

## 蛋白質工学による酵素の構造と機能の研究：リゾチームの触媒 反応機構解明と機能変換

河村 俊介<sup>1)</sup>・衛藤 仁<sup>2)</sup>・米田 一成<sup>1)</sup>・荒木 朋洋<sup>1)</sup>

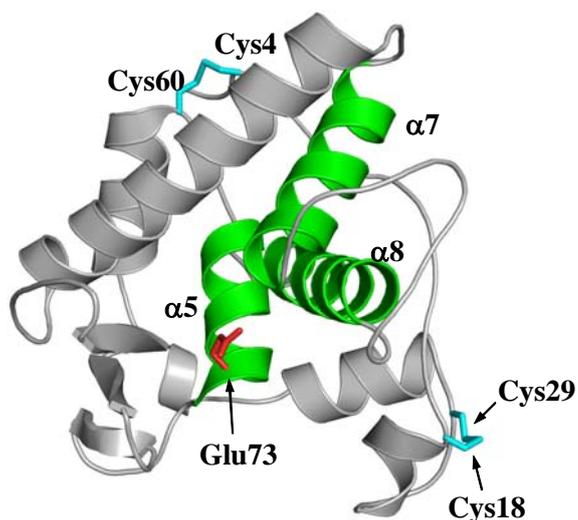
<sup>1)</sup> バイオサイエンス学科、<sup>2)</sup> 阿蘇教養教育センター

### 1. 研究目的

本プロジェクトは、高い溶菌活性と組織修復促進作用を持ち、生体防御因子として重要な役割をはたすリゾチームに蛋白質工学的手法を適用し、その触媒反応機構や立体構造構築機構の詳細な解析、さらには機能変換酵素の作製や機能変換機構の解明についても試み、新規有用タンパク質の創製や酵素の応用面での新しい展開を図るための基盤確立を目指すものである。

リゾチームは糖質加水分解酵素であり、細菌細胞壁ペプチドグリカンの *N*-アセチルムラミン酸 (MurNAc) と *N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc) の共重合体およびキチンを構成する GlcNAc の重合体の  $\beta$ -1, 4 グリコシド結合を加水分解する糖加水分解酵素である。リゾチームはそのアミノ酸配列からニワトリ型リゾチーム、T4 ファージ型リゾチームおよびグース型リゾチームの大きく3つに分類されている。グース型リゾチームは、ニワトリ型リゾチームと比べて3倍強力な溶菌活性を有するなど優れた特性を持つが、その1次構造はタンパク質から5種類、遺伝子から5種類明らかにされているのみであり、ニワトリ型や T4 ファージ型と比較して、その構造と機能に関する研究は遅れている。グース型リゾチームは8本の $\alpha$

ヘリックスと3つの $\beta$ シートからなる立体構造を有するが (Fig. 1)、2本のジスルフィ



**Fig. 1. The three-dimensional structure of GEL .**

The two disulfide bonds (Cys4-Cys60 and Cys18-Cys29) and three  $\alpha$ -helices ( $\alpha$ 5,  $\alpha$ 7, and  $\alpha$ 8) are shown in blue and green, respectively. The side chain of Glu73 is also shown in red.

ド結合 (Cys4-Cys60, Cys18-Cys29) と分子内コア構造を形成する 3 つのヘリックス ( $\alpha 5$ ,  $\alpha 7$ ,  $\alpha 8$ ) は種間で高く保存されており、グース型リゾチームが活性を発現するための立体構造形成における重要性が予測される。

近年我々は、ダチョウ卵白由来グース型リゾチーム (OEL) の遺伝子の人工合成と OEL の酵母での大量発現系を構築し、OEL はニワトリ型リゾチームとは異なり糖転移反応を触媒しない糖加水分解酵素であることを明らかにした。また、この確立した酵母での大量発現系を利用して、 $\alpha 5$  の C 末端に位置する Glu73 に関する変異体の解析を行い、Glu73 がグース型リゾチームのプロトンドナーとして働く触媒基であることを初めて実験的に証明するとともに、構造安定性にも重要であるという他の糖加水分解酵素では見られない興味深い事実を明らかにした。OEL は安定でその変性過程が可逆かつ 2 状態変性をたどることから、グース型リゾチームの触媒反応機構だけではなく、立体構造の構造安定性機構を解明するための良い分子ツールであると考えられる。

本年度の研究では、主にグース型リゾチームの構造と機能を解明する一環として、種間で高く保存されている 2 本のジスルフィド結合 (Cys4-Cys60, Cys18-Cys29) の主鎖構造、触媒活性、構造安定性および立体構造形成に与える影響を詳細に解析し、その役割を実験的に証明した。

## 2. 材料および方法

### (1) ジスルフィド結合を欠失した変異体の作製

変異リゾチーム遺伝子は、PCR による部位特異的変異法で作製した。OEL の cDNA を鋳型にして、目的とする変異を含むプライマーと cDNA の 3' 末端に相補的なプライマーを用いて PCR を行った。次にこの PCR 産物と cDNA の 5' 末端に相補的なプライマーを用いて再度 PCR を行い、変異リゾチーム遺伝子を作製した。作製した変異遺伝子は pBluescript ベクターの *Xho*I と *Eco*RI 部位に連結後、DNA シークエンスを行い目的の変異を確認した。各変異遺伝子は、酵母用発現ベクターである pPIC9K の  $\alpha$ -factor シグナル配列下に挿入後、メタノール資化能を有する宿主酵母 *Pichia pastoris* GS115 に形質転換し、得られた遺伝子組み換え酵母を用いて変異の発現を行った。発現した変異体は陽イオン交換クロマトグラフィーで精製した。

### (2) 円偏光二色性 (CD) スペクトル

CD スペクトルは、日本分光社製 J-600 を用いて測定した。試料は 10 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) に溶解し、0.15 mg/ml の濃度に調整した。光路長 0.5 mm のセルを用いて、室温にて 260 nm から 190 nm におけるスペクトルを測定した。

### (3) 溶菌活性

溶菌法による活性測定は、MurNAc と GlcNAc の共重合体を細胞壁の構成成分とする *Micrococcus luteus* 菌体に対するリゾチームの溶菌作用を測定する方法で行った。基質溶液は

*Micrococcus luteus* の菌体 (Sigma 製) を 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) に懸濁し、540 nm における濁度が 0.9 になるように調製した。酵素反応は、基質溶液 3 ml に、酵素溶液を 100  $\mu$ l (終濃度 0.015  $\mu$ M) 加えて行い、室温で 540 nm における基質溶液の濁度の減少勾配から初速度を測定した。

#### (4) GlcNAc の 5 量体に対する活性測定

0.01 M 酢酸緩衝液 (pH 4.0) に溶解した酵素溶液と基質溶液は、それぞれ 40°C で 5 分間プレインキュベーションした後、基質溶液に酵素溶液を加えて反応を開始した。反応は酵素濃度約  $1.0 \times 10^{-4}$  M、基質濃度約  $1.0 \times 10^{-3}$  M で行った。反応生成物の分析は、TSKgel G-Oligo-PW カラム (4.6  $\times$  250 mm, 東ソー製) を 2 本連結した HPLC で行った。溶出は高純度蒸留水を用い、室温、流速 0.3 ml/min で行った。GlcNAc のオリゴマーはアセチル基に由来する 220 nm の紫外吸収で検出した。反応生成物の各オリゴマーのピーク面積は Smartchrom (KYA TeCH Co.) を用いて測定した。GlcNAc のオリゴマーの濃度は測定された面積と標準曲線から換算した。標準曲線は 10  $\mu$ l の濃度既知 ( $0.5 \times 10^{-3}$  M ~  $4.0 \times 10^{-3}$  M) の (GlcNAc)<sub>1</sub> から (GlcNAc)<sub>5</sub> を活性測定法と同一カラム、同一条件で分離し、オリゴマーの濃度と面積から作製した。

#### (5) 熱に対する熱力学的安定性

熱に対するタンパク質の安定性は、温度変化に伴うタンパク質の蛍光強度 (励起波長 ; 280 nm, 蛍光波長 ; 360 nm) または CD での 220 nm の楕円率の変化で測定した。タンパク濃度は、蛍光測定では 0.015 mg/ml に CD 測定では 0.15 mg/ml に、0.5 M グアニジン塩酸 (GdnHCl) を含む 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) で調整した。タンパク質の変性が 2 状態変性であると仮定し、各温度に対する平衡定数  $K_a$  および変性の自由エネルギー変化  $\Delta G_D$  を下記の式より求めた。

$$K_a = [D]/[N]$$

$$\Delta G_D = -RT \ln K_a$$

R : 気体定数, T : 絶対温度

タンパク質が半分変性する変性の中間温度 ( $T_m$ ) は、 $\Delta G_D = 0$  となるときの絶対温度  $T$  をセ氏温度 (°C) に変換して求めた。 $T_m$  における変性のエンタルピー変化  $\Delta H_m$  とエントロピー変化  $\Delta S_m$  は下記の式から求めた。

$$\Delta H_m = -Rd(\ln K_a)/d(1/T)$$

$$\Delta S_m = -\Delta H_m/T_m$$

野生型 (WT) と変異体の  $T_m$  における変性の自由エネルギー変化の差 ( $\Delta\Delta G$ ) は下記の式から求めた。

$$\Delta\Delta G = \Delta T_m \times \Delta S_m (T_m \text{ における WT の } \Delta S_m)$$

(6) 変性剤に対する熱力学的安定性

変性剤である GdnHCl に対するタンパク質の安定性は、GdnHCl の濃度変化に伴うタンパク質の蛍光強度 (励起波長 ; 280 nm, 蛍光波長 ; 360 nm) または CD での 220 nm の楕円率の変化で測定した。タンパク濃度は、蛍光測定では 0.015 mg/ml に CD 測定では 0.15 mg/ml に調整し、GdnHCl 濃度は 0 ~ 7.5 M になるように 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) で調製した。試料溶液は、30°C で 1 時間以上インキュベートした後、各変性剤濃度における安定性を測定した。タンパク質の変性が 2 状態変性であると仮定し、各 GdnHCl 濃度に対する平衡定数  $K_d$  および変性の自由エネルギー変化  $\Delta G_D$  を下記の式より求めた。

$$K_d = [D]/[N]$$

$$\Delta G_D = -RT \ln K_d$$

$R$ : 気体定数,  $T$ : 絶対温度

安定性の指標となる変性剤非存在下における変性の自由エネルギー変化 ( $\Delta G_D^{H2O}$ ) は、 $\Delta G_D$  を GdnHCl 濃度に対してプロットし、 $\Delta G_D$  が GdnHCl 濃度と比例関係にあると仮定して下記の式より算出した。

$$\Delta G_D = \Delta G_D^{H2O} - m[\text{GdnHCl}]$$

$m$ : 比例定数

タンパク質が半分変性する変性曲線の中点の変性剤濃度 ( $C_m$ ) では  $K_d = 1$  であることから、 $C_m$  は下記の式より算出した。

$$C_m = \Delta G_D^{H2O} / m$$

野生型 (WT) と変異体との変性剤非存在下での変性の自由エネルギー変化の差 ( $\Delta\Delta G_D^{H2O}$ ) は下記の式から求めた。

$$\Delta\Delta G_D^{H2O} = \Delta G_D^{H2O}(\text{mutant}) - \Delta G_D^{H2O}(\text{WT})$$

### 3. 結果および考察

#### (1) ジスルフィド結合を欠失した変異体の発現と精製および CD スペクトル

グース型リゾチームの 2 本のジスルフィド結合は分子表面に位置していることから、OEL の 4 つの Cys 残基 (Cys4, Cys18, Cys29, Cys60) を Ser または Ala に置換し、2 本のジスルフィド結合を個々に欠失した 4 種の変異体 (C4S/C60S, C18S/C29S, C4A/C60A, C18A/C29A) とすべてのジスルフィド結合を欠失した変異体 (C4S/C18S/C29S/C60S) を作製した。酵母で分泌発現した変異体は、2 段階の陽イオン交換クロマトグラフィーで単一に精製し、各変異体の培地 1 L あたりの収量は約 60-80 mg であった。精製した変異体の N 末端アミノ酸配列は Ser-Arg-Thr-Gly であり、 $\alpha$ -因子シグナル配列は正しくプロセシングされていることが確認できた。次に、酵母で発現して精製したジスルフィド結合欠失変異体が、タンパク質合成後正しくフォールディングしたかを調べるために、Cys を Ser に置換した 3 種の変異体に関してタンパク質の主鎖構造の情報が得られる遠紫外領域 (190 ~ 260 nm) の CD スペクトルを測定した (Fig. 2)。各変異体と WT の CD スペクトルは殆ど同一であったことから、2 本のジスルフィド結合を欠失してもグース型リゾチームの主鎖構造には変化がないことが示された。

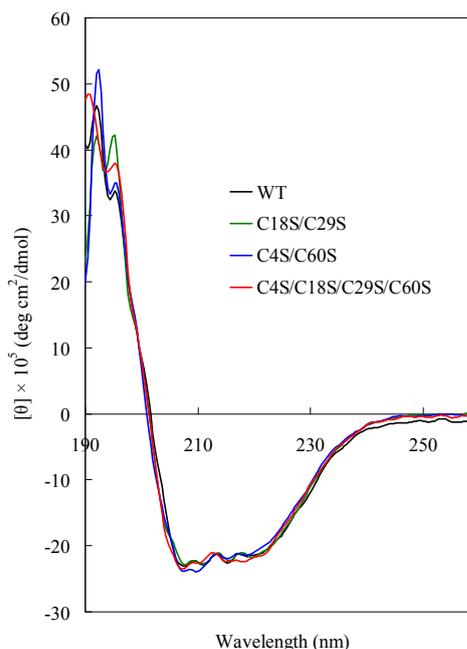


Fig. 2. CD spectra of WT and its three mutant proteins in the far-ultraviolet region.

#### (2) 触媒活性

3 種の変異体 (C4S/C60S, C18S/C29S, C4S/C18S/C29S/C60S) の活性は、まず基質に MurNAc と GlcNAc の共重合体を細胞壁の構成成分とする *Micrococcus luteus* を基質に用いて、その溶菌作用を測定する方法で簡易的に評価した (Fig. 3)。WT の 1 分から 5 分の濁度の減少の傾きを 100%とした場合、C4S/C60S では 99.0%、C18S/C29S と C4S/C18S/C29S/C60S ではそれぞれ 76.5%と 70.6%であった。

次に、低分子基質である (GlcNAc)<sub>5</sub> に対する活性を測定した (Fig. 4)。変異体 C4S/C60S では、基質である (GlcNAc)<sub>5</sub> が反応開始後約 240 分で分解され、主に (GlcNAc)<sub>2</sub> と (GlcNAc)<sub>3</sub> の生成物を生じ、WT と同じ反応タイムコースを示した。変異体 C18S/C29S と C4S/C18S/C29S/C60S では若干の酵素活性の低下が見られたが、(GlcNAc)<sub>5</sub> は反応開始後約 420 分で分解され、WT と同じ反

応産物を生じた。したがって、2本のジスルフィド結合は触媒活性には必須ではないことが明らかとなった。CDスペクトルと活性の解析から、グース型リゾチームはジスルフィド結合がなくても触媒活性を発現する正しい立体構造を形成できることが示された。

### (3) 酵素活性の最適温度

WTと2本のジスルフィド結合欠失変異体の酵素活性の最適温度は、(GlcNAc)<sub>5</sub>に対する活性で評価した (Fig. 5)。その結果、WTは60°Cで最も基質5量体を分解し、65°C以上では急激に活性が低下した。一方、変異体C4S/C18S/C29S/C60Sでは、活性の最適温度が20°C低下し、WTの最適温度である60°Cではほぼ活性が消失した。したがって、2本のジスルフィド結合はグース型リゾチームの安定性に重要であることが示唆された。

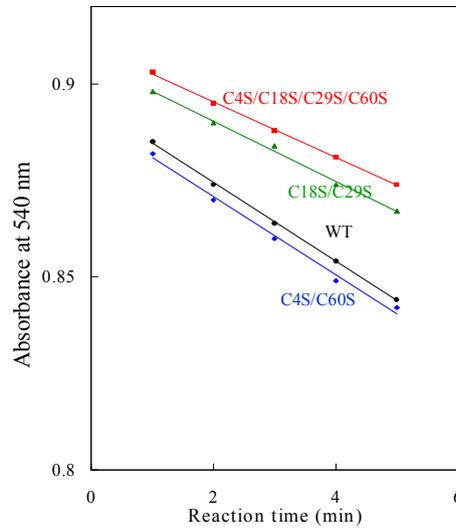


Fig. 3. Lytic activity of *M. luteus* cells by WT and its three mutants.

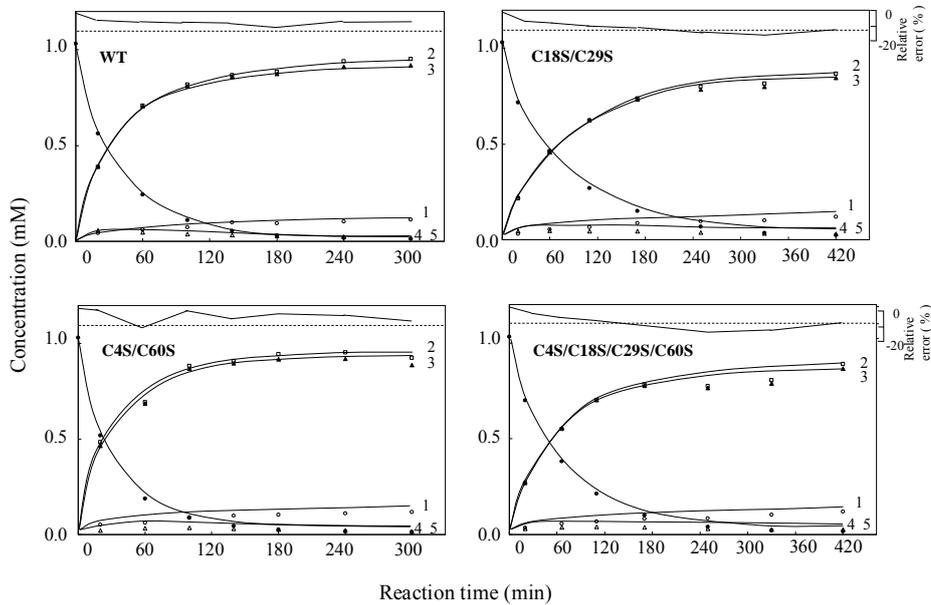


Fig. 4. Time course plots of (GlcNAc)<sub>5</sub> degradation by WT and its three mutant proteins. Numerals in the figures are the polymerization degrees of the reaction product species.

(4) 蛍光を用いたジスルフィド結合欠失変異体の熱力学的安定性の解析

WT と Cys を Ser に置換した 3 種の変異体の熱力学的安定性は、まず熱に対する安定性をタンパク質の変性に伴う Trp や Tyr 残基の空間的配置の変化を蛍光スペクトルで追跡することで評価した。得られた熱変性曲線を Fig. 6 に、熱変性曲線から算出した熱力学的パラメーターを Table 1 に示した。その結果、各変異体の熱変性曲線は低温側にシフトし、WT と比べて熱安定性が大きく低下していた (Fig. 6)。WT の変性の midpoint 温度 ( $T_m$ ) が 60.6°C であるのに対し、C18S/C29S、C4S/C60S、C4S/C18S/C29S/C60S ではそれぞれ

54.3°C ( $\Delta T_m = -6.3^\circ\text{C}$ )、51.1°C ( $\Delta T_m = -9.5^\circ\text{C}$ )、45.3°C ( $\Delta T_m = -15.3^\circ\text{C}$ ) に低下し、WT の  $T_m$  値での WT と各変異体の変性の自由エネルギー変化の差 ( $\Delta\Delta G$ ) は、C18S/C29S では  $-3.21$  kcal/mol、C4S/C60S では  $-4.85$  kcal/mol、C4S/C18S/C29S/C60S では  $-7.80$  kcal/mol と低下した (Table 1)。また、WT の熱安定性を還元剤である  $\beta$ -メルカプトエタノール ( $\beta$ -ME) 存在下で測定した結果、その変性曲線は 2 本のジスルフィド結合を欠失した変異体 C4S/C18S/C29S/C60S の変性曲線とほぼ一致した (Fig. 6)。還元剤存在下での WT の  $T_m$  値は

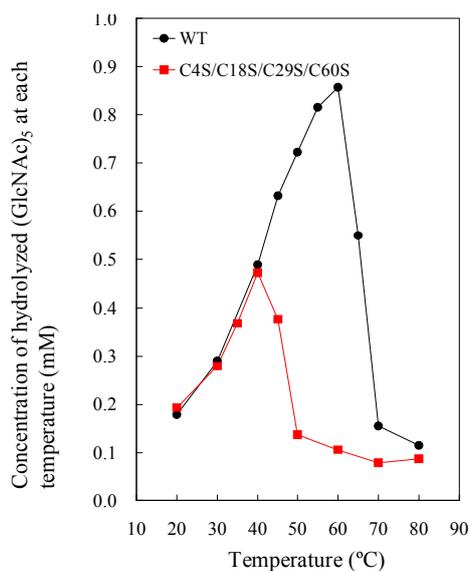


Fig. 5. Temperature dependence of the catalytic activity for the hydrolysis of (GlcNAc)<sub>5</sub> by WT and mutant C4S/C18S/C29S/C60S.

The concentrations of hydrolyzed (GlcNAc)<sub>5</sub> at each temperature were calculated by subtracting the concentration of the remaining (GlcNAc)<sub>5</sub> from that of the initial (GlcNAc)<sub>5</sub> substrate.

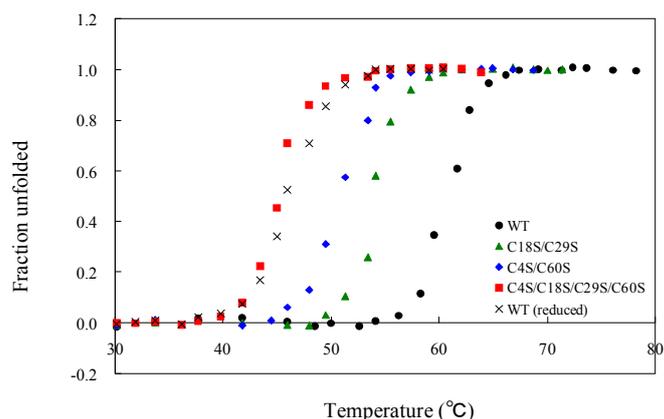


Fig. 6. Thermal unfolding curves of WT and its mutants obtained by fluorescence measurements.

The thermal unfolding curve of WT treated with  $\beta$ -ME for reduction is indicated as "WT (reduced)".

Table 1. Parameters characterizing the thermal denaturation of WT and its mutants. Thermodynamic parameters were calculated from the thermal unfolding curves presented in Figs. 6 and 8.

	Method	$\Delta H_m$ (kcal/mol)	$\Delta S_m$ (kcal/mol·K)	$T_m$ (°C)	$\Delta T_m$ (°C)	$\Delta\Delta G$ (kcal/mol)
WT	Flu <sup>a</sup>	170.1	0.510	60.6	—	—
C18S/C29S	Flu <sup>a</sup>	161.8	0.494	54.3	-6.3	-3.21
C4S/C60S	Flu <sup>a</sup>	145.5	0.452	51.1	-9.5	-4.85
C4S/C18S/C29S/C60S	Flu <sup>a</sup>	127.6	0.401	45.3	-15.3	-7.80
WT (reduced)	Flu <sup>a</sup>	107.6	0.337	46.2	-14.4	-7.34
WT	CD	166.9	0.501	60.5	—	—
C4S/C18S/C29S/C60S	CD	125.0	0.393	45.3	-15.2	-7.62

<sup>a</sup> Fluorescence

46.2°Cであり、C4S/C18S/C29S/C60Sの $T_m$ 値45.3°Cに近い値を示した。

次に、WTと変異体の変性剤であるGdnHClに対する安定性を測定した。得られた変性曲線をFig. 7に、変性曲線から計算した熱力学的パラメーターをTable 2に示した。熱安定性の低下と同様に、WTの変性の中点濃度( $C_m$ )が2.21 Mであるのに対し、変異体C18S/C29S、C4S/C60S、C4S/C18S/C29S/C60Sの $C_m$ 値はそれぞれ1.74 M ( $\Delta C_m = -0.47$  M), 1.51 M ( $\Delta C_m = -0.70$  M), 1.14 M ( $\Delta C_m = -1.07$  M)に低下した。WTと各変異体の水中での変性の自由エネルギー変化の差( $\Delta\Delta G^{H2O}$ )は、C18S/C29Sで-2.33 kcal/mol、C4S/C60Sで-3.33 kcal/mol、C4S/C18S/C29S/C60Sで-4.86 kcal/molであり安定性は大きく低下した。さらに、Cys4とCys60およびCys18とCys29をそれぞれAlaに置換した2種の変異体(C4A/C60A, C18A/C29A)のGdnHClに対する安定性を測定し、C18S/C29SとC4S/C60Sの安定性と比較した(Fig. 7 and Table 2)。その結果、C4A/C60A( $C_m$ : 1.51 M,  $\Delta\Delta G^{H2O}$ : -3.18 kcal/mol)とC18A/C29A( $C_m$ : 1.75 M,  $\Delta\Delta G^{H2O}$ : -2.18 kcal/mol)の安定性はC18S/C29SとC4S/C60と同じであった。

これらの結果より、各変異体の安定性の低下はジスルフィド結合の欠失に起因することが明らかとなった。また、変異体C4S/C18S/C29S/C60Sの $\Delta T_m$ 値(-15.3°C)と $\Delta C_m$ 値(-1.07 M)は、それぞれ変異体C4S/C60SとC18S/C29Sの各 $\Delta T_m$ 値の総和(-15.8°C)と $\Delta C_m$ 値の総和(-1.17 M)とよく一致したことから、2本のジスルフィド結合の安定性への影響は加算的であった。各変異体で見られた安定性の低下は、ジスルフィド結合の欠失に起因する天然状態の構造変化とエントロピー効果による変性状態の自由度の変化の2つの要因が考えられることから、Paceらの式[ $\Delta S = -2.1 - 1.5 \times R \times \ln n$  (cal·mol<sup>-1</sup>·K) (R: 気体定数, n: ジスルフィド結合で架橋されているアミノ酸残基数)]にしたがって、変性状態のエントロピー効果を理論的に計算した。その結果、Cys18-Cys29またはCys4-Cys60を欠失したときの変性状態のエントロピーは、それぞれ9.51 cal·mol<sup>-1</sup>·Kと14.15 cal·mol<sup>-1</sup>·K増加し、WTの $T_m$ 値(60.6°C)における変性状態のエントロピー効果によってのみ低下する変異体C18S/C29SとC4S/C60Sの変性の自由エネルギー変化(-

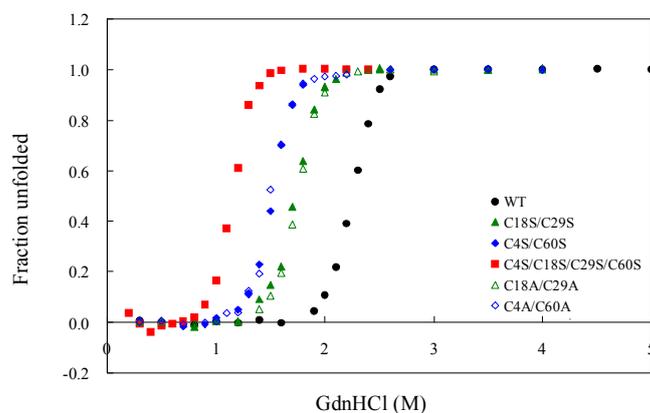


Fig. 7. Guanidine hydrochloride (GdnHCl)-induced unfolding curves of WT and its mutants obtained by fluorescence measurements.

Table 2. Parameters characterizing the guanidine hydrochloride (GdnHCl) denaturation of WT and its mutants. Thermodynamic parameters were calculated from the GdnHCl-induced unfolding curves presented in Figs. 7 and 9.

	Method	$m$ (kcal/mol·M)	$C_m$ (M)	$\Delta C_m$ (M)	$\Delta G_D^{H_2O}$ (kcal/mol)	$\Delta\Delta G_D^{H_2O}$ (kcal/mol)
WT	Flu <sup>a</sup>	5.48	2.21	—	12.11	—
C18S/C29S	Flu <sup>a</sup>	5.67	1.74	-0.47	9.88	-2.33
C4S/C60S	Flu <sup>a</sup>	5.84	1.51	-0.7	8.78	-3.33
C4S/C18S/C29S/C60S	Flu <sup>a</sup>	6.38	1.14	-1.07	7.25	-4.86
C18A/C29A	Flu <sup>a</sup>	5.68	1.75	-0.46	9.93	-2.18
C4A/C60A	Flu <sup>a</sup>	5.90	1.51	-0.70	8.93	-3.18
WT	CD	5.32	2.20	—	11.73	—
C4S/C18S/C29S/C60S	CD	6.37	1.14	-1.06	7.25	-4.48

<sup>a</sup> Fluorescence

$T\Delta S$ ) は、それぞれ $-3.17$  kcal/mol と $-4.72$  kcal/mol と見積もられた。この算出した値は、熱変性曲線から求めた C18S/C29S ( $\Delta\Delta G$ :  $-3.21$  kcal/mol) と C4S/C60S ( $\Delta\Delta G$ :  $-4.85$  kcal/mol) の実測値とほぼ同じ値を示した。さらに、理論計算から算出した変性の自由エネルギー変化の総和 [ $(-3.17) + (-4.72) = -7.89$  kcal/mol] は、変異体 C4S/C18S/C29S/C60S の実測値 ( $\Delta\Delta G$ :  $-7.80$  kcal/mol) ともよく一致したことから、各変異体の安定性の低下は、ジスルフィド結合よって変性状態のエントロピーが増加したことに起因すると考えられた。

##### (5) CD を用いた熱力学的安定性の解析

2本のジスルフィド結合がグース型リゾチームの変性と再生過程に与える影響に関しては、WT

とすべてのジスルフィド結合を欠失した変異体 C4S/C18S/C29S/C60S の熱と GdnHCl に対する安定性を、CD スペクトルを用いて解析することで評価した。その結果、CD 測定から算出した C4S/C18S/C29S/C60S の熱力学的パラメーターは、熱に対する安定性では  $T_m$  値が  $45.3^\circ\text{C}$  ( $\Delta T_m = -15.2^\circ\text{C}$ )、WT の  $T_m$  値での変性の自由エネルギー変化の差 ( $\Delta\Delta G$ ) は  $-7.62$  kcal/mol、GdnHCl に対する安定性では  $C_m$  値が  $1.14$  M ( $\Delta C_m = -1.06$  M)、水中での変性の自由エネルギー変化の差 ( $\Delta\Delta G^{\text{H}_2\text{O}}$ ) は  $-4.48$  kcal/mol であり、蛍光分析で得られた値とほとんど同じ値を示した (Tables 1 and 2)。また、WT と同様に C4S/C18S/C29S/C60S の熱と GdnHCl に対する変性曲線は、タンパク質の変性に伴う Trp や Tyr 残基の空間的配置の変化を追跡する蛍光分析と主鎖構造の変化を追跡する CD 分析の両方で一致した (Figs. 8 and 9)。したがって、グース型リゾチームの変性と再生過程は、ジスルフィド結合の有無に関わらず、変性の中間状態を伴わない 2 状態変性であることが確認できた。

以上の結果をまとめると、2 本のジスルフィド結合は、それぞれ独立して変性状態の構造の自由度を制限し、エントロピー的に変性状態の構造を不安定化することでグース型リゾチームの構造安定性に寄与していることが明らかとなった。さらに、すべてのジスルフィド結合を欠失しても変性と再生の過程に大きな変化はなく、WT とほぼ同程度の活性を有する構造を取り得ることから、2 本のジスルフィド結合はグース型リゾチームの立体構造形成の後期過程で各々独立して形成されると考えられた。これまでの研究から、 $\alpha$ -ヘリックス構造は立体構造形成の初期段階で形成されると考えられている。グース型リゾチームの 2 本のジスルフィド結合は立体構造形成や触媒活性に必須ではないことから、グース型リゾチームでは分子内コア構造を形成する 3 つの  $\alpha$ -ヘリックス ( $\alpha 5, \alpha 7, \alpha 8$ ) が立体構造形成の初期段階で形成され、それが核となって触媒活性を発現する全体構造が形成されていくと考えられた。

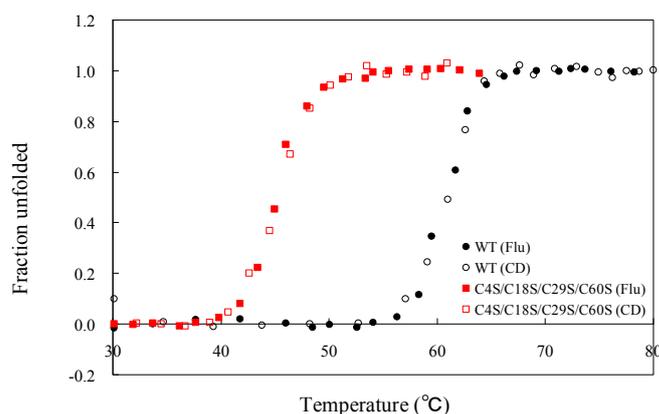


Fig. 8. Thermal unfolding curves of WT and mutant C4S/C18S/C29S/C60S obtained by CD and fluorescence measurements.

The unfolding curves of WT and mutant C4S/C18S/C29S/C60S obtained by CD are indicated as “WT (CD)” and “C4S/C18S/C29S/C60S (CD)”, respectively, and those of WT and mutant C4S/C18S/C29S/C60S obtained by fluorescence are indicated as “WT (Flu)” and “C4S/C18S/C29S/C60S (Flu)”, respectively.

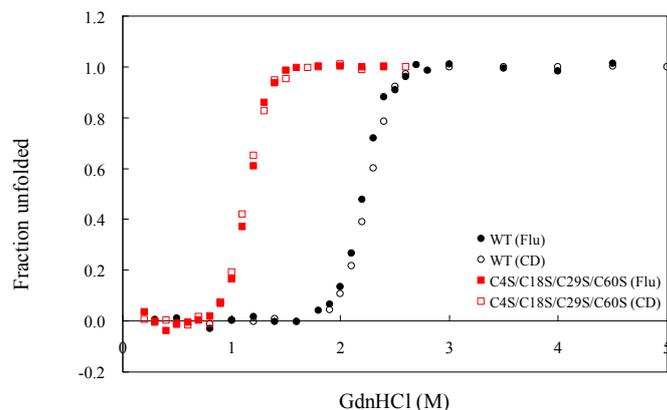


Fig. 9. Guanidine hydrochloride (GdnHCl)-induced unfolding curves of WT and mutant C4S/C18S/C29S/C60S obtained by CD and fluorescence measurements.

The unfolding curves of WT and mutant C4S/C18S/C29S/C60S obtained by CD are indicated as “WT (CD)” and “C4S/C18S/C29S/C60S (CD)”, respectively, and those of WT and mutant C4S/C18S/C29S/C60S obtained by fluorescence are indicated as “WT (Flu)” and “C4S/C18S/C29S/C60S (Flu)”, respectively.

#### 4. 引用文献

- (1) Imoto, T., et al. (1972) *The Enzymes* (Boyer, P. D., ed.) 7, 665-868
- (2) Weaver, L. H., et al. (1995) *J. Mol. Biol.*, 245, 54-68
- (3) Thammasirirak, S., et al. (2002) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 66, 147-156
- (4) Pooart, J., et al. (2004) *J. Biochem., Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 68, 159-169
- (5) Kawamura, S., et al. (2003) *J. Biochem.*, 133, 123-131
- (6) Kawamura, S., et al. (2006) *J. Biochem.*, 140, 75-85
- (7) Sarker, G., and Sommer, S. S. (1990) *Biotechniques* 8, 404-407
- (8) Bechtel, W. J., and Schellman, J. A. (1987) *Biopolymers* 26, 1859-1877
- (9) Pace, C. N. (1990) *Trends Biotechnol.*, 8, 93-98
- (10) Pace, C. N., et al. (1988) *J. Biol. Chem.*, 263, 11820-11825

#### 学会発表・その他

- (1) 仲宗根公一 他, グース型リゾチームのジスルフィド結合の役割  
日本蛋白質科学会年会 講演要旨集 p97, 2008年6月
  - (2) 河村俊介 他, ニホンウズラ卵白由来ニワトリ型リゾチームの構造機能相関  
日本農芸化学会大会 講演要旨集 p41 2009年3月
- 他 学会発表 3 件

- (1) Kawamura et al., Role of disulfide bonds in goose-type lysozyme. *FEBS Journal*, 275, 2818-2830, 2008
- (2) Hirakawa et al., Catalytic reaction mechanism of goose egg-white lysozyme by molecular modeling of enzyme-substrate complex. *Journal of Biochemistry*, 144, 753-761, 2008