDTAを含む0.1M Tris buffer (pH 8.0)に溶解させ、25°Cから80°Cまで5°C刻みに温度を変化させながらUV測定を行なった。

2-3-2 酸化的フォールディングに伴うコンフォメーション変化

HELの酸化的フォールディング過程(Figure 2-3A)をUVスペクトルでも観測した(Figure 2-6)。フォールディング初期(1分以内)に284 nmと292 nmの吸光度が増加した。これはSS形成によってTyrやTrpなどの芳香族アミノ酸残基がタンパク質分子の内部に埋め込まれたことを示す。フォールディングが進行し、des中間体やN型が形成され始めると、本来のコンフォメーションを取り戻す様子が観察された。

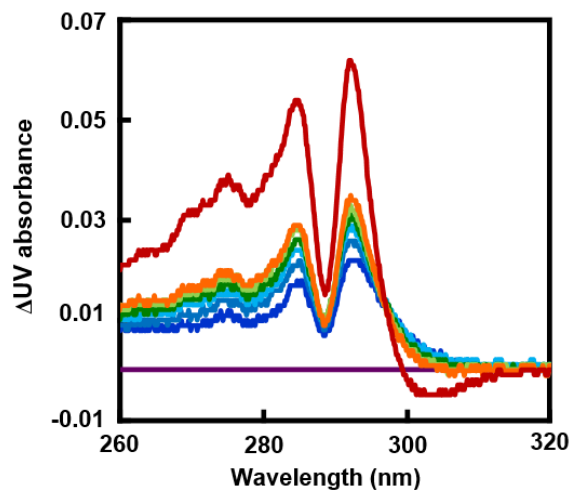


Figure 2-6 酸化的フォールディングから得られたUVスペクトル

HELのR型に対して3当量のDHS^{ox}を2 Mの尿素と1 mM EDTAを含む0.1 M Tris buffer (pH 8.0)中で反応させ、UV測定を行なった。色はR型(紫)、1分(紺)、15分(青)、30分(空)、60分(緑)、120分(黄緑)、180分(橙)、N型(赤)を表す。

2-3-3 des 中間体の構造的な安定性

R 型が 3 当量の DHS^{ox} と反応した場合、des 中間体は 5 °C では反応開始 8 時間、35 °C では反応開始 3 時間で最大の蓄積を示した。この時の Des 中間体と N 型の正確な生成量を調べる為、AEMTS で反応を停止させる前に DTT^{red} を加え、非特異的な中間体(1SS-4SS)を R 型に強制還元(reduction pulse)させた。C. M. Dobson は pH 7.8 で 5 mM の DTT^{red} によって Cys6-Cys127 が還元することを報告している^{12,13}。そこで、加える DTT^{red} の濃度と反応時間を最適化させたところ、5-25 °C では 30 mM の DTT^{red} を 3 分間、35 °C では 5 mM の DTT^{red} を 2 分間で行なうことが妥当だと判断した。この値は文献と凡そ一致するが、HEL の濃度は異なる^{12,13}。Reduction pulse の HPLC クロマトグラムを Figure 2-7 に示す。Des 中間体と N 型をはっきりと観測することができる様になり、これらの化学種の正確な生成量を調べることが可能となった。

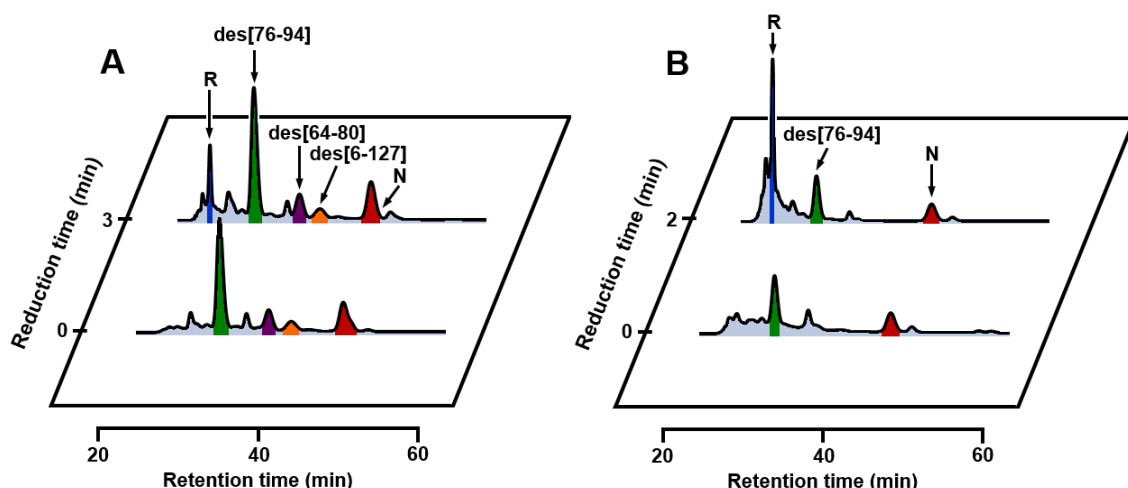


Figure 2-7 Reduction pulse から得られた HPLC クロマトグラム

HEL の R 型に対して 3 当量の DHS^{ox} を 2 M の尿素と 1 mM EDTA を含む 0.1 M Tris buffer (pH 8.0) 中で反応させ、一定時間後に reduction pulse を行なってから AEMTS で反応を停止させた。A は reduction pulse を 5 °C で 30 mM の DTT^{red} を 3 分間、B は reduction pulse を 35 °C で 5 mM の DTT^{red} を 2 分間反応させた時の HPLC クロマトグラムを示す。

次に、5 °C では反応開始 8 時間、35 °C では反応開始 3 時間経過後のサンプルに 1.5 当量の DHS^{ox} を加えることで、R 型や SS 中間体を迅速に強制酸化(oxidation pulse)させた(Figure 2-8)。これらのサンプルは des 中間体や N 型の正確な生成量を求める為に、oxidation pulse 後に Figure 2-7 と同様の reduction pulse の操作を行なっている。5 °C では des[76-94] はゆっくりと、des[64-80] と des[6-127] は迅速に酸化され、N 型が生成してくる様子が観測された。3 種類の des 中間体の減少量は N 型の増加量とほぼ一致しており(Figure 2-9)、des 中間体が N 型へと酸化されたことを示している。この結果から、5 °C では 3 種類の des 中間体の内、des[64-80] と des[6-127] から N 型が形成する経路が優勢であり、des[76-94] は劣勢な前駆体であるこ

とが明らかになった。一方、35℃では des[76-94]の生成量が減少し、N型の生成量が増加した。高温度において des[64-80]と des[6-127]は不安定であることから、N型の生成は des[76-94]の酸化に起因すると判断できる。35℃では des[76-94]を介してN型が支配的に形成されることが明らかになった。

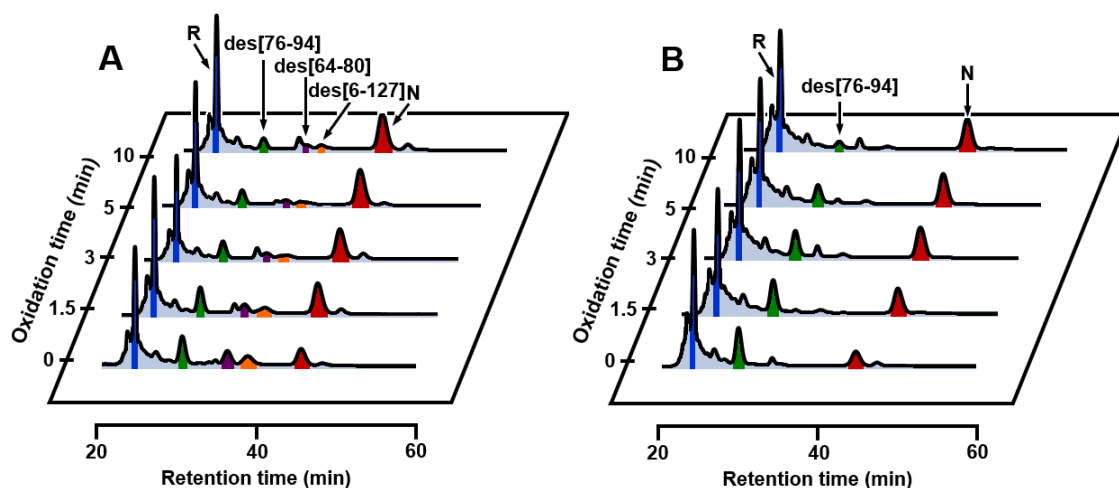


Figure 2-8 Oxidation pulse から得られた HPLC クロマトグラム

HEL の R 型に対して 3 当量の DHS^{ox} を 2 M の尿素と 1 mM EDTA を含む 0.1 M Tris buffer (pH 8.0) 中で反応させ、一定時間後に 1 当量の DHS^{ox} を加えて oxidation pulse を行ない、Figure 2-7 と同様の reduction pulse の操作を行なってから AEMTS で反応を停止させた。A は 5℃、B は 35℃ の条件下で行なった時の HPLC クロマトグラムを示す。

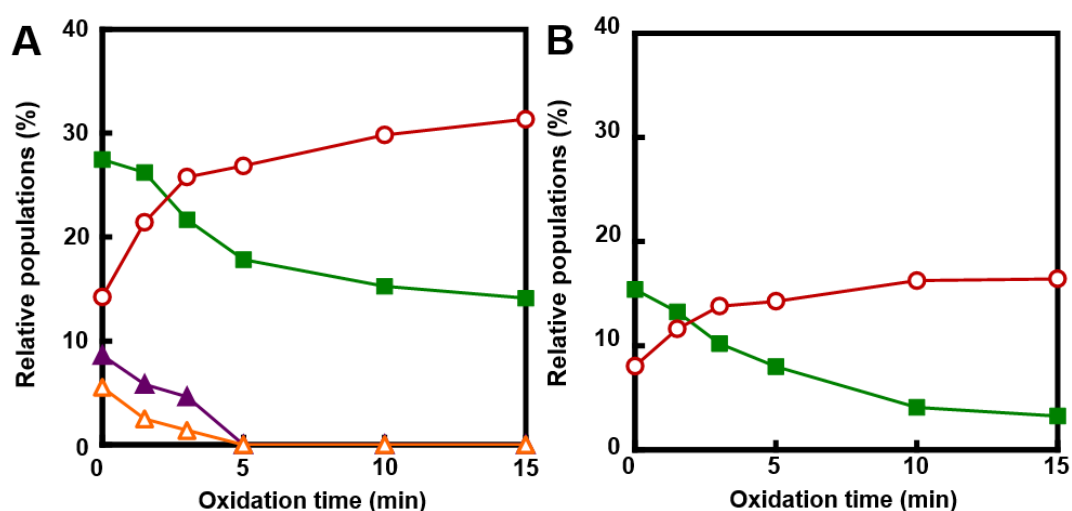


Figure 2-9 酸化時間に対する各成分の相対的な生成量の変化

色と記号は N 型(赤, ○)、des[76-94](緑, ■)、des[64-80](紫, ▲)、des[6-127](橙, △)を表す。A は 5℃、B は 35℃ の条件下で oxidation pulse を行なった時の相対的な生成量の変化を示す。

2-4 結論

本章では酸化剤として迅速且つ化学量論的に SS 形成が可能な DHS^{ox} を HEL の酸化的フォールディングに応用した。5 °C では非特異的な 3SS 中間体から des[76-94]、des[64-80]、des[6-127]が、35 °C では des[76-94]が生成された(Figure 2-3)。以前に提案された経路(Figure 2-2)では非特異的な 2SS 中間体が酸化されて des 中間体を形成すると考えられていたが、非特異的な 3SS 中間体が異性化することで des 中間体を生成することが本研究から示唆された。本研究と以前の研究の経路の相違は、以前の研究で用いられた GSSG/GSH が SS 形成と SS 交換を競合的に起こすのに対し、本研究で用いた DHS^{ox} は酸化能力が高く SS 形成が迅速に完了する為に des 中間体へ異性化する前に 3SS 中間体の蓄積が可能であることに起因する。

非特異的な 3SS 中間体から des 中間体への転移(Phase II)は HEL の持つ本来の立体配座の形成に付随して起こる。本研究でもフォールディング中の UV スペクトルから三次構造が形成する様子が観測された(Figure 2-6)。また、reduction pulse ではフォールディング初期に形成された 1SS-4SS 中間体が DTT^{red} によって R 型へ還元される中、3 種類の des 中間体は全く影響を受けなかったことから、N 型と同様に頑丈な立体構造を持つことが明らかになった(Figure 2-7)。即ち、des 中間体の形成は安定した立体配座を得る上で最も重要な段階である。

Des 中間体から N 型への酸化(Phase III)は以前に提案された経路では主に des[64-80]と des[6-127]の酸化が N 型への直接的な経路であると考えられていた。しかしながら、5 °C における oxidation pulse の結果(Figure 2-8A)は des[64-80]と des[6-127]だけでなく des[76-94]も N 型の前駆体であることを示した。一方、35 °C では des[64-80]と des[6-127]が熱変性して蓄積せず、des 中間体の中で熱力学的に安定な des[76-94]から N 型へと酸化される(Figure 2-8B)。des[76-94]が高温でも熱変性せずに安定であると云うことは、Cys76-Cys94 が Cys64-Cys80 と Cys6-Cys127 に比べて立体配座の熱力学的な安定性に重要ではないことを示す。哺乳類の体温が 35-40 °C であることを考慮すると、生理学的条件では des[76-94]から N 型へ向かう経路が支配的であると推測される。また、des[30-115]が生成されない理由として、疎水性コアに存在する Cys30-Cys115 が優先的に架橋されて速度論的に des[30-115]の形成が制限されていることが挙げられる。上記の結果に基づき、本研究から明らかになった HEL の酸化的フォールディング経路を Figure 2-10 に示す¹⁴。

第 2 章を要約すると、我々は以前に提案された経路とは異なる HEL の酸化的フォールディング経路を提案した。HEL のフォールディングは低温(5 °C)では 3 種類の des 中間体(des[76-94]、des[64-80]、des[6-127])が酸化されて N 型となるが、高温(35 °C)では des[76-94]のみが前駆体であり、温度に依存して経路を切り替えていることが明らかになった。

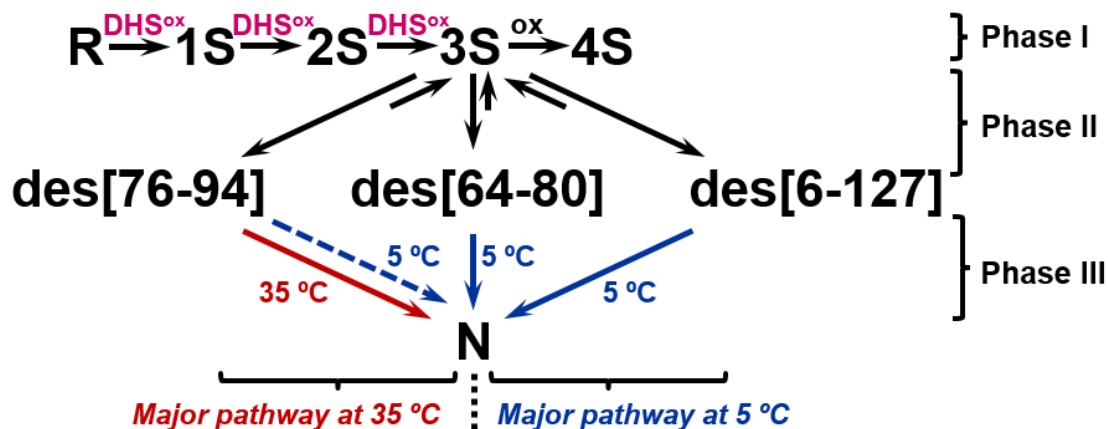


Figure 2-10 DHS^{ox} を用いた HEL の酸化的フォールディング経路

2-5 参考文献

- (1) Callewaert, L., and Michiels, C. W. (2010) Lysozymes in the animal kingdom. *J. Biosci.* 35, 127–160.
- (2) Jolles, P. (1969) Lysozymes: A chapter of molecular biology. *Angew. Chemie Int. Ed. English* 8, 227–239.
- (3) Rupley, J. A. (1964) The hydrolysis of chitin by concentrated hydrochloric acid, and the preparation of low-molecular-weight substrate for lysozyme. *Biochim. Biophys. Acta* 83, 245–255.
- (4) Holler, E., Rupley, J. A., and Hess, G. P. (1975) Productive and unproductive lysozyme-chitosaccharide complexes. Kinetic investigations. *Biochemistry* 14, 2377–2385.
- (5) Vanaman, T. C., Brew, K., and Hill, R. L. (1970) The disulfide bonds of bovine α -lactalbumin. *J. Biol. Chem.* 245, 4583–4590.
- (6) Brew, K., Castellino, F. J., Vanaman, T. C., and Hill, R. L. (1970) The complete amino acid sequence of bovine α -lactalbumin. *J. Biol. Chem.* 245, 4570–4582.
- (7) Kikuchi, M., Kawano, K., and Nitta, K. (1998) Calcium-binding and structural stability of echidna and canine milk lysozymes. *Protein Sci.* 7, 2150–2155.
- (8) Van Den Berg, B. V.D., Chung, E. W., Robinson, C. V., Mateo, P. L., and Dobson, C. M. (1999) The oxidative refolding of hen lysozyme and its catalysis by protein disulfide isomerase. *EMBO J.* 18, 4794–4803.
- (9) Van Den Berg, B. V.D., Chung, E. W., Robinson, C. V., and Dobson, C. M. (1999) Characterisation of the dominant oxidative folding intermediate of hen lysozyme. *J. Mol. Biol.* 290, 781–796.
- (10) 柴垣航. (2011) ニワトリ卵白リゾチームの酸化的フォールディング経路の再検証および鍵中間体の特性. 東海大学大学院平成23年度修士論文.
- (11) Arai, K., Dedachi, K., and Iwaoka, M. (2011) Rapid and quantitative disulfide bond formation for a polypeptide chain using a cyclic selenoxide reagent in an aqueous medium. *Chem. - A Eur. J.* 17, 481–485.
- (12) Radford, S. E., Woolfson, D. N., Martin, S. R., Lowe, G., and Dobson, C. M. (1991) A three-disulphide derivative of hen lysozyme. Structure, dynamics and stability. *Biochem. J.* 273, 211–217.

- (13) Eyles, S. J., Radford, S. E., Robinson, C. V., and Dobson, C. M. (1994) Kinetic consequences of the removal of a disulfide bridge on the folding of hen lysozyme. *Biochemistry* 33, 13038–13048.
- (14) Arai, K., Shibagaki, W., Shinozaki, R., and Iwaoka, M. (2013) Reinvestigation of the oxidative folding pathways of hen egg white lysozyme: Switching of the major pathways by temperature control. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 13194–13212.

第3章 Bovine α -lactalbumin の酸化的フォールディング

3-1 緒言

乳清タンパク質の α -lactalbumin (α LA)は 123 残基から構成される分子量 14,175 Da の比較的小さなタンパク質である^{1,2}。乳腺から分泌される α LA は $\beta(1,4)$ -ガラクトシルトランスフェラーゼ(B4GalT1)に結合し、基質であるグルコースへの特異性や親和性を高める。この複合体はウリジン二リン酸ガラクトース(UDP-Gal)からガラクトシル基を転移させ、ラクトースを生合成する糖合成酵素として働く (Figure 3-1)。反応はゴルジ体内腔で起こり、 Mn^{2+} を必要とする。

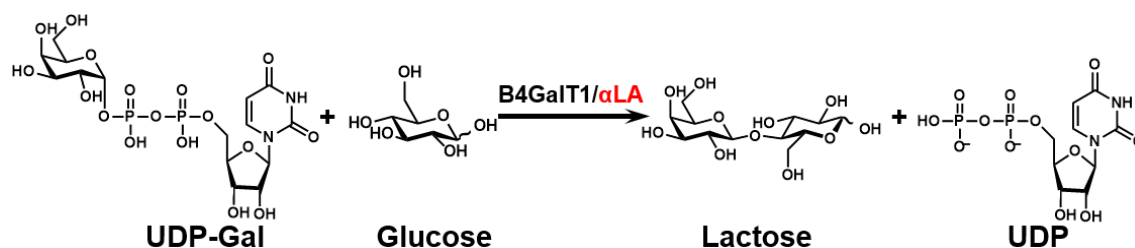


Figure 3-1 α LA の酵素反応

α LA の立体構造は大きな α ヘリックス領域と小さな β シート領域に分かれている³ (Figure 3-2)。 α ヘリックス領域は主となる 3 つの α ヘリックス(5-11、23-24、86-98 残基)と 2 つの短い 3_{10} ヘリックス(18-20、115-118 残基)を、 β シート領域は逆平行型の β シート(41-44、47-50、55-56 残基)と短い 3_{10} ヘリックス(77-80 残基)をそれぞれ含む³。分子内に 4 つの SS 結合(Cys6-Cys120、Cys28-Cys111、Cys61-Cys77、Cys73-Cys91)を持っており^{1,2}、この内 Cys73-Cys91 と Cys61-Cys77 の SS 結合は 2 つのドメインを保持する上で特に重要である。また、Cys73-Cys91 の架橋は Ca^{2+} の配位結合を可能にする。 Ca^{2+} の結合は 82、87、88 残基に位置する Asp のカルボキシル基と 79、84 残基に位置するペプチド骨格のカルボニル基の O が配位子となっている³。

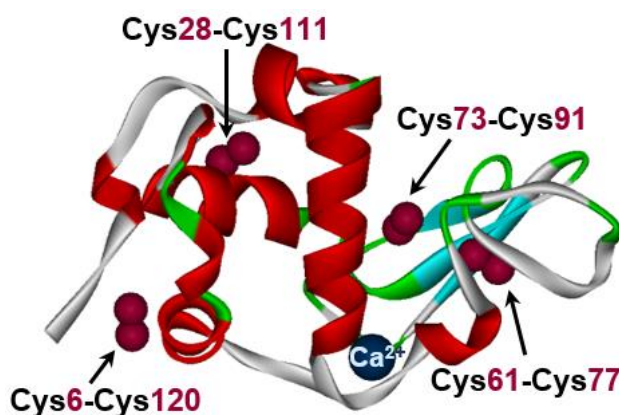


Figure 3-2 α LA の立体構造

入手が容易で分離・精製が簡単な α LA はフォールディング研究のモデルタンパク質として古くからの研究対象であり、フォールディング初期に部分的に N 状態と同様の二次構造を持つ中間体、MG 状態を形成することが知られている^{4,6}。この MG 状態は生体内でオレイン酸などの乳脂肪と複合体を形成し、腫瘍細胞に致死的な働きを持つことが分かった^{7,8}。酸化的フォールディングは Figure 3-3 に示す様に Ca^{2+} の有無によって経路が異なることが知られている。 Ca^{2+} 非共存では hirudin と同様に SS 形成と SS 交換の競合的な反応の中で、try-and-error を繰り返して様々な中間体を形成しながら N 型を模索する⁹。一方、 Ca^{2+} 共存では BPTI と同様に特異的な 2 種類の中間体を蓄積する。J. Y. Chang は GSSG/GSH を酸化剤に用いて、この 2 種類の中間体(α LA-IIA、 α LA-IIIA)の SS 結合を同定し、前者が Cys61-Cys77 と Cys73-Cys91 の架橋を持つ 2S 中間体、後者を α LA-IIA の SS 結合に加えて Cys28-Cys111 の架橋を持つ 3S 中間体であると報告した^{10,11}。

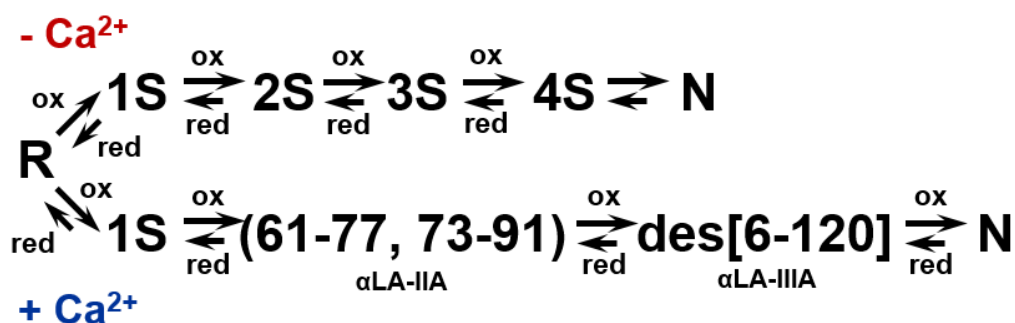


Figure 3-3 以前に提案された α LA の酸化的フォールディング経路

しかしながら、温度、変性剤、pH、 Ca^{2+} を除く他の金属イオンの種類や濃度が酸化的フォールディング経路にどの様に影響を及ぼすのか議論はされていない。本章では酸化剤に DHS^{ox} を応用し、 α LA の酸化的フォールディング経路を検証すると共に、観測される特異的な中間体の熱力学的な安定性について明らかにすることを目的として検討を行なった。

3-2 実験操作

3-2-1 R 型の精製

α LA (6 mg)を 600 μ L の 5 M GdmCl を含む 0.1 M Tris buffer (pH 8.5)で溶解し、DTT^{red} (30 mg)を加えて 25 °C で 2 時間還元した。0.1 M Tris buffer (pH 8.0)で平衡化させた Shephadex G-25 Fine (1.5×30 cm)で脱塩し、フラクションの頂点を 4 mL 分取した。得られた R 型は UV 測定から濃度を決定し(ϵ_{268} : 22850 cm⁻¹M⁻¹)、30 μ M になる様に 0.1 M Tris buffer (pH 8.0)で希釈した。

3-2-2 DHS^{ox} を用いた酸化的フォールディング

R 型を 100 μ L ずつ分注し、100 μ L の 0.1 M Tris buffer (pH 8.0)または 10 mM CaCl₂ を含む 0.1 M Tris buffer (pH 8.0)で希釈した。100 μ L の 30 μ M DHS^{ox} または 5 mM CaCl₂ を含む 30 μ M DHS^{ox} を加え、5 °C で 1 分から 24 時間フォールディングした。反応は 2 つの方法で停止させた。(A) 15 μ L の 1 M HCl を加え、700 μ L の 0.1% TFAaq で希釈した。(B) 300 μ L の 40 mM AEMTS を加えて 25 °C で 10 分間反応させ、15 μ L の 1 M HCl を加えた。0.1 M AcOH で平衡化させた Shephadex G-25 Fine (1.5×30 cm)で脱塩し、フラクションを 10 mL 分取した。凍結乾燥した後、1 mL の 0.1% TFAaq で溶解した。

必要に応じて DHS^{ox} の濃度(60, 90, 120 μ M)、温度(35, 45 °C)、変性剤の濃度(0.625 M GdmCl)、pH (0.1M Bis-Tris buffer (pH 6.8))、金属イオンの種類(5 mM NaCl, 5 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM ZnCl₂, 0.5 mM MnCl₂)を変更して、同様に酸化的フォールディング実験を行なった。

3-2-3 HPLC による分析

2 種類の方法でクエンチしたサンプルを RP-HPLC で分析を行なった。酸クエンチしたサンプル(A)は Agilent 製の ZORBAX 300SBC-18 カラム(4.6×150 mm, 5 μ m)を使用した。移動相 A を 0.1% TFAaq、移動相 B を 0.1% TFA/ACN とし、後者の濃度を 60 分間で 30%から 48%に増加させて分離した。AEMTS クエンチしたサンプル(B)は Tosoh 製の TSKgel ODS-100V C-18 カラム(4.6×150 mm, 5 μ m)を使用した。移動相 A を 0.1% TFAaq、移動相 B を 0.1% TFA/ACN とし、後者の濃度を 10 分間で 20%から 37.5%、50 分間で 37.5%から 41.5%に増加させて分離した。カラム恒温槽は前者を 25 °C、後者を 35 °C とし、どちらも流速を 0.5 mL/min、UV 波長を 280 nm とした。

3-2-4 ESI-MS による解析

AEMTS クエンチしたサンプル(B)を凍結乾燥した後、0.1% 蟻酸と 0.1% 蟻酸/ACN の混合溶液に溶解させた。Jeol 社製 JMS-100LP 装置を使用して ESI(+)法でイオン化し、質量分析を行なった。標準物質として angiotensin I ([M+H]⁺: 1296.685)を用いて校正した。

3-3 結果

3-3-1 DHS^{ox}を使った定量的な R 型の酸化

R 型に対し 1 当量の DHS^{ox} を 5 °C で 2 mM の EDTA を含む 0.1 M Tris buffer (pH 8.0) 中で反応させた。得られた生成物の遊離 SH 基を AEMTS で修飾して ESI-MS で分子量を測定したところ (Figure 3-4 及び Table 3-1)、主として 1SS 中間体、僅かな量の R 型と 2SS 中間体が観測された。AEMTS はタンパク質の立体配座に影響を与えることなく SH 基を速やかに $-SSCH_2CH_2NH_3^+$ に変換する。従って、AEMTS 修飾されたタンパク質はペプチド鎖に存在する SH 基の数に依存して本来の質量よりも大きい値となる。同様に R 型に対し 2、3、4 当量の DHS^{ox} と反応させた時、それぞれ主として 2SS、3SS、4SS 中間体が得られた。このことから、DHS^{ox} は α LA の R 型に存在する SH 基と迅速且つ定量的に反応して SS 結合を形成することが確認された。

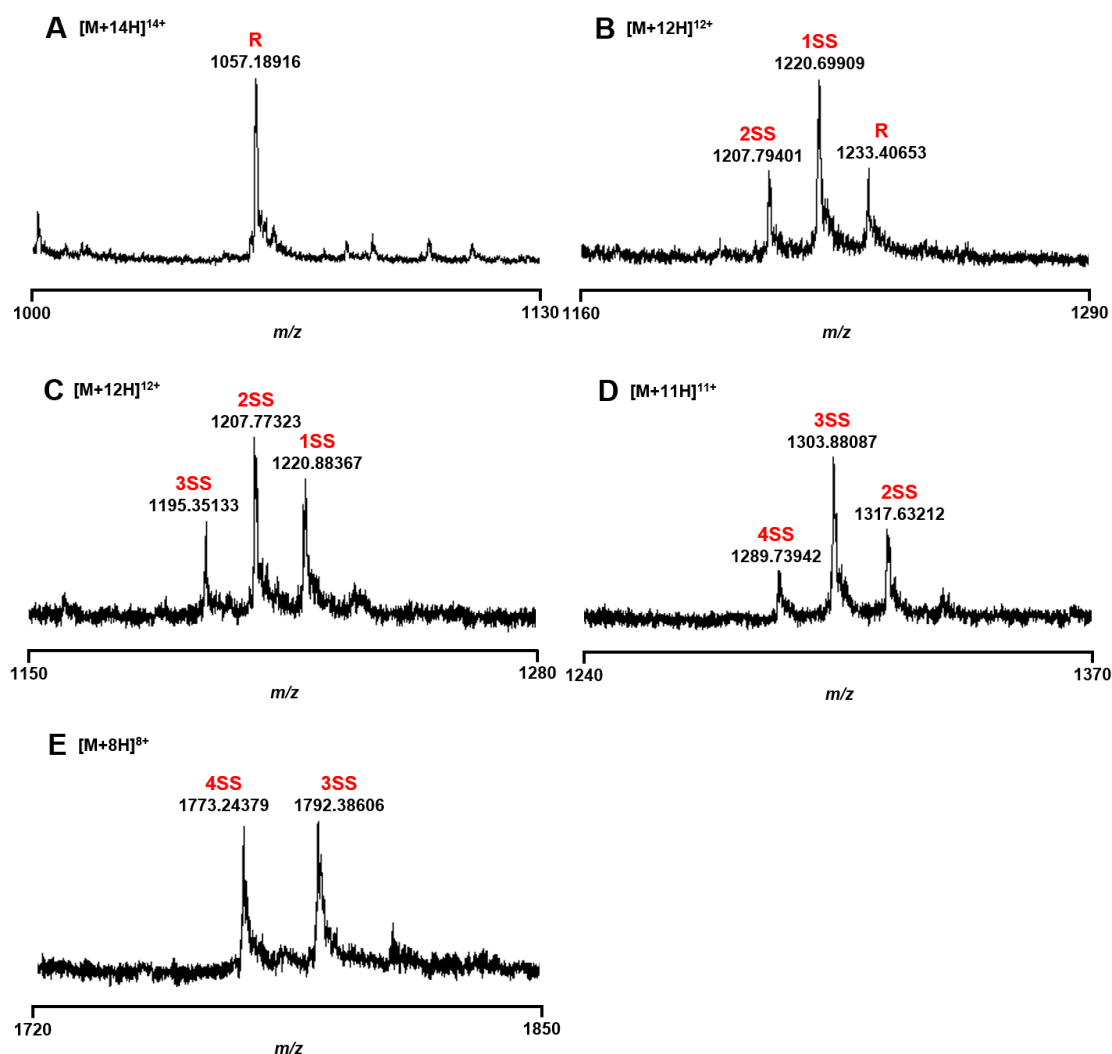


Figure 3-4 1-4 当量の DHS^{ox} を反応させた時の ESI-MS スペクトル

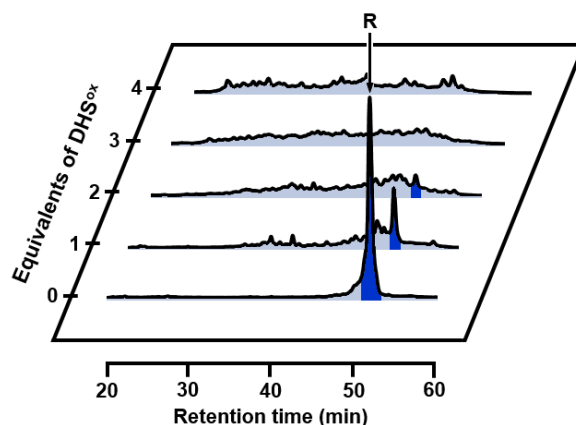
5 °C で α LA の R 型に対し 1-4 当量の DHS^{ox} を 2 mM の EDTA を含む 0.1 M Tris buffer (pH 8.0) 中で反応させ、1 分間後に AEMTS で反応を停止させた。A は R 型、B は 1 当量、C は 2 当量、D は 3 当量、E は 4 当量の DHS^{ox} を加えた時の ESI-MS スペクトルを示す。

Table 3-1 Figure 3-4 で得られたフラグメントの一覧

Species	Expected M ^a	[M+8H] ⁸⁺	[M+11H] ¹¹⁺	[M+12H] ¹²⁺	[M+14H] ¹⁴⁺
R+8×AEMTS	14784.9862			1233.40653 (1233.0899)	1057.18916 (1057.0782)
1SS+6×AEMTS	14632.9420			1220.69909 1220.88367 (1220.4196)	
2SS+4×AEMTS	14480.8978		1317.63212 (1317.4530)	1207.79401 1207.77323 (1207.7492)	
3SS+2×AEMTS	14328.8536	1792.38606 (1792.1144)	1303.88087 (1303.6308)	1195.35133 (1195.0789)	
4SS	14176.8094	1773.24379 (1773.1089)	1289.73942 (1289.8086)		

^a 多価イオンの理論値は()で示す。

上記と同じ反応条件で R 型と DHS^{ox} を反応させ、AEMTS クエンチの代わりに酸クエンチしたサンプルを RP-HPLC で分析したところ(Figure 3-5)、SS 形成がランダムに起こり非特異的に 1SS から 4SS までの中間体が生成していることが分かった。この結果は DHS^{ox} を用いた場合、SS 形成が SS 交換よりも迅速に進行すると云う以前の研究と一致する¹²。

Figure 3-5 1-4 当量の DHS^{ox} を反応させた時の HPLC クロマトグラム

5 °C で αLA の R 型に対し 1-4 当量の DHS^{ox} を 10 mM の EDTA を含む 0.1 M Tris buffer (pH 8.0) 中で反応させ、1 分間後に 1 M HCl で反応を停止させた。

3-3-2 フォールディング中間体の SS 交換

DHS^{ox} との反応によってフォールディング初期に形成された SS 中間体が特定の SS 中間体へ SS 交換するのかを調べる為に、SS 形成が完了した後の反応溶液をそのまま長時間放置して、生じる中間体に変化が起こるかどうか調べた。しかし、EDTA を含む buffer 中では HPLC クロマトグラム上で、初期に形成された SS 中間体からの変化は観測されなかった (Figure 3-5)。また、 α LA の SH 基は DHS^{ox} によってランダムに架橋され、非常に速く酸化されることが判明した。一方、EDTA を含まない buffer 中で R 型に 1 当量の DHS^{ox} を反応させたところ (Figure 3-6A)、5 時間後に僅かな量の N 型と 1 種類の特異的な SS 中間体 (I-1) の形成が観測された。同様の実験を 5 mM の CaCl₂ 共存下で行なったところ (Figure 3-6B)、I-1 の形成が顕著になり、第 2 の SS 中間体 (I-2) の生成も確認された。

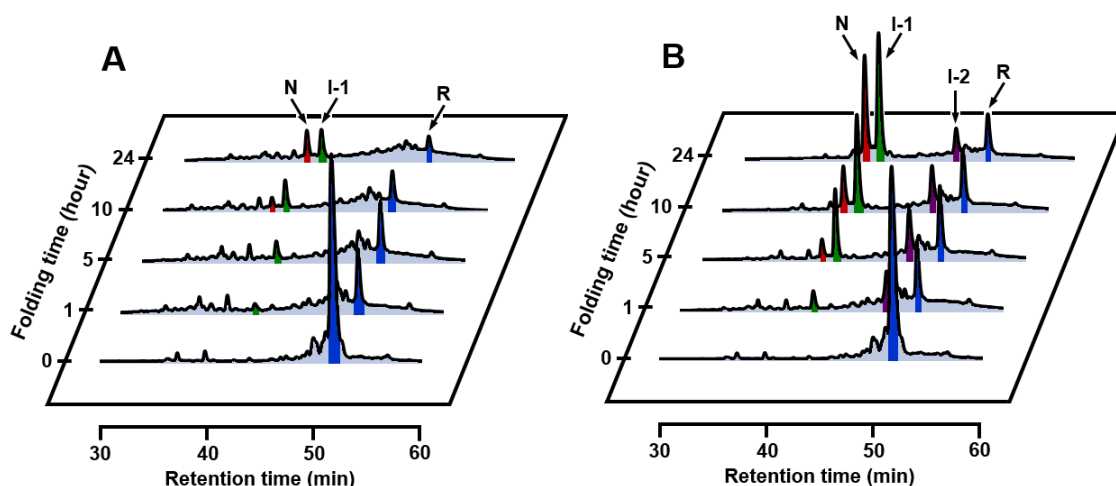


Figure 3-6 EDTA 非共存下における酸化的フォールディングから得られた HPLC クロマトグラム

5 °C で α LA の R 型に対し 1 当量の DHS^{ox} を 0.1 M Tris buffer (pH 8.0) 中で反応させ、一定時間後に 1 M HCl で反応を停止させた。A は CaCl₂ 非共存、B は 5 mM の CaCl₂ 共存の条件下で行なった時の HPLC クロマトグラムを示す。

Figure 3-7 はフォールディング時間に対する R 型、N 型、I-1、I-2 の相対的な生成量を示す。Ca²⁺非共存下では R 型の生成量が徐々に減少し、N 型がゆっくりと増加している。これは溶液に残存する微量の金属イオンが空気酸化を触媒している為と考えられる。N 型と I-1 は EDTA を含む buffer 中では蓄積しないので、これらの形成には EDTA がキレート可能な金属イオン (Fe³⁺ など) が必要であると推測される。Ca²⁺共存下における R 型の酸化 (即ち、R 型の減少) は Ca²⁺非共存下とほぼ同じ反応速度であったが、N 型の形成は Ca²⁺非共存下よりも遥かに速く起こった。I-1 の生成量は同時刻の Ca²⁺非共存下よりも大きかった。I-2 は I-1 よりも速く形成され、N 型は I-1 が蓄積した後に形成し始めた。これはフォールディング経路上 I-2 は I-1 の前駆体であり、I-1 が N 型の前駆体であることを示唆している。Ca²⁺は空気酸化を促進することはないが、I-1 や I-2、N 型の形成を促進することが明らかになった。

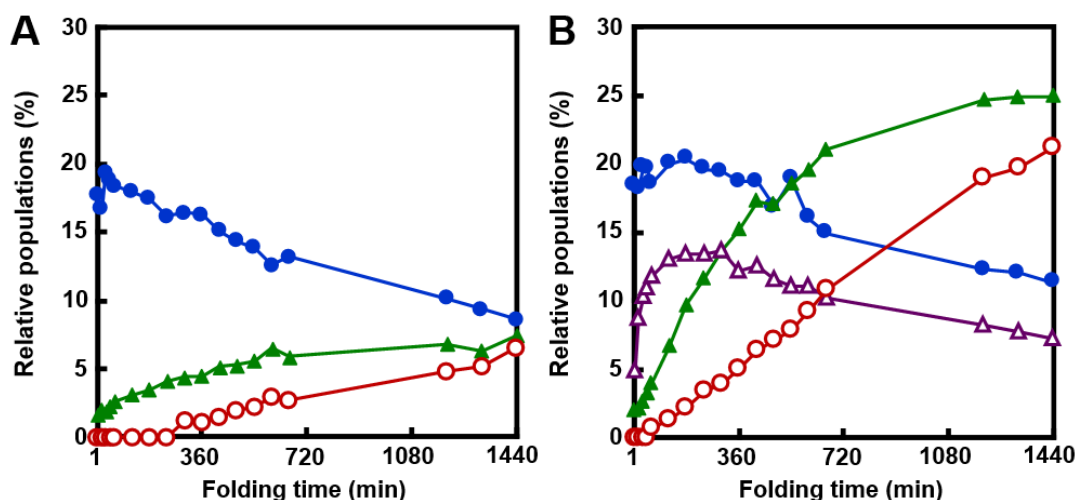


Figure 3-7 フォールディング時間に対する各成分の相対的な生成量の変化
色と記号は R 型(青, ●)、N 型(赤, ○)、I-1(緑, ▲)、I-2(紫, △)を表す。A は CaCl_2 非共存、B は 5 mM の CaCl_2 共存の条件下で行なった時の相対的な生成量の変化を示す。

3-3-3 金属イオンの影響

Ca^{2+} 遊離型 αLA (apo- αLA)には Mg^{2+} や Na^+ などの金属イオンが β シート領域に存在する Ca^{2+} 結合部位に弱く配位することが知られている^{3,13,14}。そこで、 CaCl_2 の代わりに NaCl 、 KCl 、 MgCl_2 、 ZnCl_2 、 MnCl_2 の共存下で酸化的フォールディングを行なった。 MnCl_2 を除く各金属塩化物の濃度は 5mM とした。 MnCl_2 の場合は 5 mM MnCl_2 では恐らく pH8 で生じる $\text{Mn}(\text{OH})_2$ の空気酸化によって溶液の色が赤褐色に変化したので MnCl_2 の濃度を 0.5 mM とした。また、 ZnCl_2 は 0.1 M Tris buffer (pH 8.0)で $\text{Zn}(\text{OH})_2$ の白色沈殿を生じたので、0.1 M Bis-Tris buffer (pH 6.8)でフォールディングを行なった。 NaCl 、 KCl 、 MgCl_2 共存下で得られた HPLC クロマトグラム(Figure 3-8A-C)は Ca^{2+} 非共存下で得られた HPLC (Figure 3-6A)とほぼ一致した。このことは、 Na^+ や K^+ 、 Mg^{2+} は Ca^{2+} 結合部位に R 型の状態では配位せず、フォールディング初期に生成する SS 中間体の熱力学的な安定性に殆ど影響しないことを意味する。ただし、注意深く観察すると、 MgCl_2 共存下における I-1 の生成量は NaCl や KCl の場合よりも僅かに多いことが分かる。実際に、これら金属イオンの結合定数はそれぞれ 100 ± 10 、 8 ± 3 、 $2000 \pm 100 \text{ M}^{-1}$ であり、 Ca^{2+} は 20 °C で $3 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ である³。 Ca^{2+} とは異なる結合部位に配位する Zn^{2+} は、20 時間後に少量の I-1 のみを生成した(Figure 3-8D)。これは 0.1 M Bis-Tris buffer (pH 6.8)中でフォールディング反応を行なった為であり、この条件では SS 中間体の SS 交換や空気酸化は著しく遅くなることを示している(Figure 3-9)。一方、 MnCl_2 共存下では濃度が 0.5 mM であるのにも関わらず少量の I-1 が観測され、N 型は既に 5 時間後には生成していた(Figure 3-8E)。従って、酸化的フォールディングは CaCl_2 共存下よりも MnCl_2 共存下の方が迅速に進行した。 Mn^{2+} が SS 中間体を 4SS 中間体ではなく N 型へと効果的に導くことができる理由は明らかではないが、次の Mn^{2+} の特徴が N 型に向かって強いバイアスを掛けられていると考えられる。 Mn^{2+} のイオン半径が Ca^{2+} のイオン半径とほぼ同じであり、 Ca^{2+} 結合部位

への配位が可能であることが報告されている³。この配位が I-1 の熱力学的な安定性を著しく高めたと推定される。また、Mn 原子がいろいろな酸化数を取り得る為に、 Mn^{2+} が SH 基の空気酸化を触媒し、SS 形成を促進したことも考えられる。

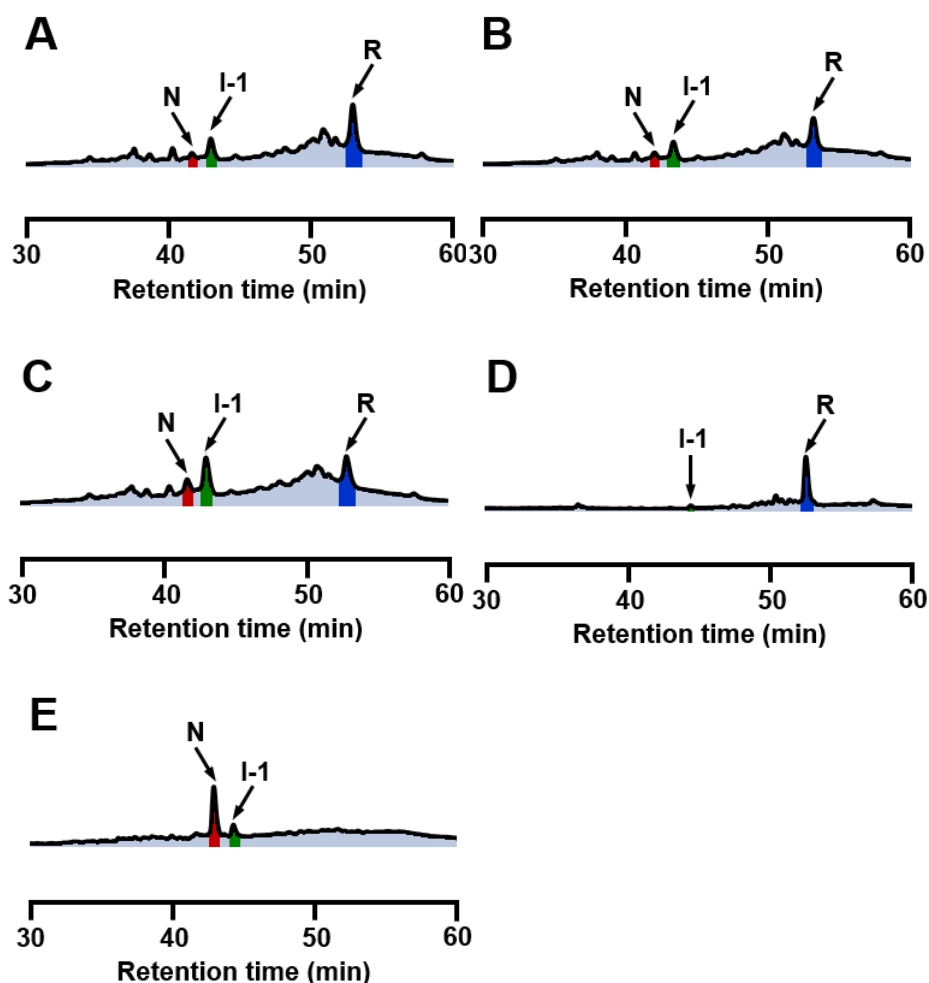


Figure 3-8 様々な金属イオン共存下における酸化的フォールディングから得られた HPLC クロマトグラム

5 °C で α LA の R 型に対し 1 当量の DHS^{ox} を加え、一定時間後に 1 M HCl で反応を停止させた。A は 5 mM の NaCl 共存(pH 8.0 で 10 時間)、B は 5 mM の KCl 共存(pH 8.0 で 10 時間)、C は 5 mM の $MgCl_2$ 共存(pH 8.0 で 10 時間)、D は 5 mM の $ZnCl_2$ 共存(Bis-Tris buffer pH 6.8 で 20 時間)、E は 0.5 mM の $MnCl_2$ 共存(60 mM Tris buffer pH 8.0 で 5 時間)の条件下で行なった時の HPLC クロマトグラムを示す。

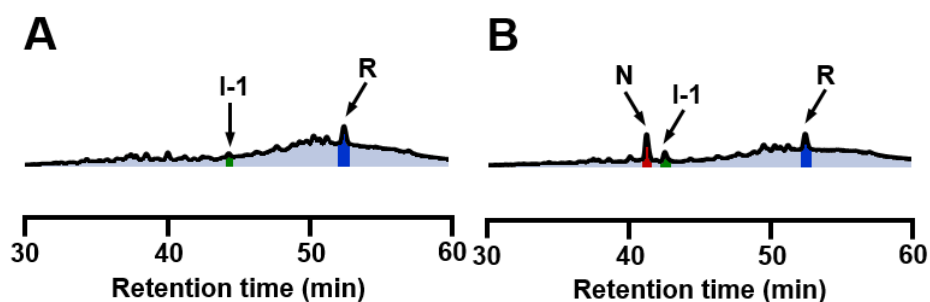


Figure 3-9 pH 6.8 における酸化的フォールディングから得られた HPLC クロマトグラム
5 °C で α LA の R 型に対し 1 当量の DHS^{ox} を 0.1 M Bis-Tris buffer (pH6.8) 中で反応させ、20 時間後に 1 M HCl で反応を停止させた。A は CaCl₂ 非共存、B は 5 mM の CaCl₂ 共存の条件下で行なった時の HPLC クロマトグラムを示す。

3-3-4 I-1 と I-2 の同定

α LA の酸化的フォールディング中に観測された 2 種類の特異的な中間体 I-1 と I-2 は N 型へのフォールディング経路上に存在する重要な中間体と考えられる。I-1 と I-2 が有する SS 結合の数の特徴付ける為に、AEMTS で修飾したこれらの中間体を単離して ESI-MS 測定を行なった。その結果、分子量は I-1 が 14,328.7 Da、I-2 が 14,482.9 Da であった (Figure 3-10 及び Table 3-2)。このことは、AEMTS (即ち、 $-\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_3^+$) がそれぞれ 2 個と 4 個結合したことを示しており、I-1 が 3SS 中間体、I-2 が 2SS 中間体であることが分かった。HPLC の保持時間を文献と比較することで、I-1 を des[6-120]、I-2 を (61-77, 73-91) と同定した^{10,11}。I-1 と I-2 が共に Ca²⁺ 結合部位の近くに存在する 2 つの SS 結合、Cys61-Cys77 および Cys73-Cys91 を持つことは興味深いことである。Ca²⁺ の結合は β シート領域の熱力学的な安定性を高め、2 つの天然型の SS 結合を円滑に形成するのに役立つ。これが Ca²⁺ 非共存下で I-1 と I-2 が殆ど観測されない理由であると推定される。

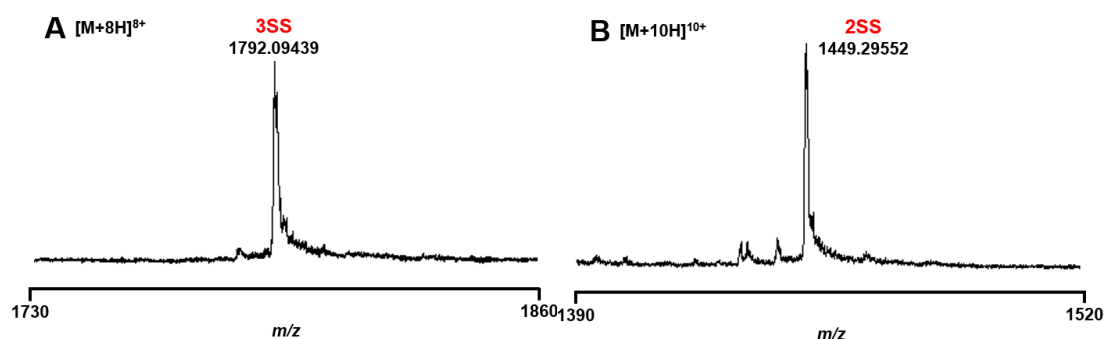


Figure 3-10 I-1 と I-2 の ESI-MS スペクトル

5 °C で α LA の R 型に対し 1 当量の DHS^{ox} を 5 mM の CaCl₂ を含む 0.1 M Tris buffer (pH 8.0) 中で反応させ、5 時間後に AEMTS で反応を停止させた。得られたサンプルを HPLC で分析し、I-1 と I-2 を単離・精製した後、MS 測定を行なった。A は I-1、B は I-2 の ESI-MS スペクトルを示す。

Table 3-2 Figure 3-10 で得られたフラグメントの一覧

Species	Expected M ^a	[M+8H] ⁸⁺	[M+10H] ¹⁰⁺
I-1: (3SS)+2×AEMTS	14328.8536	1792.09439 (1792.1144)	
I-2: (2SS)+4×AEMTS	14480.8978		1449.29552 (1449.0975)

^a 多価イオンの理論値は()で示す。

3-3-5 I-1 と I-2 の構造的な安定性

Ca²⁺共存下で R 型が 1 当量の DHS^{ox} と反応した場合、I-2 は反応開始 5 時間で最大の蓄積を示した。この段階でさらに 1 当量の DHS^{ox} を加えることで、R 型や SS 中間体を迅速に強制酸化(oxidation pulse)させた。Figure 3-11 は oxidation pulse を行なった後に AEMTS クエンチしたサンプルの HPLC クロマトグラムである。R 型は oxidation pulse によって急速に消失し、I-2 は 1 分以内で酸化された。I-1 は 3 分後でも酸化されずに残った。もし、I-1 や I-2 が非天然型の SS 結合を持つ 3SS や 2SS 中間体であれば、oxidation pulse で形成されるのは 4SS 中間体である。しかし、I-1 と I-2 の減少量は N 型の増加量とほぼ一致しており (Figure 3-12)、I-1 や I-2 が N 型へと酸化されたことを示している。この結果は I-1 と I-2 が天然の SS 結合を持ち、N 型へ向かうフォールディング経路上の重要な中間体であることを支持した。

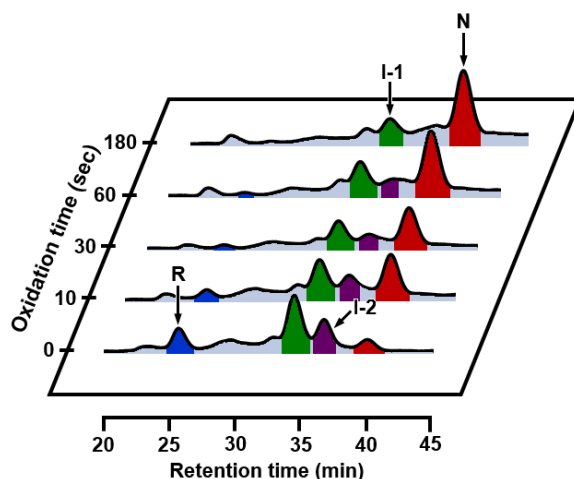


Figure 3-11 Oxidation pulse から得られた HPLC クロマトグラム

5 °C で αLA の R 型に対し 1 当量の DHS^{ox} を 5 mM の CaCl₂ を含む 0.1 M Tris buffer (pH 8.0) 中で反応させ、5 時間後に 1 当量の DHS^{ox} を加えて oxidation pulse を行なってから AEMTS で反応を停止させた。

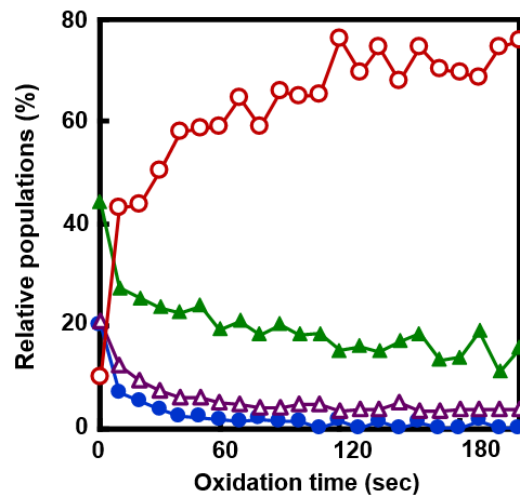


Figure 3-12 酸化時間に対する各成分の相対的な生成量の変化
色と記号は R 型(青, ●)、N 型(赤, ○)、I-1(緑, ▲)、I-2(紫, △)を表す。

一方、5 時間後のサンプルに様々な濃度の DTT^{red}を加えて逆に強制還元(reduction pulse)を行なったところ(Figure 3-13)、R 型と I-1 のピーク面積は増加、N 型は減少する様子が観測されたが、I-2 は殆ど変化しなかった。R 型のピーク面積が増加したのはランダムに形成された非特異的な SS 中間体が DTT^{red}によって R 型へと還元されたからであろう。I-1 のピーク面積の増加と N 型の減少は N 型の Cys6-Cys120 が還元されたことに起因していると考えられる。この天然型の SS 結合(Cys6-Cys120)は α ヘリックス領域に存在し、タンパク質分子の外側に露出している為に、4 つの SS 結合の中で最初に DTT^{red}との反応が起こり易い^{15,16}。Ca²⁺結合部位の近くに存在する 2 つの天然型の SS 結合(Cys61-Cys77 と Cys73-Cys91)は、Ca²⁺の配位がによって構造が局所的に安定化されている為に、DTT^{red}によって還元されなかったと推測される。

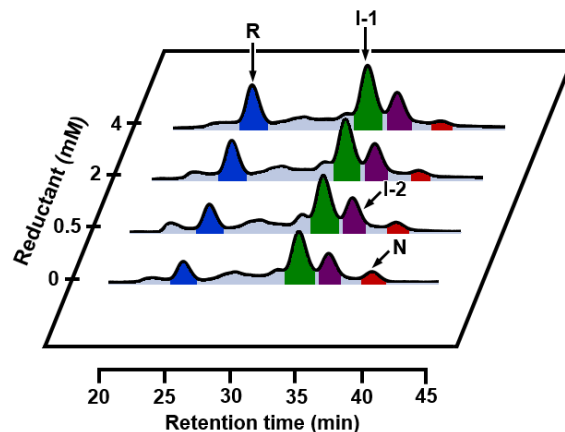


Figure 3-13 Reduction pulse から得られた HPLC クロマトグラム
5 °C で α LA の R 型に対し 1 当量の DHS^{ox}を 5 mM の CaCl₂を含む 0.1 M Tris buffer (pH 8.0)

中で反応させ、5 時間後に各濃度の DTT^{red} を加えて reduction pulse を行なってから AEMTS で反応を停止させた。

3-3-6 温度と変性剤の影響

Ca²⁺非共存下と共存下における 35 °C での α LA の酸化的フォールディングの結果を Figure 3-14 に示す。Ca²⁺非共存下と共存下、いずれも酸化的フォールディングは 5 °C の時よりも急速に進行したが、観測された中間体は明確に異なっていた。Ca²⁺非共存下の場合、特異的な中間体である I-1 と I-2 は観測されなかったが、N 型は既に 3 時間で形成され始めていた。24 時間後、2 つの異なる成分(X と Y)の形成が観察された。これらは以前に報告された X- α LA と呼ばれる 4SS 中間体と考えられる¹⁷。Ca²⁺共存下では 5 °C の時と同様に、最初に I-2 が形成され、I-1 と N 型が逐次生成された。これらの結果から、I-2 は I-1 よりも熱変性の影響を受け易いことが示唆された。35 °C の方が 5 °C よりも N 型が素早く形成された理由は、温度の上昇に伴って空気酸化(SS 形成)と SS 交換が加速されたことが原因であると考えられる。

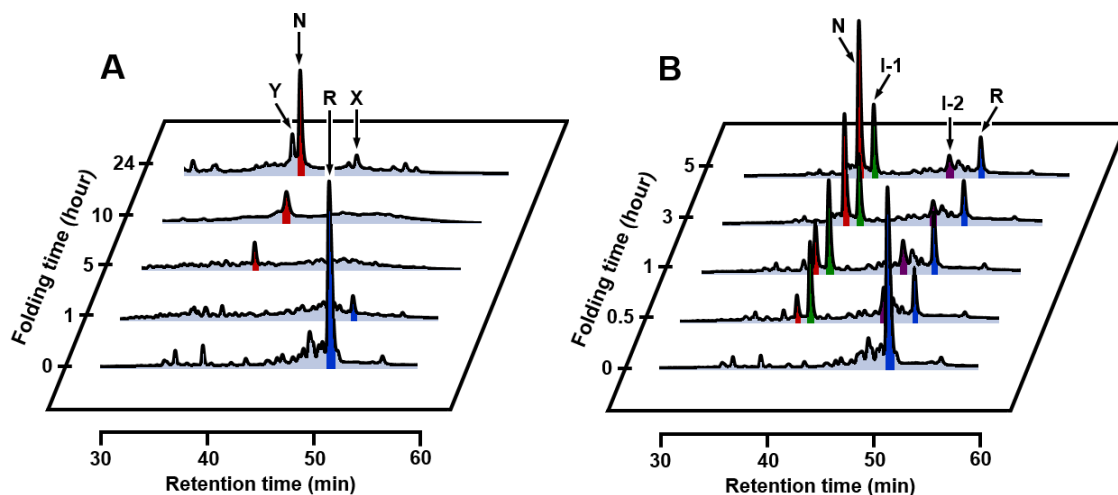


Figure 3-14 35 °C における酸化的フォールディングから得られた HPLC クロマトグラム
35 °C で α LA の R 型に対し 1 当量の DHS^{ox} を 0.1 M Tris buffer (pH 8.0) 中で反応させ、一定時間後に 1 M HCl で反応を停止させた。A は CaCl₂ 非共存、B は 5 mM の CaCl₂ 共存の条件下で行なった時の HPLC クロマトグラムを示す。

同様のフォールディング実験を 45 °C で行なったところ(Figure 3-15)、Ca²⁺共存下では I-1 と I-2 の生成は抑制されたが、N 型の生成量は 5 時間で既に 44%に達した。対照的に、Ca²⁺非共存下では僅かな量の N 型しか生成しなかった。これは Ca²⁺非結合の N 型の熱力学的な安定性が低下したことによるものと考えられる。

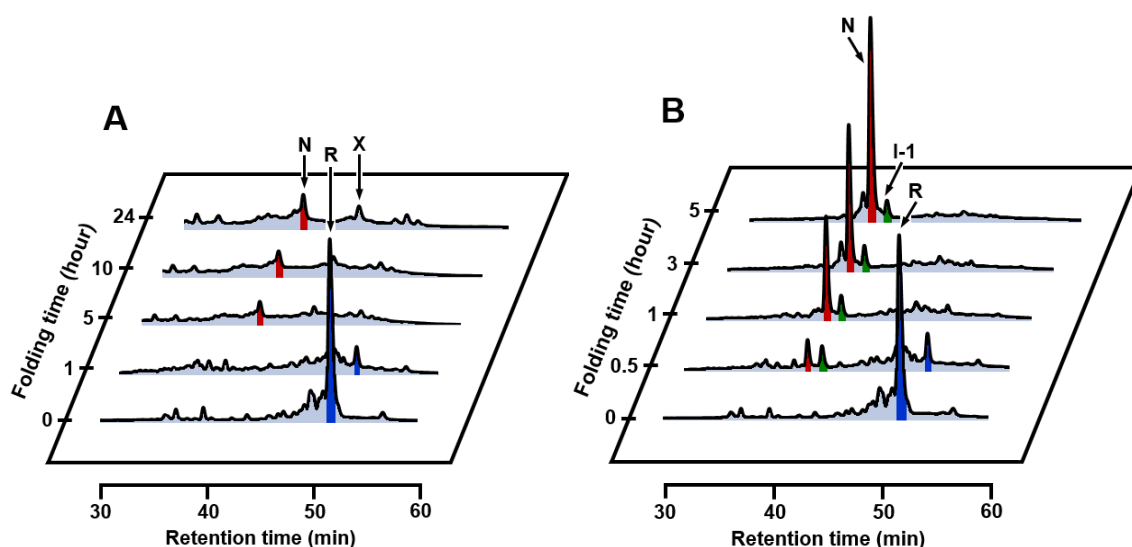


Figure 3-15 45 °C における酸化的フォールディングから得られた HPLC クロマトグラム
45 °C で α LA の R 型に対し 1 当量の DHS^{ox} を 0.1 M Tris buffer (pH 8.0) 中で反応させ、一定時間後に 1 M HCl で反応を停止させた。A は CaCl_2 非共存、B は 5 mM の CaCl_2 共存の条件下で行なった時の HPLC クロマトグラムを示す。

実際、 α LA の熱変性曲線(Figure 3-16)は、 Ca^{2+} 共存下では熱による影響が Ca^{2+} 非共存下よりも少ないことを示している。Figure 2-15A の 24 時間の HPLC クロマトグラム上に観測される種々の 4SS 中間体は 5 °C の EDTA を含む buffer 中で 4 当量の DHS^{ox} を加えた時の HPLC クロマトグラム(Figure 3-5)と類似している。従って、酸化剤として DHS^{ox} を用いた α LA の酸化的フォールディングにおいて、N 型の効率的な生成には I-1 の形成が必要不可欠であることが分かる。

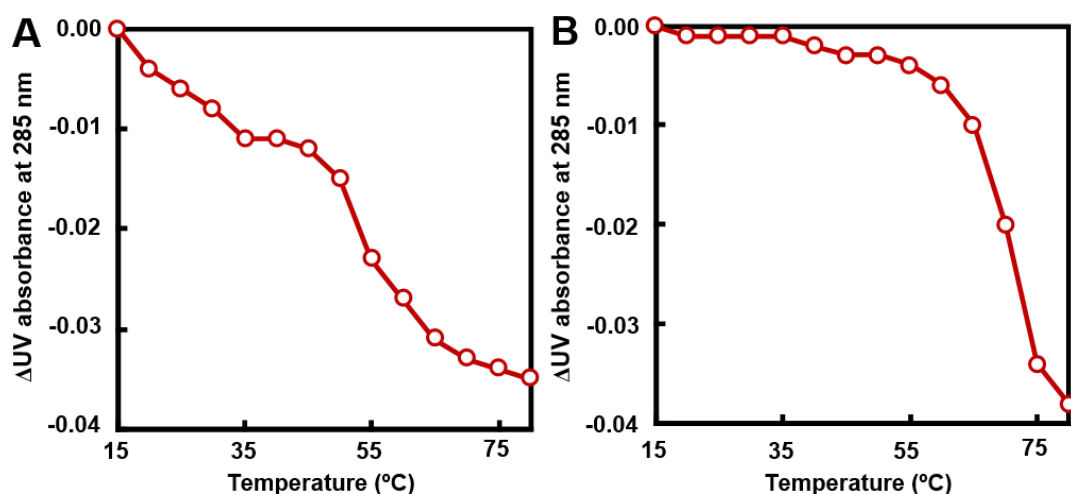


Figure 3-16 α LA の熱変性曲線

α LA の N 型を 0.1 M Tris buffer (pH 8.0) に溶解させ、15 °C から 80 °C まで 5 °C 刻みに温度を変化させながら UV 測定を行なった。A は CaCl_2 非共存、B は 5 mM の CaCl_2 共存の条件下

で行なった時の熱変性曲線を示す。

変性剤の効果を調べる為、0.625 M の GdmCl 共存下でフォールディング実験を行なった (Figure 3-17)。Ca²⁺非共存下では I-1 や I-2 は観測されず、10 時間で僅かな量の N 型が生成した。Ca²⁺共存下では有意な I-1 の形成が観測され、N 型の生成量は 5 時間で 10%、24 時間で 37%に達した。これは Ca²⁺が結合した I-1 が 0.625 M GdmCl 共存下でもコンフォメーションを維持していることを示している。一方、Ca²⁺が結合した I-2 は熱力学的な安定性が低く、同じ反応条件でも変性するものと考えられる。

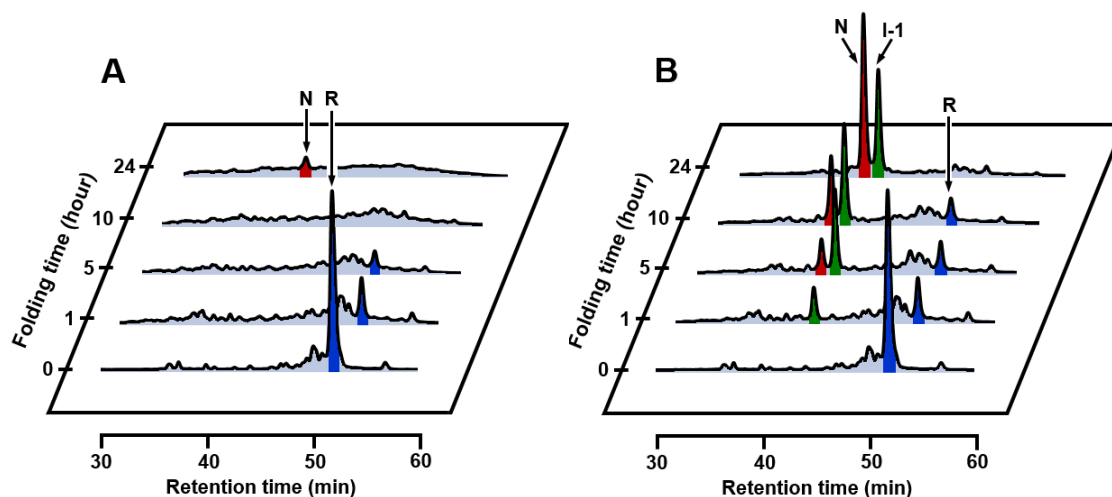


Figure 3-17 GdmCl 共存下における酸化的フォールディングから得られた HPLC クロマトグラム

5 °C で α LA の R 型に対し 1 当量の DHS^{ox} を 0.625 M の GdmCl を含む 0.1 M Tris buffer (pH 8.0) 中で反応させ、一定時間後に 1 M HCl で反応を停止させた。A は CaCl₂ 非共存、B は 5 mM の CaCl₂ 共存の条件下で行なった時の HPLC クロマトグラムを示す。

3-3-7 α LA と HEL の酸化的フォールディング経路の比較

α LA のアミノ酸配列は HEL と相同性があり (Figure 3-18)¹⁸、立体構造も非常に良く似ている (Figure 3-19)。しかしながら、本研究の結果から酸化的フォールディング経路は両者で大きな差があることが分かった。 α LA の酸化的フォールディング経路では熱力学的に安定な des 中間体の数は 1 種類であり、N 型を形成するには前駆体の des[6-120]の形成が不可欠である¹⁹。一方、HEL は 3 種類の des 中間体(des[76-94]、des[64-80]、des[6-127])を形成する²⁰。分子内に 4 つの SS 結合を持つ両タンパク質の場合、取り得ることが可能な des 中間体は 4 種類である。しかし、 α LA に対する Ca²⁺の結合は β シートに存在する 2 つの SS 結合を安定化させ、これらの SS 結合を持つ des 中間体が優先的に形成される為に、1 種類の des 中間体だけが特異的に観測されると考えられる。 α LA のフォールディング経路は on pathway 上の中間体、(61-77, 73-91)や des[6-120]を形成することができれば確実に N 型へと導かれる

が、offpathway に転がり込むと途端に N 型への道を失う。これは変性剤によって(61-77, 73-91)や des[6-120]の形成が抑制された場合、4SS 中間体を多く形成した実験結果が示唆している(第 3 章 Figure 3-17)。従って、 α LA の酸化的フォールディング経路は HEL に比べて選択肢の少ない、自由度のない経路であると云える。このことから、SS 含有タンパク質の酸化的フォールディング経路は SS トポロジーが互いに類似している場合でも、アミノ酸配列や共存する金属イオンなどの他因子により、大きな差が生じる得ることが明らかになった。

```

HEL: 1  KVFGRCELAA  AMKRHGLDNY  RGYSLGNWVC  AAKFESNFNT
 $\alpha$ LA:  EQLTKCEVFR  ELKDL__KGY  GGVSLPEWVC  TTFHTSGYDT

HEL: 41  QATN__RNTDG  STDYGILQIN  SRWWCNDGRT  PGSRNLCNIP
 $\alpha$ LA:  QAIV__QNND  STEYGLFQIN  NKIWCKDDQN  PHSSNICNIS

HEL: 80  CSALLSSDIT  ASVNCAKKIV  SDGNGMNAWV  AWRNRCKGTD
 $\alpha$ LA:  CDKFLDDDLT  DDIMCVKKIL  __DKVGINYWL  AHKALCSEK__

HEL: 120 VQAWIRGCR__L
 $\alpha$ LA:  LDQWL__CEKL
  
```

Figure 3-18 HEL と α LA のアミノ酸配列の比較

一致するアミノ酸残基は赤、Cys 残基は赤紫、Ca²⁺結合部位を青で示す。

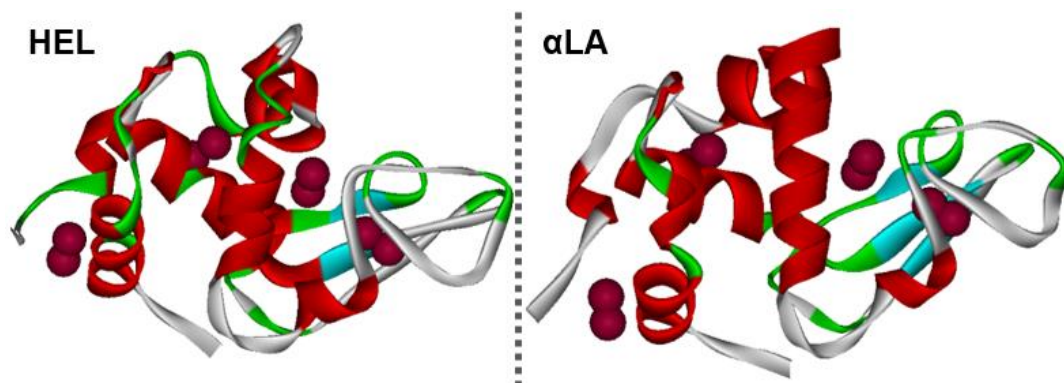


Figure 3-19 HEL と α LA の立体構造の比較

3-4 結論

本章では α LA の酸化的フォールディング経路を議論する為に、高い酸化能力を持ち定量的に SS 結合を形成する DHS^{ox} を酸化剤に用いた。EDTA 共存(金属イオン非含有条件)下では DHS^{ox} の化学量論的な酸化によって種々の非特異的な SS 中間体が生成されたが、特定の SS 中間体への SS 交換は観測されなかった(結果の 3-3-1 参照)。一方、EDTA 非共存の場合、1 種類の特異的な 3SS 中間体 I-1 が生成され、buffer 中に存在する僅かな金属イオンによって空気酸化が触媒され、N 型へゆっくりと酸化された(Figure 3-6A)。 Ca^{2+} 共存下では酸化的フォールディングがより急速に進行し、フォールディング初期に特異的な 2SS 中間体 I-2 が生成された(Figure 3-6B)。これは R 型が I-2 を形成した後に I-1、そして N 型を逐次形成することを示す。フォールディング上の重要な中間体である I-1 と I-2 は、以前に J. Y. Chang が報告した 2 つの天然の SS 結合を持つ(61-77, 73-91)と 3 つの天然の SS 結合を持つ des[6-120]であると同定した。これらの中間体は共通して β シート領域の Ca^{2+} 結合部位の近くに位置する 2 つの SS 結合、Cys61-Cys77 と Cys73-Cys91 を持つ。従って、種々の 2SS 中間体の中で I-2 のみが、種々の 3SS 中間体の中で I-1 のみが熱力学的に安定な中間体であることが分かった。この結果は α LA の N 型の形成に Ca^{2+} の結合が不可欠であることを支持する¹⁰。

上記の結果に基づき、本研究から明らかになった α LA の酸化的フォールディング経路を Figure 3-20 に示す¹⁹。以前に提案された経路(Figure 3-3)では 4SS 中間体から直接 N 型に転移することができるが、我々が提案する経路では 4SS 中間体は dead end となる。これは使用したフォールディング試薬の違いによるものであり、フォールディング経路は基本的に従来のものと同じであった²¹。また、我々は酸化力の高い DHS^{ox} を用いた oxidation pulse によって I-1 と I-2 が N 型の直前の前駆体であることを示し、N 型に至るフォールディング経路上に(61-77, 73-91)と des[6-120]が存在することを検証した。 α LA は on pathway 上の熱力学的に安定な des 中間体の数が少なく、N 型を形成するには前駆体である des 中間体の形成が不可欠である。一方、 α LA のアミノ酸配列と相同性のある HEL の酸化的フォールディング経路は 3 種類の des 中間体を形成する。このことから、同じ SS トポロジーを持つ場合でも、アミノ酸配列や共存する金属イオンなどの他因子によって酸化的フォールディング経路は異なる場合があることが分かった。

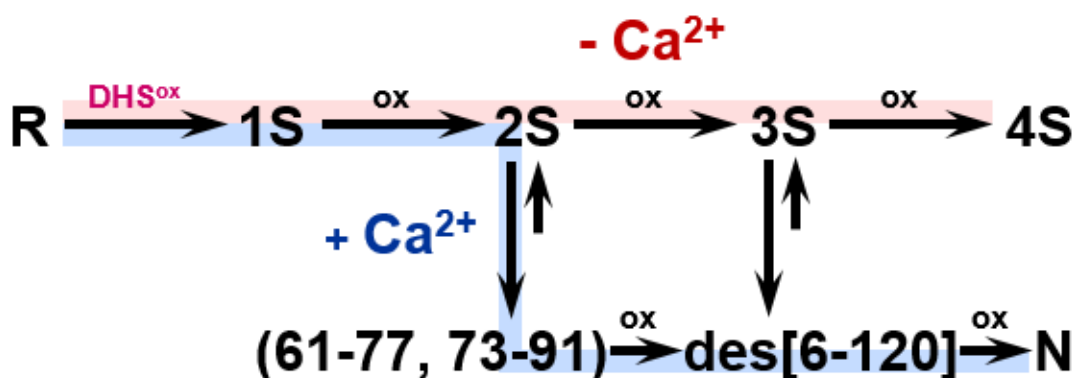


Figure 3-20 DHS^{ox} を用いた α LA の酸化的フォールディング経路

Ca^{2+} よりも結合定数が遥かに小さい Na^+ 、 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} の共存下では αLA の酸化的フォールディング経路は全く影響を受けなかった(Figure 3-8)。一方、 Mn^{2+} 共存下では Ca^{2+} 共存下よりも N 型への酸化的フォールディングは迅速に進行した。N 型の形成には SS 中間体から I-1 や I-2 への SS 交換が必要である為、 Ca^{2+} 結合部位に Mn^{2+} が結合して I-1 と I-2 が熱力学的に安定されたことが推測される。実際に Ca^{2+} と Mn^{2+} が同じ結合部位を共有することが報告されている³。 Mn^{2+} 共存下における酸化的フォールディングの促進は、塩基性条件下で $\text{Mn}(\text{OH})_2$ が空気酸化を触媒することが源であると考えられる。本研究では αLA の酸化的フォールディング経路に対する温度、変性剤(GdmCl)の影響も調査した。その結果、I-1 と I-2 の生成は温度(35、45 °C)と変性剤(0.625 M GdmCl)で抑制されたが、フォールディング経路自体は変化しなかった。熱力学的な安定性は $\text{I-2} < \text{I-1} < \text{N}$ 型の順で大きくなる。I-1 や I-2 が安定化されない場合、 αLA は try-and-error によって N 型を模索しなければならず、4SS 中間体が多く形成されることになる。

Ca^{2+} 結合が Cys61-Cys77 と Cys73-Cys91 の SS 結合の形成を促進することは文献で報告されている。Wu は β シート領域に存在する Cys61-Cys77 と Cys73-Cys91 の 2 つの SS 結合を持つ αLA の 2SS 変異体に Ca^{2+} が結合することで、頑丈な立体構造の形成を齎^{もたら}すことを報告した。その様な相互作用の形成は、 α ヘリックス領域に存在する Cys6-Cys120 と Cys28-Cys111 の 2 つの SS 結合を持つ 2SS 変異体には見られない。また、Hendrix は Cys6-Cys120 と Cys28-Cys111 を還元してヨード酢酸で修飾した 2SS 中間体を調べ、 α ヘリックス領域は変性しているが β シート領域は構造を弱く保持していると報告した。 αLA の 72-100 残基からなるペプチドが弱い Ca^{2+} の結合を持つことも報告されている²²。これらの所見は Figure 3-20 に示す αLA の酸化的フォールディング経路と一致するものである。

第 3 章を要約すると、 αLA の酸化的フォールディング経路は統計学的に可能な組み合わせの SS 結合を持つ無数の中間体を形成する Hirudin の様な経路と選択的に(61-77, 73-91)と des[6-120]を形成する BPTI の様な経路を持ち、 β シート領域への Ca^{2+} の配位がこれらのフォールディング経路を切り替えていることが確認された。 αLA の経路はアミノ酸配列に相同性のある HEL のものとは大きく異なり、フォールディング経路が SS トポロジーのみに依存するのではないことが分かった。 αLA の酸化的フォールディングに Na^+ 、 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} は実質的な影響を与えないが、 Mn^{2+} は Ca^{2+} と同様に特異的な SS 中間体の安定化を齎^{もたら}した。

3-5 参考文献

- (1) Vanaman, T. C., Brew, K., and Hill, R. L. (1970) The disulfide bonds of bovine α -lactalbumin. *J. Biol. Chem.* 245, 4583–4590.
- (2) Brew, K., Castellino, F. J., Vanaman, T. C., and Hill, R. L. (1970) The complete amino acid sequence of bovine α -lactalbumin. *J. Biol. Chem.* 245, 4570–4582.
- (3) Permyakov, E. A., and Berliner, L. J. (2000) α -Lactalbumin: Structure and function. *FEBS Lett.* 473, 269–274.
- (4) Kuwajima, K. (1977) A folding model of α -lactalbumin deduced from the three-state denaturation

mechanism. *J. Mol. Biol.* 114, 241–258.

- (5) Dolgikh, D. A., Gilmanshin, R. I., Brazhnikov, E. V., Bychkova, V. E., Semisotnov, G. V, and Ptitsyn, O. B. (1981) α -lactalbumin: Compact state with fluctuating tertiary structure? *FEBS Lett.* 136, 311–315.
- (6) Kuwajima, K. (1989) The molten globule state as a clue for understanding the folding and cooperativity of globular-protein structure. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* 6, 87–103.
- (7) Svensson, M. K., Mossberg, A.-K., Pettersson, J., Linse, S., and Svanborg, C. (2003) Lipids as cofactors in protein folding: Stereo-specific lipid-protein interactions are required to form HAMLET (human α -lactalbumin made lethal to tumor cells). *Protein Sci.* 12, 2805–2814.
- (8) Kuwajima, K., and Nakamura, T. (2016) Antitumor complexes formed by oleic acid and molten globule intermediates of proteins. *Mol. Sci. Fluctuations Toward Biol. Funct.*
- (9) Chang, J. (2002) The folding pathway of α -lactalbumin elucidated by the technique of disulfide scrambling. Isolation of on-pathway and off-pathway intermediates. *J. Biol. Chem.* 277, 120–126.
- (10) Chang, J., and Li, L. (2002) Pathway of oxidative folding of α -lactalbumin: A model for illustrating the diversity of disulfide folding pathways. *Biochemistry* 41, 8405–8413.
- (11) Chang, J. (2004) Evidence for the underlying cause of diversity of the disulfide folding pathway. *Biochemistry* 43, 4522–4529.
- (12) Arai, K., Dedachi, K., and Iwaoka, M. (2011) Rapid and quantitative disulfide bond formation for a polypeptide chain using a cyclic selenoxide reagent in an aqueous medium. *Chem. - A Eur. J.* 17, 481–485.
- (13) Permyakov, E. A., Morozova, L. A., and Burstein, E. A. (1985) Cation binding effects on the pH, thermal and urea denaturation transitions in α -lactalbumin. *Biophys. Chem.* 21, 21–31.
- (14) Ren, J., Stuart, D. I., and Acharya, K. R. (1993) α -lactalbumin possesses a distinct zinc binding site. *J. Biol. Chem.* 268, 19292–19298.
- (15) Kuwajima, K., Ikeguchi, M., Sugawara, T., Hiraoka, Y., and Sugai, S. (1990) Kinetics of disulfide bond reduction in α -lactalbumin by dithiothreitol and molecular basis of superreactivity of the cys6-cys120 disulfide bond. *Biochemistry* 29, 8240–8249.
- (16) Gohda, S., Shimizu, A., Ikeguchi, M., and Sugai, S. (1995) The superreactive disulfide bonds in α -lactalbumin and lysozyme. *J. Protein Chem.* 14, 731–737.
- (17) Chang, J. (2009) Conformational isomers of denatured and unfolded proteins: Methods of production and applications. *Protein J.* 28, 44–56.
- (18) Nonaka, Y., Aizawa, T., Akieda, D., Yasui, M., Watanabe, M., Watanabe, N., Tanaka, I., Kamiya, M., Mizuguchi, M., Demura, M., and Kawano, K. (2008) Spontaneous asparaginyl deamidation of canine milk lysozyme under mild conditions. *Proteins Struct. Funct. Genet.* 72, 313–322.
- (19) Shinozaki, R., and Iwaoka, M. (2017) Effects of metal ions, temperature, and a denaturant on the oxidative folding pathways of bovine α -lactalbumin. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 1996–2010.
- (20) Arai, K., Shibagaki, W., Shinozaki, R., and Iwaoka, M. (2013) Reinvestigation of the oxidative folding pathways of hen egg white lysozyme: Switching of the major pathways by temperature control.

Int. J. Mol. Sci. **14**, 13194–13212.

- (21) Arolas, J. L., Aviles, F. X., Chang, J., and Ventura, S. (2006) Folding of small disulfide-rich proteins: Clarifying the puzzle. *Trends Biochem. Sci.* **31**, 292–301.
- (22) Kuhlman, B., Boice, J. A., Wu, W. J., Fairman, R., and Raleigh, D. P. (1997) Calcium binding peptides from α -lactalbumin: Implications for protein folding and stability. *Biochemistry* **36**, 4607–4615.

第4章 Bovine β -lactoglobulin の酸化的フォールディング

4-1 緒言

乳清タンパク質の β -lactoglobulin (β LG)は 162 残基から構成されるタンパク質である。哺乳類の乳に含まれているが、ヒトの母乳には発見されていない¹。生物学的機能は明らかにされていないが、*cis*-レチノール(ビタミン A)などの疎水性分子に結合して輸送の役割を持つことが示唆されている。 β LG には幾つかの遺伝的変異体を確認されており、ウシの主要な成分には A 及び B が付けられている。これらの成分は 64 及び 118 番目のアミノ酸が異なり、A が 64 番目:Asp、118 番目:Val、B が 64 番目:Gly、118 番目:Ala である²。生理学的条件では α ヘリックス間の水素結合によって二量体を形成しており、pH3 以下で単量体へ解離する³。

β LG の立体構造は 9 つのストランド(A-I)から形成される β バレルと C 末端側の 3_{10} ヘリックスが特徴的である^{4,5}(Figure 4-1)。 β バレルを構成する 2 つの逆平行型の β シートは、それぞれストランド B-D とストランド A の N 末端、ストランド E-H とストランド A の C 末端から形成される。分子内に 2 つの SS 結合(Cys66-Cys160、Cys106-Cys119)と遊離 SH 基(Cys121)を持っている。Cys66-Cys160 は C-D ループを C 末端に結び、Cys106-Cys119 はストランド G と H の間に架橋している。Cys121 は α ヘリックスに覆われて完全に埋もれており、通常は他の SS 結合に関与しない^{6,7}。

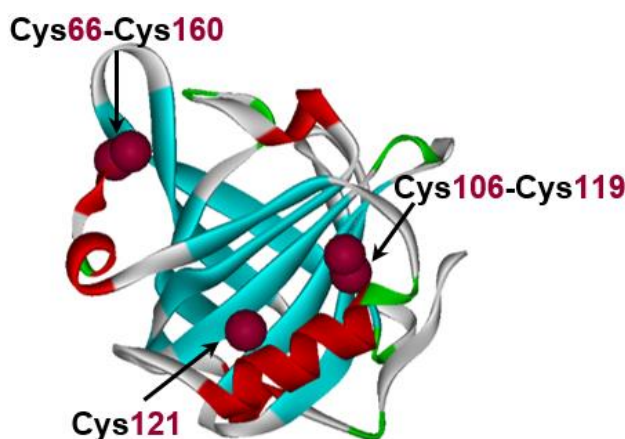


Figure 4-1 β LG の立体構造

入手が容易で分離・精製が簡単な β LG はフォールディング研究のモデルタンパク質として古くからの研究対象であり、フォールディングの初期に過剰の α ヘリックスを形成し、 $\alpha \rightarrow \beta$ 転移で本来の立体構造を形成することが知られている⁸。また、様々な条件でゲルを形成する為、アグリゲーションやアミロイド線維の形成に関する実験にも頻繁に使用される^{9,10}。一方で、SS 結合の開裂や再形成に関する研究は SS 中間体のエネルギーを計算した論文があるものの¹¹、どのような酸化的フォールディング経路を辿るのかは報告されていない。特に遊離 SH 基を持つ β LG は遊離 SH 基を持たない α LA や HEL とは異なる経路を持つことが予想されるが、SH 基の機能や生物学的意義を含めて明確に分かっていないのが現状である。

そこで、本章では酸化剤に DHS^{ox} を応用し、 β LG の酸化的フォールディングの特徴付けを行ない、その中で SH 基がどのような役割を担うのかを調べた。

4-2 実験操作

4-2-1 R 型の精製

β LG を 0.1% TFAaq で溶解し、関東化学製の Mightysil RP-18 カラム(10×250 mm, 5 μ m)を用いて HPLC で variant A と variant B を分離・精製した。移動相 A を 0.1% TFAaq、移動相 B を 0.1% TFA/ACN とし、後者の濃度を 17 分間で 42% から 47% に増加させて分離した。流速を 2.0 mL/min、カラム恒温槽を 25 °C、UV 波長を 280 nm とした。精製した variant A または variant B を凍結乾燥した後、700 μ L の 5 M GdmCl を含む 0.1 M Tris buffer (pH 8.5) で溶解し、DTT^{red} (40 mg) を加えて 25 °C で 3 時間還元した。1 mM EDTA を含む 0.1 M Tris buffer (pH 8.0) で平衡化させた Shephadex G-25 Fine (1.5×30 cm) で脱塩し、フラクションの頂点を 2 mL 分取した。得られた R 型は UV 測定から濃度を決定し(ϵ_{280} : 18700 cm²mol⁻¹), 20 μ M になる様に 1 mM EDTA を含む 0.1 M Tris buffer (pH 8.0) で希釈した。

4-2-2 DHS^{ox} を用いた酸化的フォールディング

R 型を 150 μ L ずつ分注し、50 μ L の 1 mM EDTA を含む 60 μ M DHS^{ox} を加え、5 °C で 1 分から 24 時間フォールディングした。反応停止の際は 15 μ L の 1 M HCl を加え、800 μ L の 0.1% TFAaq で希釈した。

必要に応じて DHS^{ox} の濃度(120 μ M)、温度(35 °C)、変性剤の濃度(1.25 M GdmCl)を変更して、同様に酸化的フォールディング実験を行なった。

4-2-3 HPLC による分析

酸クエンチしたサンプルは Agilent 製の ZORBAX 300SBC-18 カラム(4.6×150 mm, 5 μ m)を用いて RP-HPLC で分析を行なった。移動相 A を 0.1% TFAaq、移動相 B を 0.1% TFA/ACN とし、後者の濃度を 40 分間で 40% から 48% に増加させて分離した。流速を 0.5 mL/min、カラム恒温槽を 25 °C、UV 波長を 280 nm とした。

4-2-4 ESI-MS による解析

HPLC で分取した SS 中間体は凍結乾燥した後、100 μ L の 5 M GdmCl を含む 40 mM AEEMTS を加えて 25 °C で 40 分間処理し、5 μ L の 1 M HCl を加えた。Agilent 製の ZORBAX 300SBC-18 カラム(4.6×150 mm, 5 μ m)を用いて HPLC で分離・精製した。移動相 A を 0.1% TFAaq、移動相 B を 0.1% TFA/ACN とし、後者の濃度を 40 分間で 40% から 48% に増加させて分離した。流速を 0.5 mL/min、カラム恒温槽を 25 °C、UV 波長を 280 nm とした。凍結乾燥した後、0.1% 蟻酸と 0.1% 蟻酸/ACN の混合溶液に溶解させた。Jeol 社製 JMS-100LP 装置を使用して ESI(+)法でイオン化し、質量分析を行なった。標準物質として angiotensin I ([M+H]⁺: 1296.685)を用いて校正した。

4-3 結果

4-3-1 β LG の遺伝的変異体

市販の β LG を RP-HPLC で分析したところ(Figure 4-2)、2 種類の成分が観測された。この成分を ESI-MS で測定したところ(Figure 4-3 及び Table 4-1)、分子量はフラクシオン I が 18,277.9 Da、フラクシオン II が 18,363.2 Da であった。この結果からフラクシオン I が variant B、フラクシオン II が variant A であることが分かった。

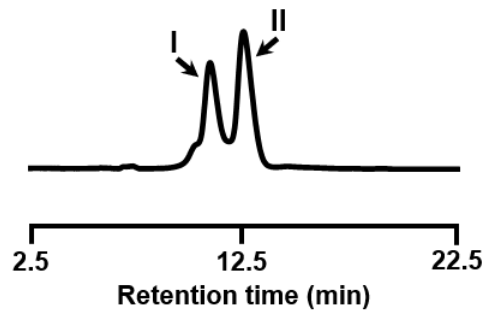


Figure 4-2 市販の β LG を RP-HPLC で分離させた時の HPLC クロマトグラム

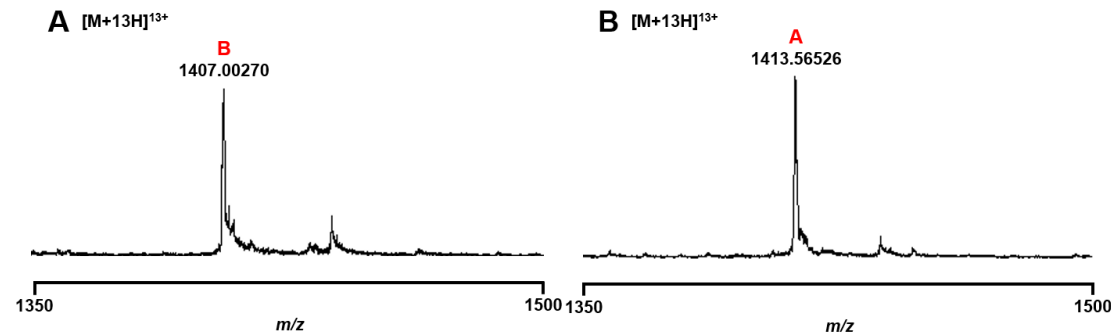


Figure 4-3 フラクシオン I と II の ESI-MS スペクトル

市販の β LG を単離・精製した後、MS 測定を行なった。A はフラクシオン I、B はフラクシオン II の ESI-MS スペクトルを示す。

Table 4-1 Figure 4-3 で得られたフラグメントの一覧

Species	Expected M ^a	[M+13H] ¹³⁺
フラクシオン I: variant B	18269.4184	1407.00270 (1406.3477)
フラクシオン II: variant A	18355.4552	1413.56526 (1412.9659)

^a 多価イオンの理論値は()で示す。

4-3-2 DHS^{ox}を用いた酸化的フォールディング

Variant A と variant B の R 型に対しそれぞれ 1 当量の DHS^{ox} を 5 °C で 1 mM の EDTA を含む 0.1 M Tris buffer (pH 8.0) で反応させた(Figure 4-4)。Variant A は DHS^{ox} によってランダムな SS 結合を持つ 6 種類の間mediate(AI1-AI6)を形成した。酸化して直ぐに AI4 と AI5 以外の intermediate は消失した。これは速度論的に形成した SS 中間体が熱力学的に安定な SS 結合に組み換わることで AI4 や AI5 へ転移した為だと推測される。Figure 4-5 はフォールディング時間に対する R 型、N 型、I4、I5 の相対的な生成量を示す。AI5 の生成量は DHS^{ox} との反応後からゆっくりと減少したが、AI4 と N 型の生成量は徐々に増加した。これは SS 交換を介して AI5 が熱力学的にさらに安定な AI4 或いは N 型に転移した為だと考えられる。

一方、variant B は variant A の AI4 に相当する BI4 が観測されなかった。この理由として、BI4 と N 型の保持時間がほぼ同じである為に、HPLC クロマトグラムでは 1 つの成分に見えていることが推測された。これを裏付ける様に variant B の N 型の生成量は、variant A の AI4 と N 型の生成量を足した値とほぼ等しいことが分かった(Figure 4-5B)。Variant B も variant A と同様にフォールディング初期に速度論的に形成した SS 中間体(BI3-BI6)が観測された。

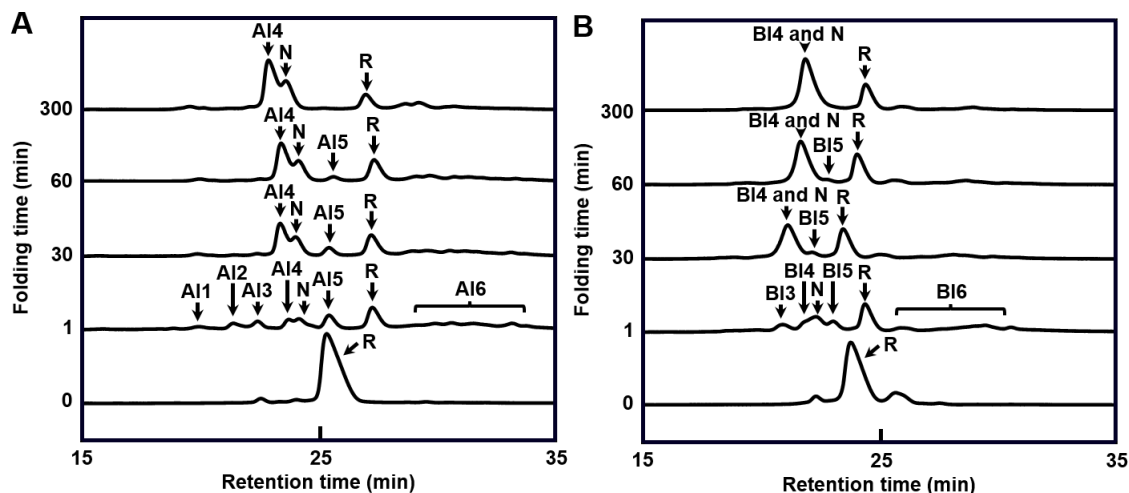


Figure 4-4 酸化的フォールディングから得られた HPLC クロマトグラム

5 °C で β LG の R 型に対し 1 当量の DHS^{ox} を 1 mM の EDTA を含む 0.1 M Tris buffer (pH 8.0) 中で反応させ、一定時間後に 1 M HCl で反応を停止させた。A は variant A、B は variant B で行なった時の HPLC クロマトグラムを示す。

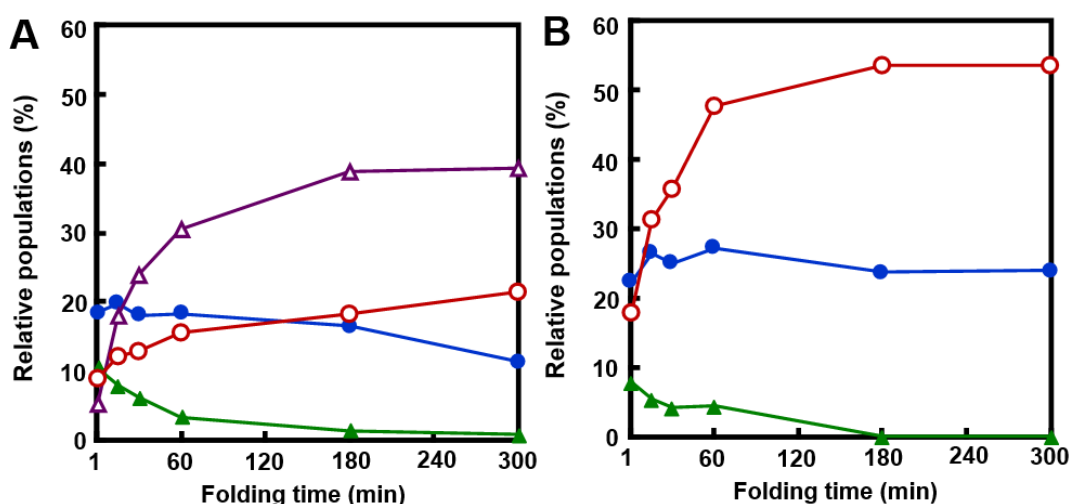


Figure 4-5 フォールディング時間に対する各成分の相対的な生成量の変化
色と記号は R 型(青, ●)、N 型(赤, ○)、I4(紫, △)、I5(緑, ▲)を表す。A は variant A、B は variant B で行なった時の相対的な生成量の変化を示す。

4-3-3 SS 中間体の同定

熱力学的に安定な中間体、AI4 と AI5 が持つ SS 結合の数を調べる為に、これらの中間体を単離・精製した後、SH 基を AEMTS で修飾し、ESI-MS で測定を行なった。分子量は AI4 が 18,574.6 Da、AI5 が 18,576.6 Da であった(Figure 4-6 及び Table 4-2)。これは AEMTS(即ち、 $-\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_3^+$)の修飾が 3 個に相当し、どちらも 1SS 中間体であることが分かった。速度論的に形成する SS 中間体も同様に測定を行ない、AI3 と AI6 が 1SS 中間体、AI1 と AI2 が 2SS 中間体であることが分かった(Figure 4-7 及び Table 4-3)。実際に 2 当量の DHS^{ox} を加えると、AI1 と AI2 の生成量が 1 当量の時よりも増加した(Figure 4-8)。つまり、速度論的に形成する AI3 と AI6 は SS 交換を介して AI4 や AI5 へ、間違った SS 結合を持つ AI1 と AI2 は N 型へ転移する。

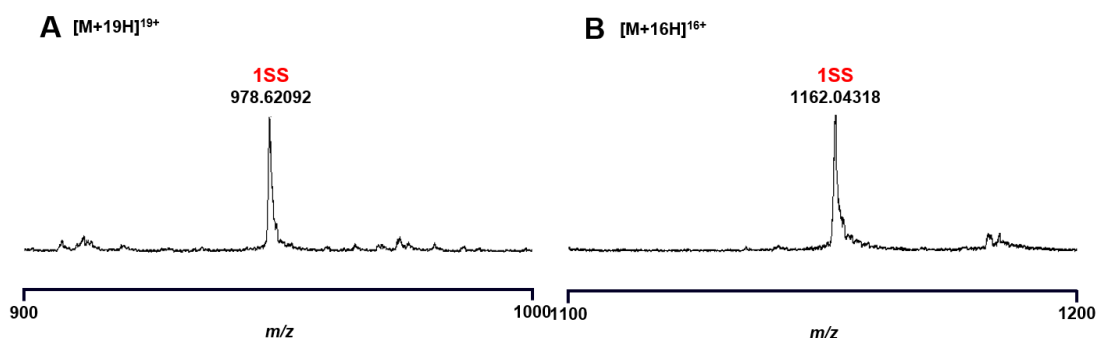


Figure 4-6 AI4 と AI5 の ESI-MS スペクトル

5 °C で variant A の R 型に対し 1 当量の DHS^{ox} を 1 mM の EDTA を含む 0.1 M Tris buffer (pH 8.0)中で反応させ、15 分間または 3 時間後に 1 M HCl で反応を停止させた。得られたサンプルを HPLC で分析し、AI4 と AI5 を単離・精製した後、5 M GdmCl と 40 mM の AEMTS を

含む 0.1 M Tris buffer (pH 8.0) に溶解させ、塩を処理してから MS 測定を行なった。A は AI4、B は AI5 の ESI-MS スペクトルを示す。

Table 4-2 Figure 4-6 で得られたフラグメントの一覧

Species	Expected M ^a	[M+16H] ¹⁶⁺	[M+19H] ¹⁹⁺
AI4: (1SS)+3×AEMTS	18583.5220		978.62092 (979.0879)
AI5: (1SS)+3×AEMTS	18583.5220	1162.04318 (1162.4779)	

^a 多価イオンの理論値は()で示す。

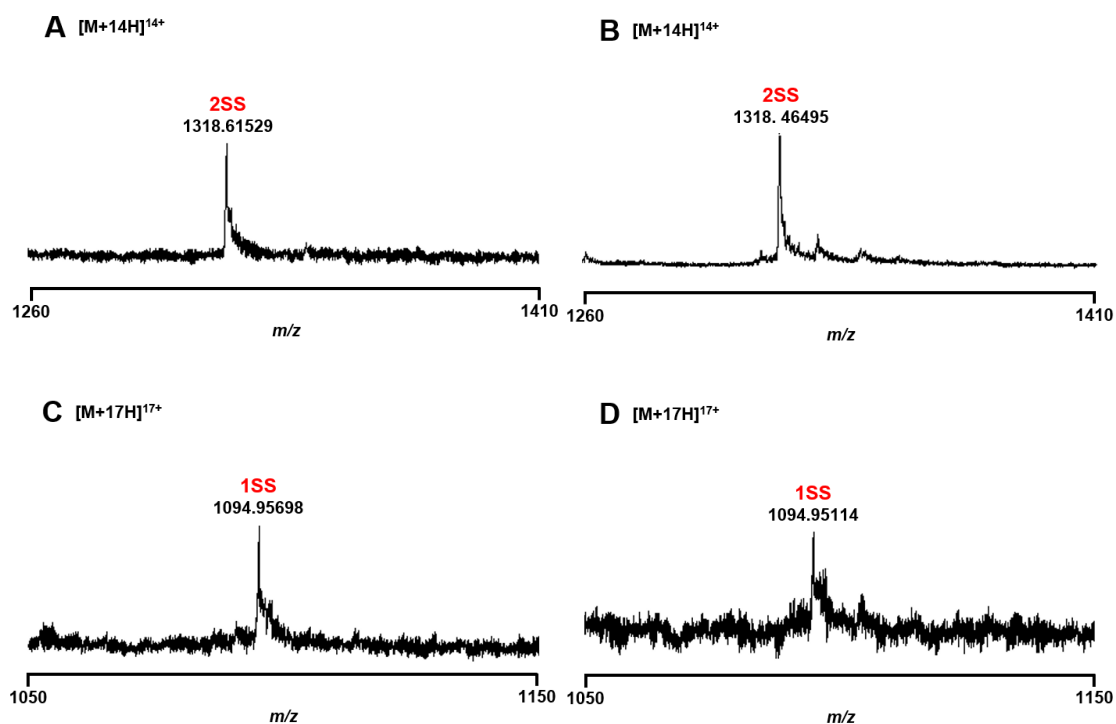


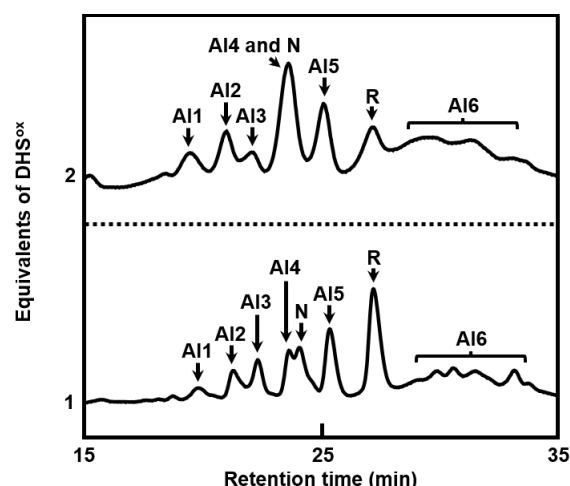
Figure 4-7 速度論的に形成する中間体の ESI-MS スペクトル

5 °C で variant A の R 型に対し 1 当量の DHS^{ox} を 1 mM の EDTA を含む 0.1 M Tris buffer (pH 8.0) 中で反応させ、1 分間後に 1 M HCl で反応を停止させた。得られたサンプルを HPLC で分析し、各中間体の成分を単離・精製した後、5 M GdmCl と 40 mM の AEMTS を含む 0.1 M Tris buffer (pH 8.0) に溶解させ、塩を処理してから MS 測定を行なった。A は AI1、B は AI2、C は AI3、D は AI6 の ESI-MS スペクトルを示す。

Table 4-3 Figure 4-6 で得られたフラグメントの一覧

Species	Expected M ^a	[M+14H] ¹⁴⁺	[M+17H] ¹⁷⁺
AI1: (2SS)+1×AEMTS	18431.4778	1318.61529 (1317.5419)	
AI2: (2SS)+1×AEMTS	18431.4778	1318.46495 (1317.5419)	
AI3: (1SS)+3×AEMTS	18583.5220		1094.95698 (1094.1561)
AI6: (1SS)+3×AEMTS	18583.5220		1094.95114 (1094.1561)

^a 多価イオンの理論値は()で示す。

Figure 4-8 1 当量と 2 当量の DHS^{ox}を加えた時の HPLC クロマトグラム

5 °C で variant A の R 型に対し 1 当量或いは 2 当量の DHS^{ox}を 1 mM の EDTA を含む 0.1 M Tris buffer (pH 8.0)中で反応させ、1 分間後に 1 M HCl で反応を停止させた。

4-3-4 AI4 及び AI5 から N 型への酸化

R 型が 1 当量の DHS^{ox}と反応した場合、AI4 は反応開始 3 時間、AI5 は反応開始 15 分間で最大の蓄積を示した。この段階でさらに 1 当量の DHS^{ox}を加えることで、R 型や SS 中間体を迅速に強制酸化(oxidation pulse)させた。Figure 4-9A は反応開始 3 時間後に oxidation pulse を行なった時の HPLC クロマトグラムである。AI4 の面積ピークは完全に消失し、N 型の面積ピークは増加した。AI4 の減少量は N 型の増加量とほぼ一致しており(Figure 4-10A)、AI4 が N 型へと酸化されたことを示す。従って、AI4 が天然型の SS 結合を持ち、N 型の前駆体である。つまり、AI4 は Cys66-Cys160 か Cys106-Cys119 どちらかの SS 結合を持っている。反応開始 15 分後に oxidation pulse を行なったところ(Figure 4-9B、Figure 4-10B)、AI5 の生成量は oxidation pulse の前後で殆ど変化していないことが分かった。この結果は AI5 から直接 N 型への酸化は劣勢であることを示唆した。

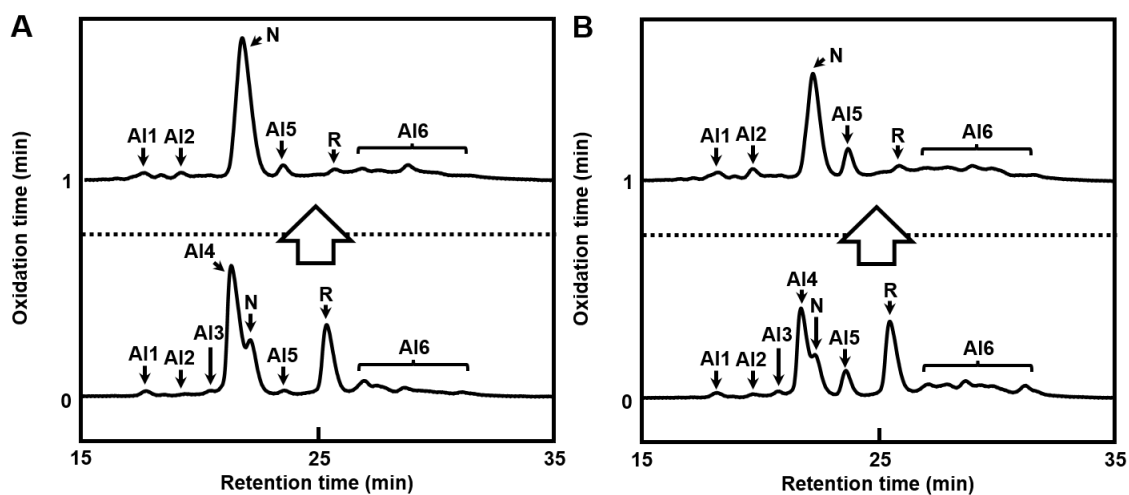


Figure 4-9 Oxidation pulse から得られた HPLC クロマトグラム

5 °C で variant A の R 型に対し 1 当量の DHS^{ox} を 1 mM の EDTA を含む 0.1 M Tris buffer (pH 8.0) 中で反応させ、一定時間後に 1 当量の DHS^{ox} を加えて oxidation pulse を行なってから 1 M HCl で反応を停止させた。A はフォールディング反応を開始してから 3 時間後、B は 15 分間後に oxidation pulse を行なった時の HPLC クロマトグラムを示す。

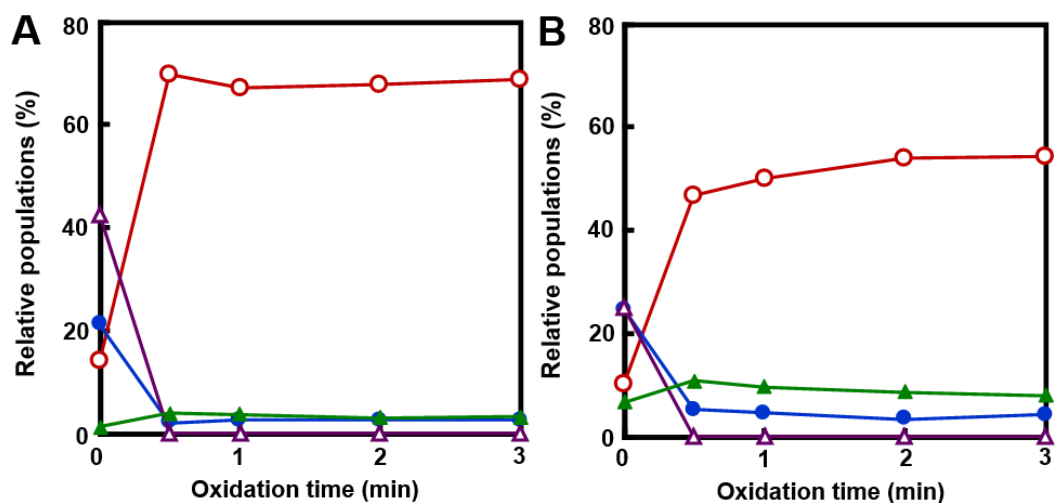


Figure 4-10 酸化時間に対する各成分の相対的な生成量の変化

色と記号は R 型(青, ●)、N 型(赤, ○)、I4(紫, △)、I5(緑, ▲)を表す。A はフォールディング反応を開始してから 3 時間後、B は 15 分間後に oxidation pulse を行なった時の相対的な生成量の変化を示す。

4-3-5 温度の影響

35 °C における variant A と variant B の酸化的フォールディングの結果を Figure 4-11 にそれぞれ示す。酸化的フォールディングは 5 °C よりも急速に進行し、N 型は 1 時間で既に形成した。35 °C の方が 5 °C の時よりも N 型の形成が速かった理由は、温度の上昇に伴って空気酸化(SS 形成)と SS 交換が加速されたことが原因であると考えられる。Variant A 、 variant B どちらも I5 の生成が抑制されていることから、I5 は I4 に比べて熱変性の影響を受け易いことが示唆された。

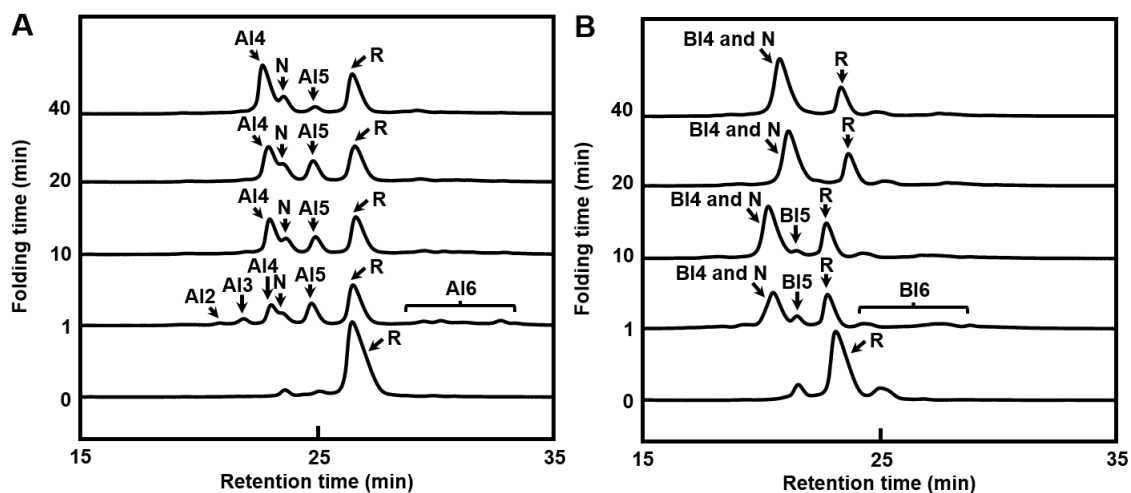


Figure 4-11 35 °C における酸化的フォールディングから得られた HPLC クロマトグラム
35 °C で β LG の R 型に対し 1 当量の DHS^{ox} を 1 mM の EDTA を含む 0.1 M Tris buffer (pH 8.0) 中で反応させ、一定時間後に 1 M HCl で反応を停止させた。A は variant A、B は variant B で行なった時の HPLC クロマトグラムを示す。

4-3-6 変性剤の影響

変性剤の影響を調べる為、1.25 M の GdmCl 共存下で variant A と variant B の酸化的フォールディング実験を行なった(Figure 4-12)。I5 と I4 の生成は抑制された一方、フォールディング初期に形成する I1、I2、I3 の蓄積が観察された。5 時間後、N 型の形成は観測されず、I1 の生成量が僅かに増加した。この結果から、GdmCl 共存下のフォールディング経路は N 型ではなく、2SS 中間体に向かってバイパスが掛かっていると推測される。

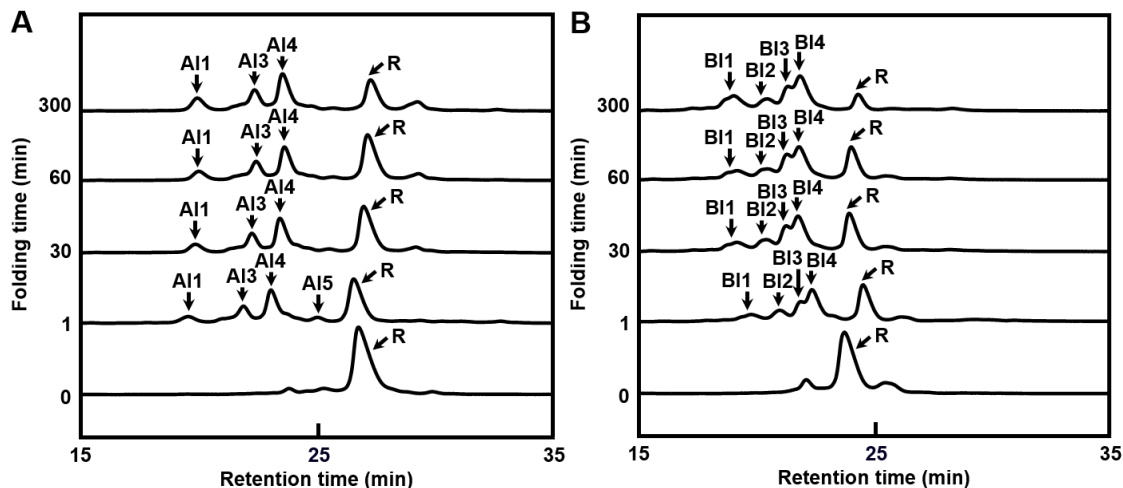


Figure 4-12 GdmCl 共存下における酸化的フォールディングから得られた HPLC クロマトグラム

5 °C で β LG の R 型に対し 1 当量の DHS^{ox} を 1.25 M の GdmCl と 1 mM の EDTA を含む 0.1 M Tris buffer (pH 8.0) 中で反応させ、一定時間後に 1 M HCl で反応を停止させた。A は variant A、B は variant B で行なった時の HPLC クロマトグラムを示す。

実際に、variant A の N 型を GdmCl が共存する buffer 中に溶解すると、AI1 を形成した(Figure 4-13)。N 型の 2SS 中間体への異性化は pH 5.0 では起こったが、pH 3.0 では起こらなかった。このことから、変性剤によるコンフォメーションの崩壊が遊離 SH 基の SS 交換を介して 2SS 中間体へと導いていると考えられる。この異性化反応は可逆的に進行し、GdmCl を除去すると N 型を再形成した。

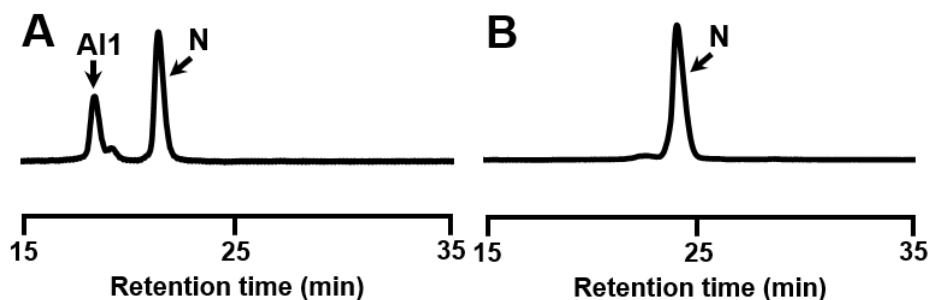


Figure 4-13 Variant A の N 型を各 buffer に溶解させた時の HPLC クロマトグラム

A は 5 M GdmCl を含む acetate buffer (pH 5.0)、B は 1.5 M GdmCl を含む Gly-HCl buffer (pH 3.0) に溶解させた時の HPLC クロマトグラムを示す。

4-4 結論

本章では酸化剤として高い SS 形成能を持つ DHS^{ox} を用いて βLG の酸化的フォールディング経路を調べた。Variant A では速度論的に形成した SS 中間体(AI1-AI6)が観測された。AI1、AI2、AI3 は熱力学的に安定な SS 結合へ迅速に異性化する(Figure 4-4A)。熱力学的に安定な中間体の AI4 と AI5 はどちらも 1SS 中間体であることが分かった(Figure 4-6)。AI4 は oxidation pulse を行なうと N 型を形成し、天然型の SS 結合を持った N 型の前駆体である。従って、Cys66-Cys160 或いは Cys106-Cys119 の SS 結合を持つと推測される。一方、AI5 は oxidation pulse を行なっても生成量に変化が生じなかった。このことから、AI5 はより熱力学的に安定な AI4 へゆっくりと異性化し、AI5 から直接 N 型へ酸化する経路は劣勢であると推測する。Variant B も variant A の酸化的フォールディングと同様の挙動を示したが、AI4 に相当する成分(BI4)は観測されなかった。Variant B の N 型の生成量が variant A の AI4 と N 型の生成量の和に等しいことから、BI4 と N 型が同じ保持時間に溶出されていると考えられる。上記の結果に基づき、推定される βLG の酸化的フォールディング経路を Figure 4-14 に示す。

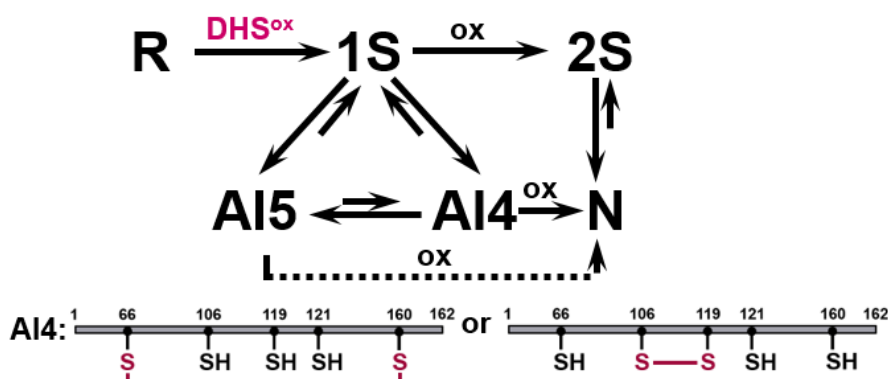


Figure 4-14 DHS^{ox} を用いた βLG の酸化的フォールディング経路

αLA や HEL などの遊離 SH 基を持たないタンパク質は、SS 結合の異性化を触媒する redox 試薬や PDI が共存しない限り、全ての SS 結合を架橋した時点でフォールディングは失活する。一方、 βLG の様に遊離 SH 基を持つタンパク質はその限りではなく、間違った SS 結合を持った 2SS 中間体でも自身の力で正しい立体構造を復元することが可能であり、自己の品質管理能力は高いと云える。しかしこれは、 βLG が共存する他タンパク質の品質管理を向上させる様な働きを持つと云うことではない。なぜなら、 βLG の遊離 SH 基はタンパク質分子の内部に埋もれており、通常は他の SS 結合に関与しないからである⁶⁷。このことは分子内に遊離 SH 基(Cys34)を持つ BSA の場合には SH 基に物質を結合していない還元型(mercapto-albumin: MA)と血液中の GSH や Cys などと共有結合している酸化型(non-mercapto-

albumin: NA)が混在することと対照的である¹²。βLGのSH基が生物学的にどのような意義を持つのか分かっていないが、遊離SH基の反応性が低いことから、抗酸化物質やリガンド輸送担体としての介在的な役割ではなく、脂質などの疎水性物質の運搬に関与しているものと考えられる。

βLGのCys121は遊離SH基としての反応性は低い、変性剤によってβLGの立体配座が崩壊すると、この遊離SH基は間違ったSS結合を持つIIへと転移する原因になる(Figure 4-13)。この現象はBSAやOVAなどのSS結合と遊離SH基が混在するタンパク質に多く見られる¹³⁻¹⁵。両タンパク質は立体構造の形成にSS結合の形成が寄与しておらず、R型が既にN型と同様の立体構造を取っている¹⁶。試験管内の実験ではこの様なタンパク質は高次構造の形成過程で正しいSS結合を形成するのは困難であるものの、適切な条件を選択できれば正しいSS結合を持つN型を形成することが可能である^{14,15}。βLGの酸化的フォールディングに関する研究の発展が、SS結合と遊離SH基が混在する複雑なタンパク質の立体構造の形成機構の解明に繋がることが期待できる。

第4章を要約すると、DHS^{ox}によってβLGのフォールディング初期に形成された速度論的なSS中間体は熱力学的に安定な中間体へ迅速に転移した。βLGの酸化的フォールディングは主にAI4が酸化してN型を形成し、AI5からN型へ酸化する経路は劣勢で、AI4への異性化を介す必要がある。また、変性剤によるコンフォメーションの崩壊は間違ったSS結合を持つAI1へと導くことが分かった。

4-5 参考文献

- (1) Brignon, G., Chtourou, A., and Ribadeau-Dumas, B. (1985) Does β-lactoglobulin occur in human milk? *J Dairy Res.* 52, 249–254.
- (2) Brignon, G., and Dumas, B. R. (1973) Localisation dans la chaîne peptidique de la β lactoglobuline bovine de la substitution Glu/Gln différenciant les variants génétiques B et D. *FEBS Lett.* 33, 73–76.
- (3) Uhrínová, S., Smith, M. H., Jameson, G. B., Uhrín, D., Sawyer, L., and Barlow, P. N. (2000) Structural changes accompanying pH-induced dissociation of the β-lactoglobulin dimer. *Biochemistry* 39, 3565–3574.
- (4) Brownlow, S., Cabral, J. H. M., Cooper, R., Flower, D. R., Yewdall, S. J., Polikarpov, I., North, A. C., and Sawyer, L. (1997) Bovine β-lactoglobulin at 1.8 Å resolution — still an enigmatic lipocalin. *Structure* 5, 481–495.
- (5) Kuwata, K., Hoshino, M., Forge, V., Era, S., Batt, C. A., and Goto, Y. (1999) Solution structure and dynamics of bovine β-lactoglobulin A. *Protein Sci.* 8, 2541–2545.
- (6) Burova, T. V., Choiset, Y., Tran, V., and Haertlé, T. (1998) Role of free Cys121 in stabilization of bovine β-lactoglobulin B. *Protein Eng.* 11, 1065–1073.
- (7) Sakai, K., Sakurai, K., Sakai, M., Hoshino, M., and Goto, Y. (2000) Conformation and stability of thiol-modified bovine β-lactoglobulin. *Protein Sci.* 9, 1719–1729.
- (8) Hamada, D., Segawa, S., and Goto, Y. (1996) Non-native α-helical intermediate in the refolding of β-

- lactoglobulin, a predominantly β -sheet protein. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 3, 868–873.
- (9) Bolisetty, S., Harnau, L., Jung, J., and Mezzenga, R. (2012) Gelation, phase behavior, and dynamics of β -lactoglobulin amyloid fibrils at varying concentrations and ionic strengths. *Biomacromolecules* 13, 3241–3252.
- (10) Invernizzi, G., Annoni, E., Natalello, A., Doglia, S. M., and Lotti, M. (2008) In vivo aggregation of bovine β -lactoglobulin is affected by Cys at position 121. *Protein Expr. Purif.* 62, 111–115.
- (11) Jankowski, C. K., and Sichel, D. I. (2003) Modelling of the β -lactoglobulin (BLG) oxidative folding. *J. Mol. Struct. THEOCHEM* 629, 185–196.
- (12) Noel, J. K. F., and Hunter, M. J. (1972) Bovine mercaptalbumin and non-mercaptalbumin monomers. *J Biol Chem* 247, 7391–7406.
- (13) Young Lee, J., and Hirose, M. (1992) Effects of disulfide reduction on the emulsifying properties of bovine serum albumin. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 56, 1810–1813.
- (14) Takahashi, N., and Hirose, M. (1992) Reversible denaturation of disulfide-reduced ovalbumin and its reoxidation generating the native cystine cross-link. *J. Biol. Chem.* 267, 11565–11572.
- (15) Tatsumi, E., Takahashi, N., and Hirose, M. (1994) Denatured state of ovalbumin in high concentrations of urea as evaluated by disulfide rearrangement analysis. *Biol. Chem.* 296, 28062–28067.
- (16) Takahashi, N., Koseki, T., Doi, E., and Hirose, M. (1991) Role of an intrachain disulfide bond in the conformation and stability of ovalbumin. *J. Biochem* 109, 846–851.

第5章 総括

タンパク質の機能や物性に関する基礎研究としてフォールディング反応における分子機構の研究を行なった。従来の酸化試薬は酸化力が低く、SS結合の形成反応とSS結合の交換反応が競合的に進行し、フォールディングの途中で特異的に蓄積されるSS中間体の観測が困難であると云う問題点があった。そこで、本論文では迅速且つ化学量論的にSS結合を形成することが可能なDHS^{ox}を酸化剤に用いて、乳清に含まれる3種類のタンパク質、LYZ、 α LA、 β LGの酸化的フォールディング経路の解明を研究した。

第1章では、本論文の基礎となるタンパク質のフォールディング問題について記述し、その研究の現状と解決すべき問題点について議論した。その上で本論文の目的を述べた。

第2章では、LYZとほぼ同じアミノ酸配列を持ち入手が容易なHELをモデルタンパク質として用い、以前に提案されたHELの酸化的フォールディング経路を検証することを目的に研究を行なった。従来のHELの酸化的フォールディング経路は2SS中間体から3種類のdes中間体が形成され、主にdes[64-80]とdes[6-127]からの酸化でN型が形成されると考えられていた。しかし、DHS^{ox}を用いてHELの酸化的フォールディングの詳細な実験を行なったところ、3SS中間体の異性化によってdes中間体が形成されていることが分かった。また、低温・高温条件における実験結果から、低温(5℃)では3種類のdes中間体からN型へ酸化された。一方、高温(35℃)では熱変性によってdes[64-80]とdes[6-127]は蓄積せず、des[76-94]のみが前駆体として酸化されてN型を形成することを新たに発見した。このことから、HELは温度に依存して酸化的フォールディング経路を切り替えていることが明らかになった。

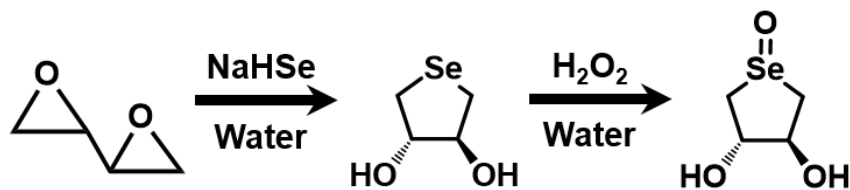
第3章では、 α LAの酸化的フォールディングについて研究を行なった。Ca²⁺非共存下ではランダムにtry-and-errorを繰り返してランダムなSS中間体を形成しながらN型を模索する経路であるに対し、Ca²⁺共存下では選択的に(61-77, 73-91)とdes[6-120]を形成し、特異的なSS中間体がN型へと導いた。このような経路の切り替わりが起こるのは、Ca²⁺の結合により β シート領域に存在する2つのSS結合(Cys61-Cys77とCys73-Cys91)が安定化され、これらの結合を持つ(61-77, 73-91)とdes[6-120]がSS中間体の中で最も熱力学的に安定になるからと推定される。熱や変性剤によってこれら中間体が不安定化されて有意な差が無くなると、N型への道を失い、間違ったSS結合を持つ4SS中間体を形成し易くなる。金属イオンの中でNa⁺、K⁺、Mg²⁺、Zn²⁺はフォールディングに影響を与えない一方、Mn²⁺は特異的なSS中間体に安定性を齎し、Ca²⁺以上にフォールディング反応を促進してN型に導いた。また、 α LAとHELはSSトポロジーが同じであり、その立体構造も良く似ている。そこで、ジスルフィドトポロジーが同じ2つのタンパク質でその酸化的フォールディング経路を比較したところ、同じSSトポロジーでありながらも両者のフォールディング経路は大きく異なるものであった。このことから、SS含有タンパク質の酸化的フォールディング経路はアミノ酸配列や共存する金属イオンなどの他因子により、大きな差が生じ得ることが明らかになった。

第4章では、 β LGの酸化的フォールディングに関する研究を行ない、SS含有タンパク質の酸化的フォールディング機構における遊離SH基の役割を明らかにすることを目的とした。初期に形成された速度論的なSS中間体は熱力学的に安定な2種類のSS中間体へと異性化することが観察された。その内1種類の中間体が酸化されることで天然構造が形成し、もう一方の中間体は天然構造の直接の前駆体ではないことが明らかになった。また、 β LGではSS結合の形成が立体構造の安定化に大きくは寄与していないことが分かった。

今後は β LGの酸化的フォールディングの経路上に存在する中間体のSS結合部位を同定し、酸化的フォールディング経路のより詳細な議論を行なう必要がある。比較的小さなタンパク質で入手・精製の容易な β LGはSS結合と遊離SH基を混在させたモデルタンパク質として、N型の再形成が困難なBSAやOVAにおける酸化的フォールディング機構の解明への手掛かりになることが期待できる。

補足

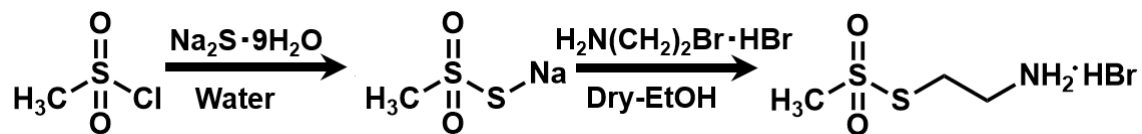
DHS^{ox}の合成



二口フラスコに Se 粉末を 2.26 g 採取し、蒸留水を 20 mL 加えて懸濁させた。滴下ロートに水素化ホウ素ナトリウムを 2.16 g 採取して蒸留水 25 mL 加え、窒素気流下で 20 分間掛けて滴下した。次に、注射器に 1,3-ブタジエンジエポキシドを 1.8 mL 採取して 20 分間掛けて滴下した。その後、空気中で攪拌した(overnight)。赤黒色の溶液を吸引濾過して Se を取り除き、エーテルによる液体ソックスレー抽出を行なった(3 days)。抽出した油相を硫酸マグネシウムで脱水後、エバポレーターと真空ポンプで溶媒を完全に除去してから冷蔵庫で冷却して結晶を析出させた。析出させた結晶を吸引濾過で集め、デシケーター内で良く乾燥させた。得られた結晶は、融点測定で DHS^{red} (文献の融点: 79-80 °C)になるまでジクロロホルムによる再結晶を繰り返した。DHS^{red}の結晶を 0.49 g(収率: 44.3 %)で得た。

ナス型フラスコに DHS^{red}を 1.00 g 採取し、蒸留水を 9 mL 加えて溶解した。1.3 当量の過酸化水素を 1 mL 加えて 3 時間反応させた後、凍結乾燥を行なった(overnight)。得られた白色固体は温めたメタノールで溶解し、濾過で不純物を除去してから冷凍庫で冷却して結晶を析出させた。析出させた結晶を吸引濾過で集め、デシケーター内で良く乾燥させた。得られた結晶は、融点測定で DHS^{ox} (文献の融点: 123-124 °C)になるまでメタノールによる再結晶を繰り返した。DHS^{ox}の結晶を 0.49 g(収率: 44.3 %)で得た。

2-Aminoethyl methanethiosulfonate (AEMTS)の合成

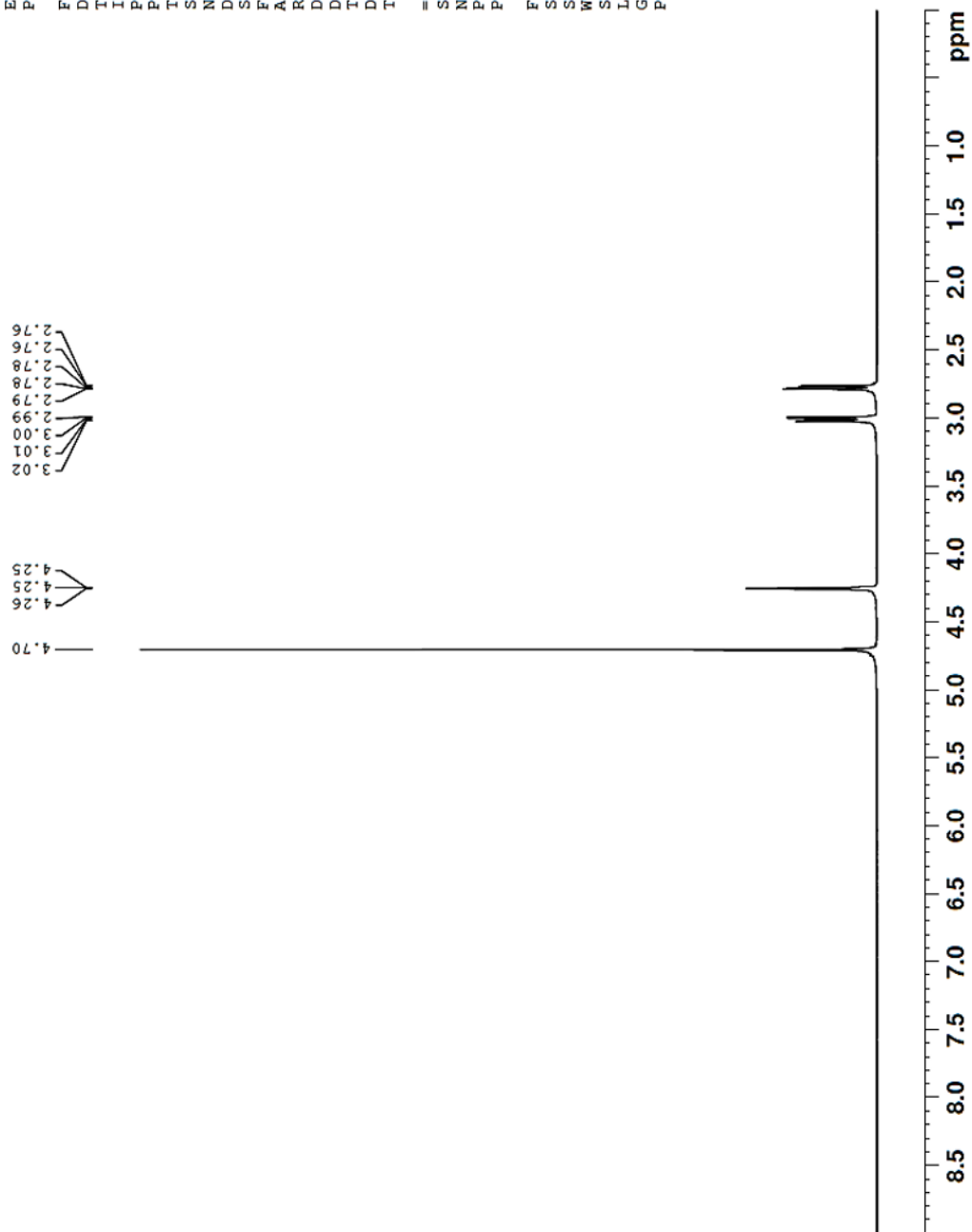


Scheme 2 AEMTS の合成

ナス型フラスコに硫化ナトリウムを 72.3 g 採取し、蒸留水 75 mL 加えてオイルバス 75 °C で完全に溶解させた。滴下ロートからメタンスルホニルクロリドを 23.3 mL ゆっくり滴下した。オイルバス 140 °C で加熱還流を行なった(overnight)。リービッヒ冷却器で蒸留を行ない、真空ラインに接続して減圧下で水を完全に留去した。得られた白濁液をシャーレに移してドラフト内で乾燥させた(overnight)。乾燥した粉末をエタノール(一般アルコールをモレキュラーシープスで一晩脱水済み)による固体ソックスレー抽出を行なった。抽出した油相を濾過して固形物を取り除き、エバポレーターで濃縮後、冷凍庫で冷却して結晶を析出させた。析出させた結晶を吸引濾過で集め、デシケーター内で良く乾燥させた。得られた淡黄色結晶は、融点測定で $\text{CH}_3\text{SO}_2\text{Na}$ (文献の融点: 273 °C)になるまでエタノールによる再結晶を繰り返した。 $\text{CH}_3\text{SO}_2\text{Na}$ の淡黄色結晶を 8.22 g (収率: 28.64 %)で得た。

ナス型フラスコに $\text{CH}_3\text{SO}_2\text{Na}$ を 4.03 g 採取し、1.2 当量の 2-ブロモエチルアミン臭化水素酸塩を 7.36 g、脱水エタノールを 60 mL 加えた。オイルバス 120 °C で 7 時間加熱還流を行なった。溶液が熱い内に濾過で固形物を取り除き、エバポレーターで濃縮後、冷蔵庫で冷却して結晶を析出させた。析出させた結晶を吸引濾過で集め、デシケーター内で良く乾燥させた。得られた淡黄色結晶は、融点測定で AEMTS (文献の融点: 112-114 °C)になるまで脱水エタノールによる再結晶を繰り返した。AEMTS の淡黄色結晶を 3.66 g (収率: 78.9 %)で得た。

¹H-NMR DHS^{red}

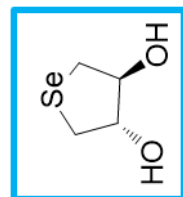


Current Data Parameters
NAME 141122
EXPNO 10
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20141122
Time 16.53
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm PABBO BB/
PULPROG zg30
TD 65536
SOLVENT D2O
NS 16
DS 2
SWH 10000.000 Hz
FIDRES 0.152588 Hz
AQ 3.2767999 sec
RG 106.4
DW 50.000 usec
DE 6.50 usec
TE 296.2 K
D1 1.00000000 sec
TD0 1

===== CHANNEL f1 =====
SFO1 500.1330885 MHz
NUC1 1H
P1 12.00 usec
PLW1 15.00000000 W

F2 - Processing parameters
SI 65536
SF 500.1300000 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00



⁷⁷Se-NMR DHS^{red}

```

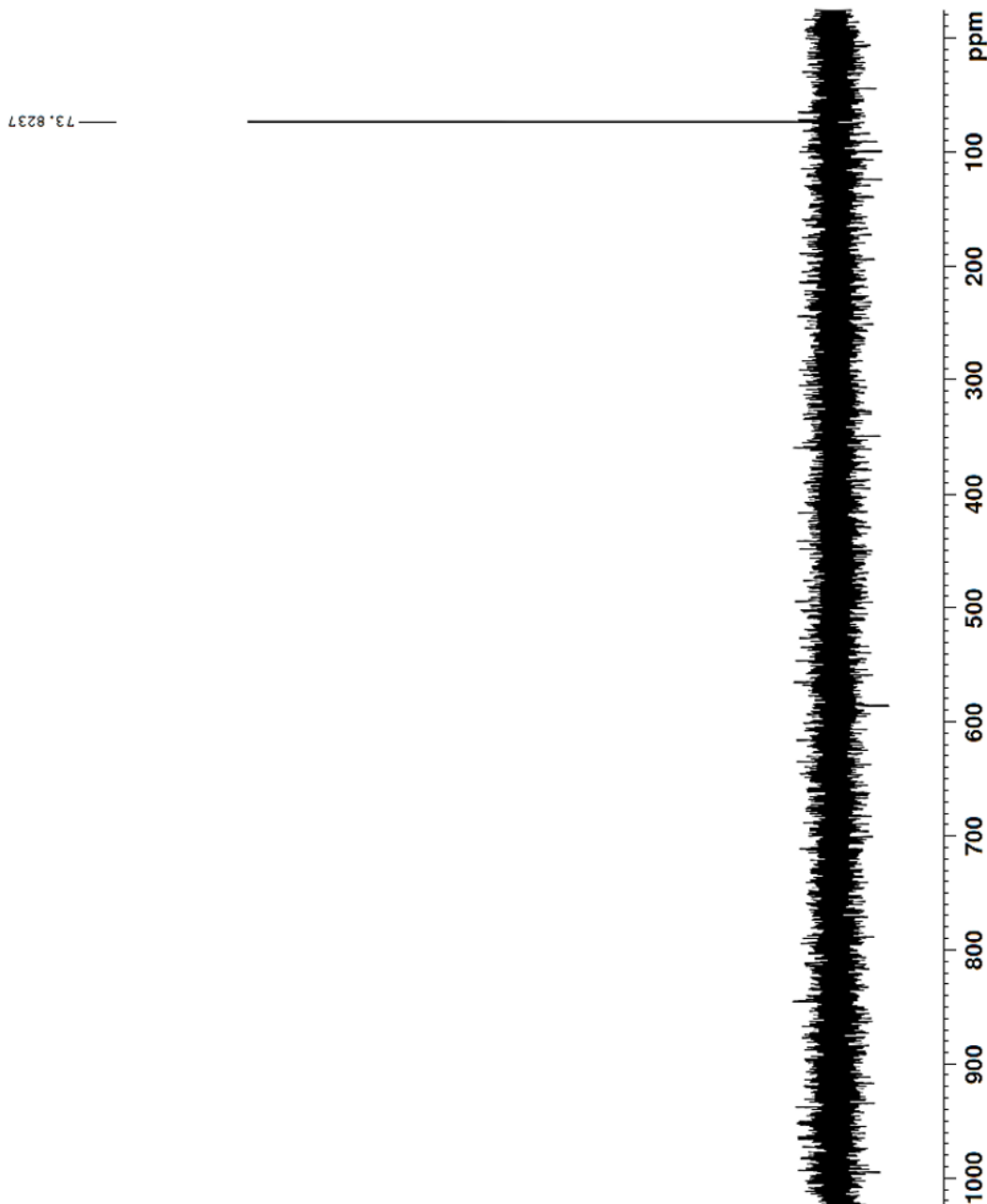
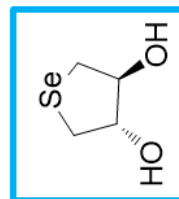
Current Data Parameters
NAME          141122
EXPNO         11
PROCNO        1

F2 - Acquisition Parameters
Date_         20141122
Time          16.56
INSTRUM       spect
PROBHD        5 mm PABBO BB/
PULPROG       zgpg
TD            65536
SOLVENT       D2O
NS            54
DS            4
SWH           100000.000 Hz
FIDRES        1.525879 Hz
AQ            0.3276800 sec
RG            185.59
DW            5.000 use
DE            6.50 use
TE            297.1 K
D1            2.00000000 sec
D11           0.03000000 sec
TD0           1

===== CHANNEL f1 =====
SFO1          95.4300492 MHz
NUC1           77Se
P1            10.00 use
PLW1          110.00000000 W

===== CHANNEL f2 =====
SFO2          500.1320005 MHz
NUC2           1H
CPDPRG[2]     waltz16
PCPD2         70.00 use
PLW2          15.00000000 W
PLW12         0.44082001 W
PLW13         0.21600001 W

F2 - Processing parameters
SI            32768
SF            95.3823580 MHz
WDW           EM
  
```



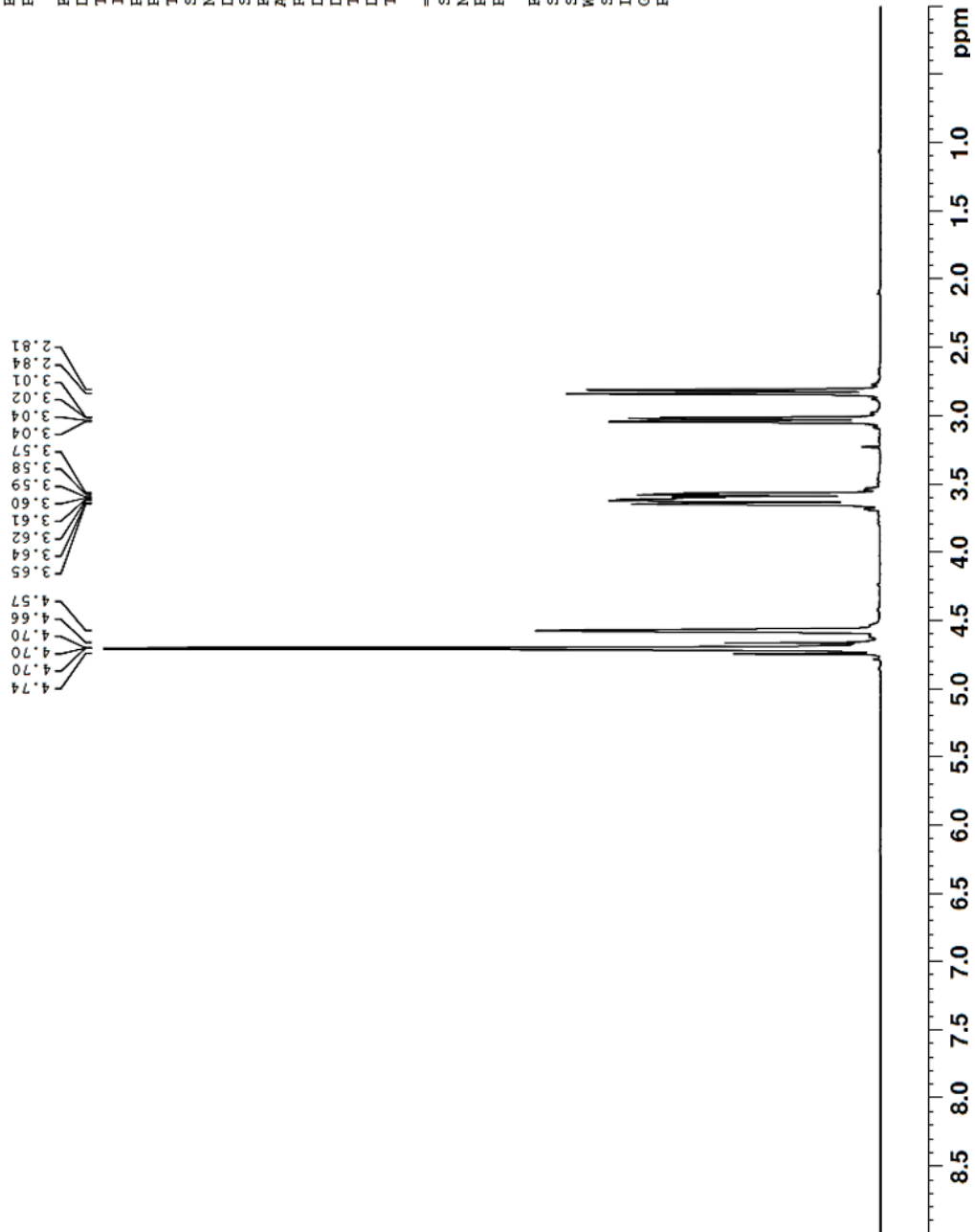
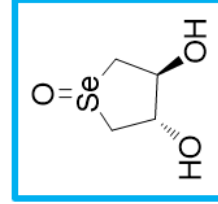
¹H-NMR DHS^{ox}

Current Data Parameters
NAME 140721
EXPNO 10
PROCNO 1

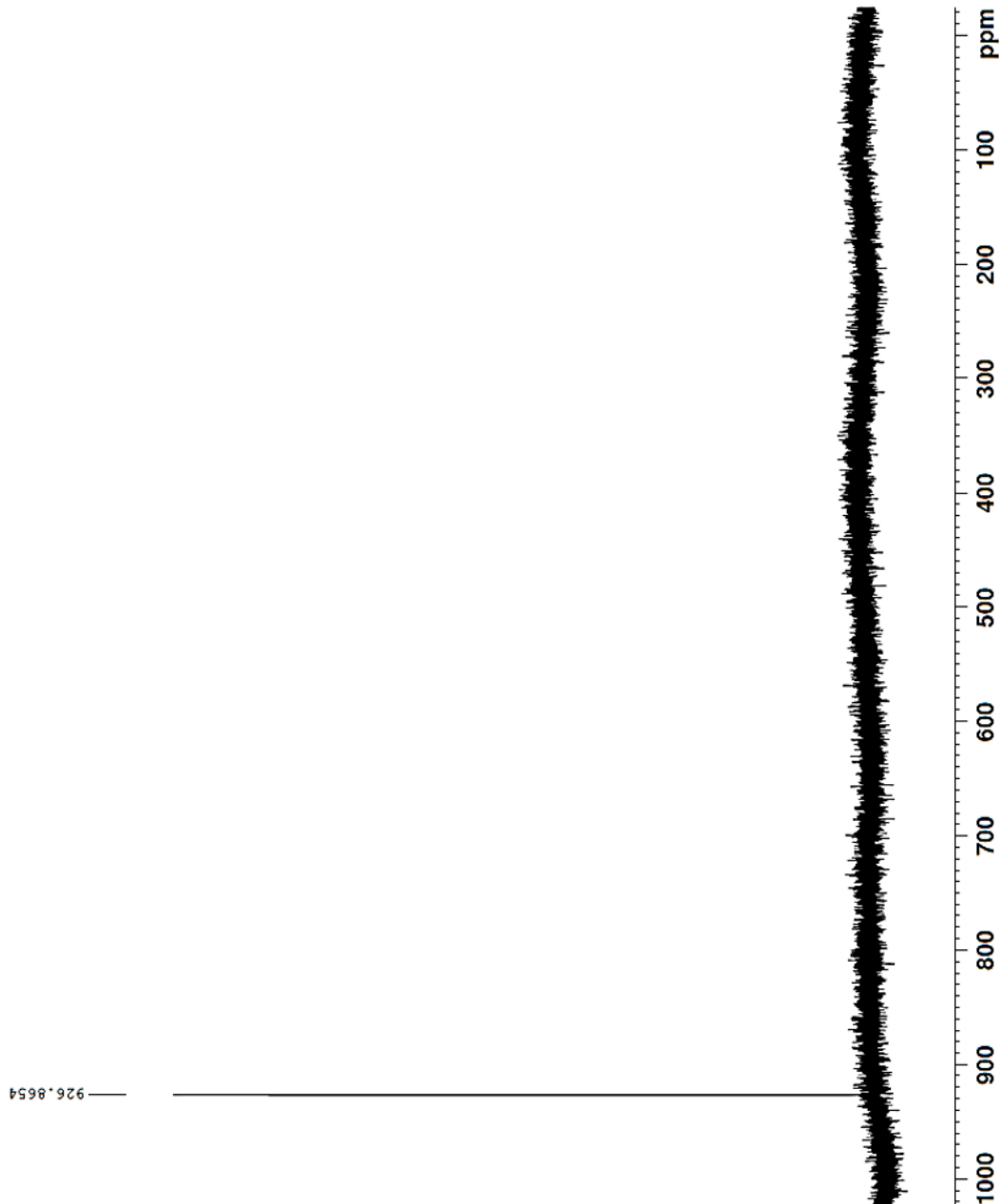
F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20140721
Time 19.53
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm FAPBO BB/
PULPROG zg30
TD 65536
SOLVENT D2O
NS 16
DS 2
SWH 10000.000 Hz
FIDRES 0.152588 Hz
AQ 3.2767999 sec
RG 119.97
DW 50.000 usec
DE 6.50 usec
TE 294.4 K
D1 1.00000000 sec
TD0 1

===== CHANNEL f1 =====
SFO1 500.1330885 MHz
NUC1 1H
P1 12.00 usec
PLW1 15.00000000 W

F2 - Processing parameters
SI 65536
SF 500.1300000 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00



⁷⁷Se-NMR DHS^{ox}



```

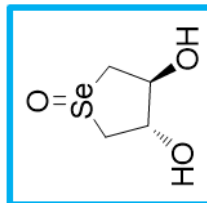
Current Data Parameters
NAME      140721
EXPNO     11
PROCNO    1

F2 - Acquisition Parameters
Date_     20140721
Time      20.04
INSTRUM   spect
PROBHD    5 mm PABBO BB/
PULPROG   zgpg
TD         65536
SOLVENT   D2O
NS         256
DS         4
SWH        100000.000 Hz
FIDRES     1.525879 Hz
AQ         0.3276800 sec
RG         185.59
DW         5.000 use
DE         6.50 use
TE         295.4 K
D1         2.0000000 sec
D11        0.0300000 sec
TD0        1

===== CHANNEL f1 =====
SFO1      95.4300492 MHz
NUC1       77Se
P1        10.00 use
PLW1     110.0000000 W

===== CHANNEL f2 =====
SFO2      500.1320005 MHz
NUC2       1H
CPDPRG[2  waltz16
PCPD2      70.00 use
PLW2     15.0000000 W
PLW12     0.44082001 W
PLW13     0.21600001 W

F2 - Processing parameters
SI         32768
SF         95.3823580 MHz
WDW        EM
    
```



業績一覧

学術論文

1. Arai, K., Shibagaki, W., Shinozaki, R., Iwaoka, M. Reinvestigation of the Oxidative Folding Pathways of Hen Egg White Lysozyme: Switching of the Major Pathways by Temperature Control. *Int. J. Mol. Sci.*, **2013**, *14*(7), 13194-13212
2. Shinozaki, R., Iwaoka, M. Effects of Metal Ions, Temperature, and a Denaturant on the Oxidative Folding Pathways of Bovine α -Lactalbumin. *Int. J. Mol. Sci.*, **2017**, *18*(9), 1996-2010

講演要旨

1. Shinozaki, R., Takumi, M., Iwaoka, M. Oxidative folding of bovine β -lactoglobulin by using a selenium reagent. *FEBS J.*, **2017**, *284*, 218

国際学会(ポスター発表)

1. Shinozaki, R., Arai, K., Iwaoka, M. Application of a water-soluble selenoxide reagent to oxidative folding of lysozyme. 12th International Conference on the Chemistry of Selenium&Tellurium (ICCST-12), Cardiff, UK, 2013 年 6 月
2. Shinozaki, R., Iwaoka, M. Reinvestigation of oxidative folding pathways of bovine α -lactalbumin by using water-soluble selenium oxidant DHS^{ox}. The 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem 2015), Honolulu, USA, 2015 年 12 月
3. Shinozaki, R., Arai, K., Shibagaki, W., Iwaoka, M. Water Soluble Selenoxide Reagents for Oxidative Folding of Disulfide Containing Proteins. 5th Workshop of SeS Redox and Catalysis (WSeS-5), Kanagawa, Japan, 2016 年 5 月
4. Shinozaki, R., Takumi, M., Iwaoka, M. Oxidative folding of bovine β -lactoglobulin by using a selenium reagent. 42ND Federation of European Biochemical Societies Congress (FEBS Congress 2017), Jerusalem, Israel, 2017 年 9 月

国内学会(口頭発表)

1. 篠崎玲奈、荒井堅太、岩岡道夫、高いジスルフィド形成能を有する水溶性セレノキシド試薬を用いたニワトリ卵白リゾチームの酸化的フォールディング、日本化学会第 93 春季年会、立命館大学びわこ・くさつキャンパス、2013 年 3 月
2. 篠崎玲奈、荒井堅太、柴垣航、岩岡道夫、Mechanistic study on the oxidative folding of hen egg white lysozyme by using a water-soluble selenoxide reagent. 東海大学総合研究機構「元素機能プロジェクト」第 2 回合同ゼミナール、東海大学湘南キャンパス、2013 年 7 月、口頭発表。

3. 篠崎玲奈、岩岡道夫、高いジスルフィド形成能を有する水溶性セレノキシド試薬を用いた α -ラクトアルブミンの酸化的フォールディング、日本化学会第 95 春季年会、日本大学船橋キャンパス、2015 年 3 月
4. 篠崎玲奈、岩岡道夫、 α -Lactalbumin の酸化的フォールディングにおける鍵中間体の熱力学的な安定性と経路への影響、第 5 回日本生物物理学会関東支部、桐生地域地場産業振興センター、2016 年 3 月
5. Shinozaki, R., Iwaoka, Characterization of Disulfide Intermediates in the Oxidative Folding of α -Lactalbumin. 日本化学会第 96 春季年会、同志社大学京田辺キャンパス、2016 年 3 月

国内学会(ポスター発表)

5. 篠崎玲奈、荒井堅太、岩岡道夫、水溶性セレノキシド試薬を用いたニワトリ卵白リゾチームの酸化的フォールディング機構の解明、東海大学総合研究機構「元素機能プロジェクト」公開研究成果発表会、東海大学湘南キャンパス、2013 年 3 月
6. 篠崎玲奈、荒井堅太、柴垣航、岩岡道夫、水溶性セレノキシド試薬を用いたニワトリ卵白リゾチームの酸化的フォールディング機構の解明、第 13 回日本蛋白質科学会年会、とりぎん文化会館、2013 年 6 月
7. 篠崎玲奈、荒井堅太、柴垣航、岩岡道夫、水溶性セレノキシド試薬を用いたニワトリ卵白リゾチームの酸化的フォールディング機構の解明、東海大学マイクロ・ナノ啓発会(Tune)第 2 回学術講演会、東海大学湘南キャンパス、2014 年 2 月
8. 篠崎玲奈、荒井堅太、柴垣航、岩岡道夫、水溶性セレノキシド試薬を用いたニワトリ卵白リゾチームの酸化的フォールディング機構の解明、東海大学マイクロ・ナノ啓発会(Tune)第 3 回学術講演会、東海大学湘南キャンパス、2014 年 7 月
9. 篠崎玲奈、岩岡道夫、水溶性セレノキシド試薬を用いた α -lactalbumin の酸化的フォールディング経路の解明、東海大学マイクロ・ナノ啓発会(Tune)第 4 回学術講演会、東海大学湘南キャンパス、2015 年 2 月
10. 篠崎玲奈、岩岡道夫、水溶性セレノキシド試薬を用いた α -ラクトアルブミンの酸化的フォールディング経路の研究、有機合成化学協会関東支部ミニシンポジウム湘南 2015、東海大学湘南キャンパス、2015 年 6 月
11. 篠崎玲奈、岩岡道夫、The oxidative folding of α -lactalbumin under mild basic conditions by using a selenoxide reagent. 第 53 回日本生物物理学会年会、金沢大学角間キャンパス、2015 年 9 月
12. 篠崎玲奈、岩岡道夫、 α -Lactalbumin のフォールディング中間体とフォールディング経路の関係性、第 16 回日本蛋白質科学会年会、福岡国際会議場、2016 年 6 月
13. 荒井賢太、武居俊樹、篠崎玲奈、朝比奈雄也、北条裕信、岩岡道夫、C-ペプチド領域をもたないウシ膵臓インスリンの二本鎖酸化的フォールディング経路、第 54 回日本生物物理学会年会、つくば国際会議場、2016 年 11 月

14. 篠崎玲奈、岩岡道夫、金属イオンが α -ラクトアルブミンのフォールディング中間体の熱力学的安定性に与える影響、第 54 回日本生物物理学会年会、つくば国際会議場、2016 年 11 月
15. 篠崎玲奈、牧野翔、岩岡道夫、牛肺由来アプロチニンの酸化的フォールディングへの水溶性セレン酸化剤の応用、日本化学会第 97 春季年会、慶應義塾大学日吉キャンパス、2017 年 3 月

謝辞

本研究を行なうに当たり、多くの方々にご指導・ご協力頂きましたので、この場を借りて感謝の意を述べさせていただきます。

理学部化学科の岩岡道夫教授には大学 4 年生に研究室に配属されてから 6 年間に渡ってご指導を頂きました。研究内容に関するご指導だけでなく、研究者としての在り方も教えて頂きましたこと、深く感謝致します。

理学部化学科の大場武教授、農学部バイオサイエンス学科の荒木明洋教授、工学部生命化学科の小島直也教授、蟹江治教授にはお忙しい中、貴重な時間を割いて審査して頂きました。幅広い分野から貴重なご意見を頂き、深く感謝致します。

理学部化学科の荒井堅太講師には研究室に配属した大学 4 年生の時からご指導頂きました。研究の知識の乏しかった当時の私に根気強くディスカッションして頂いたこと、深く感謝致します。

工学部生命化学科の片山秀和准教授にはお忙しい中、分析を行なって頂きましたこと、深く感謝致します。

研究推進部技術共同管理室の蟹江善美博士、小田慶喜博士には分析機器のご提供や研究に関する助言を頂きましたこと、深く感謝致します。

私の研究生生活を支えて下さった岩岡研究室のメンバー、暖かく見守ってくれた友人達、お世話になった全ての方々に心より感謝致します。

篠崎 玲奈