

## 圧力 NMR による $\beta$ ラクトグロブリン変異体の 折り畳み初期中間状態における残基間相互作用の解析

櫻井 一正

### 要旨

これまでの研究から、圧力の増加に伴い (i) 力学的圧縮と (ii) 熱力学的転移の 2 つのタイプの蛋白質構造変化が同時に進行することが分かっている。(i) 力学的圧縮とは蛋白質が天然状態や中間体状態などあるひとつの状態のまま圧縮される構造変化であるのに対し、(ii) 熱力学的転移とは異なる状態への転移に伴う構造変化のことである。高圧 NMR という手法で各アミノ酸残基の化学シフトの圧力依存変化を測定し、それを主成分解析することで、(i) 力学的圧縮と (ii) 熱力学的転移に関わるアミノ酸残基を分離して同定できる。筆者は以前、 $\beta$  ラクトグロブリン (BLG) という蛋白質に対しこの解析を行ったところ、(ii) 熱力学的転移を示す残基が、折り畳み初期中間体のコア領域の残基と一致することが分かり、折り畳み過程の知見を得るうえでこの解析法は有用であることを示した。今回は、折り畳み経路が変化した変異体について同様の高圧 NMR 解析を行い、野生型と比較した。その結果、変異体の方ではコア領域が BLG のもつ 2 枚の  $\beta$  シートに渡って分布することが分かった。以前の折り畳み研究から、この変異体はシート間が相互作用することによって折り畳み効率が悪くなることが示唆されており、今回の解析結果はそれと一致するものであった。

キーワード：圧力 NMR、蛋白質の折り畳み、 $\beta$  ラクトグロブリン、化学シフト、主成分解析

### 1. 緒論

$\beta$  ラクトグロブリン (BLG) は牛乳中に含まれる乳清蛋白質で、162 アミノ酸残基からなり、A-I の 9 本の  $\beta$  ストランドが 2 枚の  $\beta$  シートを形成した構造を持つ (図 5 参照)。ここで、ストランド A, F, G, H が片方の  $\beta$  シートを、ストランド B, C, D がもう片方の  $\beta$  シートを形成する。前者は折り畳み過程の初期に形成されるのでコア  $\beta$  シートと呼ばれる。それに対し後者の方は折り畳み終盤に形成されるのでサブ  $\beta$  シートと呼ぶことにする。ここで興味深いことに、BLG の天然構造は  $\beta$  構造に富むものであるにもかかわらず、折り畳み過程の途中に、天然構造にはない非天然  $\alpha$  ヘリックスを形成する。<sup>(1)</sup> そこで我々は以前、疑似野生型 (121 番目のシステインをアラニンに置換することで折り畳み効率を上げ、リフォールディング過程を観察しやすくした変異体) と E44L 変異体 (44 番目のグルタミン酸をロイシンに換え、 $\beta$  構造をより安定化させた変異体) の折り畳み挙動を比較した。その結果、E44L の方がかえって折り畳みが遅くなり、中間状態で非天然の  $\alpha$  ヘリックスが折り畳みの効率を上げているということを報告した。<sup>(2,3)</sup> しかしこの折りたたみ中間状態の構造情報はまだ知見が少なく、異なる測定によってこの中間状態のキャラクタリゼーションを進める必要がある。そこで、高圧 NMR を用いることで、これらの中間状態の特徴の比較が可能になるのではないかと考えた。

これまでの研究から、圧力によって (i) 力学的圧縮と (ii) 熱力学的転移の 2 つのタイプの蛋白質構造変化が同時に引き起こされると考えられている。<sup>(4)</sup> (i) 力学的圧縮とは、直観的には分子の弾性的な応答である。蛋白質が天然状態や中間体状態といった同一の熱力学状態を保ったまま、その部分モル体積 ( $V_m$ ) が、 $V_m = V_m^0 + \beta_T \times (P - P^0)$  に従い、圧力 ( $P$ ) に対して線形的に変化する構造変化である。なお、 $\beta_T$  は分子構造によっ

て規定される等温圧縮率を表し、式中の添え字の 0 は常圧における値を表す。一方、(ii) 熱力学的転移とは、蛋白質が、例えば天然状態から変性状態のような異なる熱力学的状態へ転移する際に起こる共同的な構造変化のことである。これは、状態内での構造変化である(i)とは対照的である。変性状態と天然状態の占有数比 ( $[U]/[N]$ ) はその二状態間の自由エネルギー差 ( $\Delta G$ ) によって  $[U]/[N] = \exp(-\Delta G/RT)$  と表され、その自由エネルギー差の圧力依存性は  $d\Delta G/dP = \Delta V_m$  の関係から  $\Delta G = \Delta G_0 + P\Delta V_m$  と表される。ここで  $\Delta V_m$  は部分モル体積差 ( $\Delta V_m = V_{m,final} - V_{m,initial}$ )、 $\Delta G_0$  は常圧における自由エネルギー差である。この式から分かるように(ii)圧力依存的な熱力学的構造転移は、熱変性や変性剤変性と同様、シグモイド型の曲線を描くように進行するので、印可圧力に対して非線形的な構造変化となる。(詳しくは Kitahara et al.<sup>(4)</sup>や 2016 年度の筆者の本誌紀要<sup>(5)</sup>を参照) そして変性データを上の式で解析することで、変性に伴う体積変化量  $\Delta V_m$  の情報を得ることができる。

高圧 NMR を用い、各圧力点で 2 次元 HSQC スペクトルを測定することで、各アミノ酸残基の圧力依存的な構造変化を測定することができる (図 1)。しかしこのデータには、上で述べた(i)力学的圧縮からと(ii)熱力学的転移からの両方の寄与が含まれる。以前筆者は、化学シフト主成分解析 (CS-PCA) という方法を提案した。<sup>(6,7)</sup> この方法は蛋白質が複数の構造変化を示す系において、滴定実験などから得られる一連の NMR 化学シフトデータから、それぞれの構造変化に対応する各残基の化学シフト変化値 ( $\Delta\delta$ ) を分離抽出できるというものである (詳しくは以前の報告を参照<sup>(8)</sup>)。この方法は圧力 NMR データにも有効であることを報告した。<sup>(9)</sup> そして、以前本誌要誌において、この CS-PCA 法を疑似野生型  $\beta$ LG の一連の圧力 NMR データに適用し、(ii)熱力学的転移に関わる残基として抽出された残基が、 $\beta$ LG の折り畳み中間体のコア構造を形成する残基と一致することも報告した。<sup>(5)</sup>今回、折り畳み経路の変化した E44L 変異体についても同様の測定と解析を行い、中間体のコア構造の知見を得ることを目的とした。

## 2. 材料と方法

### 2. 1 $^{15}\text{N}$ 標識された疑似野生型 $\beta$ ラクトグロブリンと E44L 変異体の発現と精製

$^{15}\text{N}$ 標識疑似野生型 $\beta$ LGとE44L変異体の発現は、この蛋白質の遺伝子を含むpPIC11プラスミドによって形質転換したメタノール資化酵母*Pichia pastoris* GS115株(Invitrogen) を用いて行った。蛋白質の発現と精製の方法は以前報告した論文に記載した通りに行った。<sup>(10)</sup>

### 2. 2 高圧 NMR 測定

高圧NMR測定は赤坂らによって作製された高圧用サンプルセル<sup>(11)</sup>を備えたブルカー社製AVANCE III-600分光器を用いて行った。測定蛋白質溶液の条件は13 mg/mL蛋白質、10 mM HCl (pH 2.0)、10%  $\text{D}_2\text{O}$ 、0.1 mM DSSとした。

5~225 MPa で $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQCスペクトルを測定し、得られたデータはnmrPipe<sup>(12)</sup>とSparky (Goddard and Kneller, SPARKY 3, University of California, San Francisco)によってデータ変換し、各圧力点における各残基の化学シフト値の抽出を行った。

### 2. 3 化学シフト主成分解析によるデータ解析

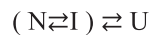
初めにNMR測定データを基に行列  $\mathbf{X}$  を作成した。この行列は一枚のスペクトルに含まれる各残基の化学シフト値 ( $\delta_{\text{H}}$  と  $\delta_{\text{N}}$ : ppm 単位) を含む縦ベクトルを、横方向に測定点の数だけ並べたものである。ただし、スペクトル幅を考慮して  $\delta_{\text{N}}$  の値は 1/5 倍にした。行列のサイズは、疑似野生型は 276 (138 個の追跡可能な残基の数  $\times 2$  (H 軸、N 軸))  $\times 6$  (測定点の数)、E44L 変異体は 244 (122 個の追跡可能な残基の数  $\times 2$  (H 軸、N 軸))  $\times 6$  (測定

点の数)であった。この行列の各列(各残基)からその化学シフト値の平均値を差し引いた。

得られた行列  $\mathbf{X}$  の特異値分解を行い、 $\mathbf{X} = \mathbf{M} \cdot \mathbf{W} \cdot \mathbf{V}^{-1} = \mathbf{X}$  となる 3 つの行列  $\mathbf{M}$ 、 $\mathbf{W}$ 、 $\mathbf{V}$  を得た。 $\mathbf{W}$  は対角行列で、各主成分の寄与率の大きさを示す値を含む。 $\mathbf{M}$ 、 $\mathbf{V}$  はいずれも正規直交行列である。 $\mathbf{M}$ 、 $\mathbf{V}$  の各列は、各主成分の化学シフト値、分率(スコア値)をそれぞれ含む。

### 3. 結果と考察

pH 2.0 の条件下で、5~225 MPa の範囲で  $^{15}\text{N}$  標識疑似野生型と E44L  $\beta\text{LG}$  の高圧 NMR 測定を行った(図 1)。どちらも圧力の上昇に伴い、各残基のシグナルの位置が変化していることが分かる。またどちらもおよそ 150 MPa において各シグナルが消失し、代わりにスペクトル中央にシグナルが集まって表れた。このようなスペクトルの変化は比較的遅いタイムスケール(数百 ms 以上)の構造変化が全残基で起きていることを意味し、150 MPa を境に  $\beta\text{LG}$  が天然状態から変性状態へグローバルな変性していると解釈される。一方 5~125 MPa の範囲においては、多くのシグナルの位置が徐々に変化するのが観察された。このような NMR 信号の変化は、蛋白質分子が比較的早い時間スケール(数百  $\mu\text{s}$  以下)で部位特異的な構造変化をしていることを表す。つまり、昇圧に伴い以下のようなスキームで  $\beta\text{LG}$  の構造変化が進行していると考えられる。



ここで、N、I、U は天然状態、中間状態、グローバルな変性状態を意味する。150 MPa までの低压領域では主に N と I の間の構造変化が起き、150 MPa 以上では U 状態への構造変化も起きていることが示された。なお、5~125 MPa の範囲におけるシグナル位置の変化は曲線的である。これは複数の構造変化が同時に進行していることを表し、それらは(i)力学的圧縮と(ii)熱力学的転移であると考えられる。つまり、低压領域における(i)の変化は N 状態の圧縮に、(ii)の変化は、N 状態から I 状態への構造転移に対応すると考えられる。

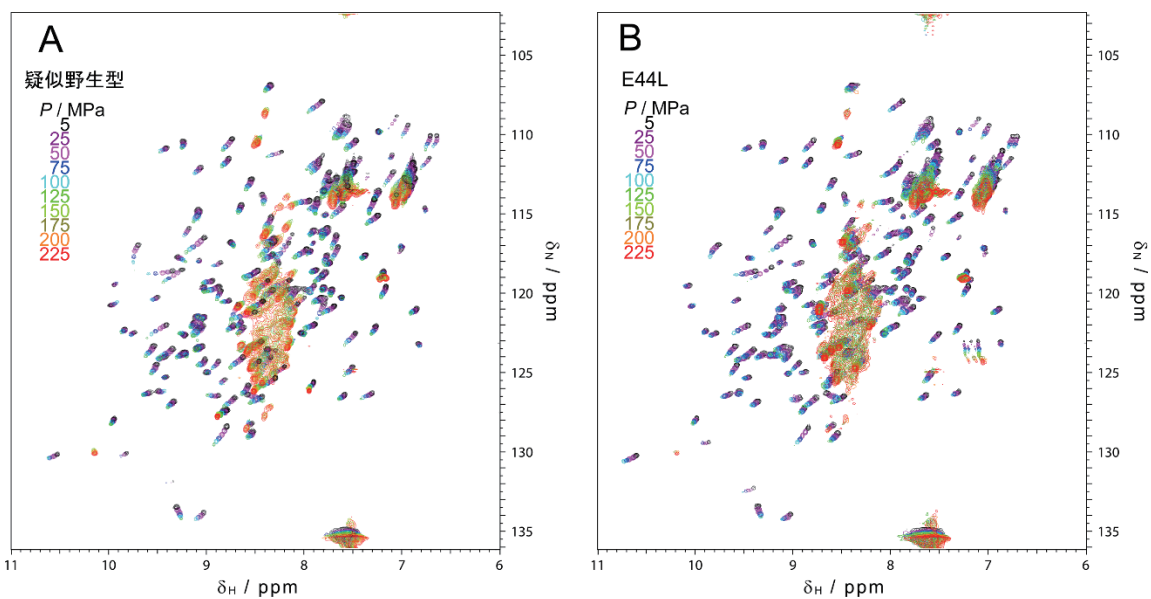


図 1 疑似野生型  $\beta\text{LG}$ (A)と E44L 変異体(B)の高圧 NMR の測定結果。各圧力点での  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC スペクトルを重ねて示した。スペクトルの色は、左上に示した測定圧力点を示している。

この低圧領域における各残基の(i)と(ii)の寄与の大きさを見積もるため、圧力 NMR データを CS-PCA 法で解析した。各残基の化学シフトの圧力依存性をまとめた行列  $\mathbf{X}$  を特異値分解したところ疑似野生型、E44L 変異体ともに 6 つの特異値が得られ、第 1、第 2、第 3 成分までの累積寄与率は、疑似野生型で 82.9%、92.3%、95.1%、E44L 変異体で 81.3%、90.5%、94.8%であった。第 2 成分までの累積寄与率が疑似野生型、E44L 変異体ともに 90%を超えたことと、各成分のスコア値を見たところ、疑似野生型、E44L 変異体ともに、第 1、第 2 成分は滑らかなプロットとなるのに対し、第 3 成分はノイズを反映するような上下動をするプロットとなった (図 2 A,B)。これらの結果から、上位二つの主成分で十分に圧力依存構造変化の情報を含むものと判断した。ここで得られた主成分 1 と 2 のスコア値に固有値を乗じた値をそれぞれ縦軸、横軸にプロットしたのが図 2 C,D である。以後この平面を主成分平面と呼ぶ。主成分平面上の各点が、各圧力点で測定されたスペクトル 1 枚に相当し、圧力が変化するとその位置が左の方に変化することを表す (図 2 C,D、黒矢印)。以前報告した通り、疑似野生型のプロットは点の位置が湾曲して変化している (図 2 C)。折り畳んでいる蛋白質の場合、低圧領域では一般的に力学的圧縮のみが起こるため、このスペクトル変化の方向は力学的圧縮によるものと考えられる。この方向を赤のベクトルで表す。一方熱力学的転移は、ある圧力領域で共同的に進行する。疑似野生型は 50 MPa から徐々に力学的圧縮の方向とは異なる方向へのスペクトル変化が見られる。これが圧力依存的な熱力学的転移に対応すると考えられる。この熱力学的転移の化学シフト変化パターンは力学的圧縮のパターンとは無関係になると仮定すると両者のベクトルが直交関係になるため、赤のベクトルとは直交する方向を熱力学的転移の方向と考えた (図 2 C、緑矢印)。<sup>9)</sup> E44L 変異体も同様の考え方で力学的圧縮、熱力学的転移の方向を決定した。まとめると、疑似野生型も E44L 変異体も、低圧領域では(i)の方向にのみスペクトルが変化するが、圧力が高くなるにつれて次第に(ii)の構造変化も起こるため、このように湾曲したプロットになると解釈された。

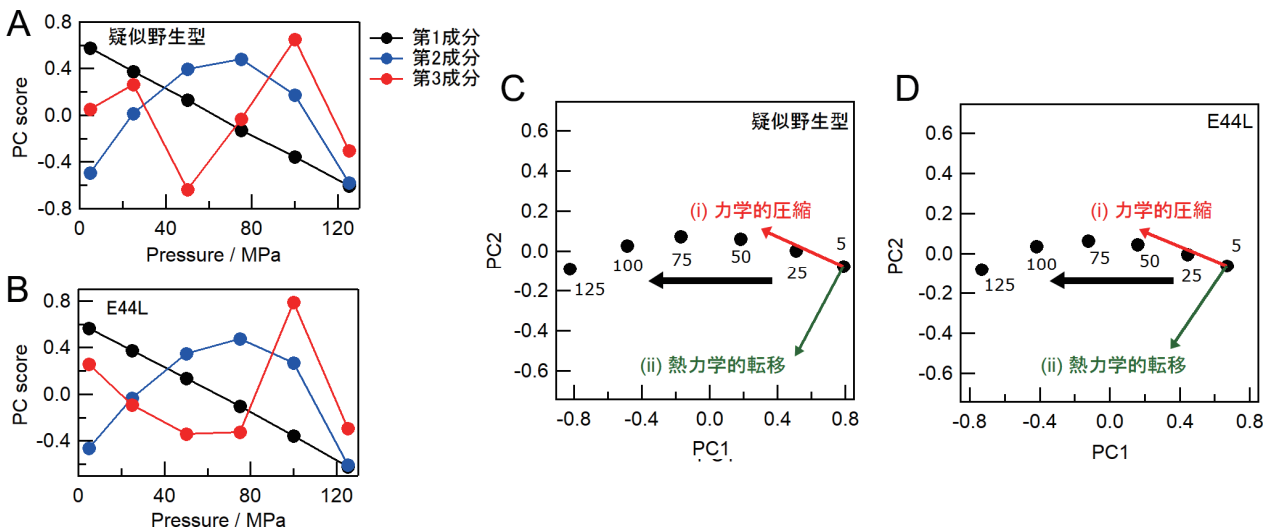


図2 CS-PCA 法から得られた(A)疑似野生型と(B)E44L 変異体の主成分スコア値の圧力依存性。それぞれ第 1、第 2、第 3 成分のスコア値が黒、青、赤で示されている。(C)疑似野生型と(D)E44L 変異体の第 1、第 2 主成分のプロット。図中の数字はその点のスペクトルが得られた圧力 (単位 MPa) を示す。

主成分平面上の方向を特定すると、その方向に変化した時の各残基の化学シフト変化( $\Delta\delta$ )を再計算することができる。疑似野生型、E44Lにおいて図2 C,Dの主成分平面上の赤、緑の矢印の方向に対応する各残基の $\Delta\delta_H$  (赤棒)と $\Delta\delta_N$  (青棒)を図3の各パネルにそれぞれ示した。また、式1に従いHSQCスペクトル上のみかけの変化の大きさ( $\Delta\delta_{app}$ )を計算し、同図に灰色の棒で示した。

$$\Delta\delta_{app} = \sqrt{\Delta\delta_H^2 + (\Delta\delta_N/5)^2} \quad (\text{式1})$$

図3 A,Bで $\Delta\delta$ の大きい残基が(i)力学的圧縮に伴い構造変化を示す残基、図3 C,Dで $\Delta\delta$ の大きい残基が(ii)N状態からI状態への圧力依存的な状態転移にともない大きな構造変化を示す残基であると解釈される。図4は、疑似野生型とE44L変異体について得られた(i)力学的圧縮(A)と(ii)熱力学的転移(B)に対する $\Delta\delta_{app}$ の相関を示している。図4Aが強い相関を示すことから、(i)力学的圧縮による $\Delta\delta$ プロファイルの形状が疑似野生型とE44Lでよく似ていることが分かる。E44Lの天然構造は疑似野生型とほぼ変わらないことが示されており<sup>(2)</sup>、天然構造が類似していると(i)力学的圧縮の影響も同じようになることが示された。

一方図4 Bから、(ii)の熱力学的転移は疑似野生型とE44Lの間で相関が小さいことが分かる。詳しく $\Delta\delta$ パターンを見てみると、以前報告した通り、疑似野生型の方は大きな $\Delta\delta_{app}$ を示す残基が比較的まとまっており、特にストランドA、F、G、Hに多く見られることが分かる(図4 C)。これまでの $\beta$ LGの折り畳み研究の結果から、疑似野生型は折り畳み初期中間状態でストランドF、G、Hが天然構造のコアを形成していることが分かっている。<sup>(7)</sup> 圧力NMRから得られる(ii)熱力学的転移で大きな $\Delta\delta$ を示す残基を $\beta$ LGの立体構造上にマッピングすると、大きな $\Delta\delta_{app}$ を示す残基がコア $\beta$ シートに集まっており、もう片方のサブ $\beta$ シートにはほとんど存在しないことが分かる(図5 A)。折り畳み中間体のコア領域と圧力変性で大きな構造変化を示す残基がよく一致することから、 $\beta$ LGの場合、圧力によって折り畳み中間体のコア領域の構造変化が引き起こされることが示された。<sup>(5)</sup> 一方、E44Lの方は疑似野生型で大きな $\Delta\delta_{app}$ を示した領域に加え、ストランドDの残基が大きな $\Delta\delta_{app}$ を示した(図4 C,D、四角で示した部位を参照)。そして、興味深いことに、立体構造上のマッピング結果から、A、H、G、Fストランド上で大きな $\Delta\delta_{app}$ を示した残基は、サブ $\beta$ シートのストランドD側に集まっていることが分かった(図5 B、四角で示した部位を参照)。このことは、E44Lではコア $\beta$ シートとサブ $\beta$ シートが強い相互作用をしており、共同的に圧力変性することを示唆する。やはり以前の折り畳み研究から、E44L変異体は折り畳み中間状態においてコア $\beta$ シートの一部(ストランドF,G,H)とサブ $\beta$ シートの一部(ストランドB,C,D)が形成しており、これらの中で生じる強い疎水性相互作用によって折り畳みの遅延が引き起こされていることが示されている。圧力変性過程でもこの相互作用が残存しており、共同的な変性がこれらのストランド間で観測されたと考えられる。

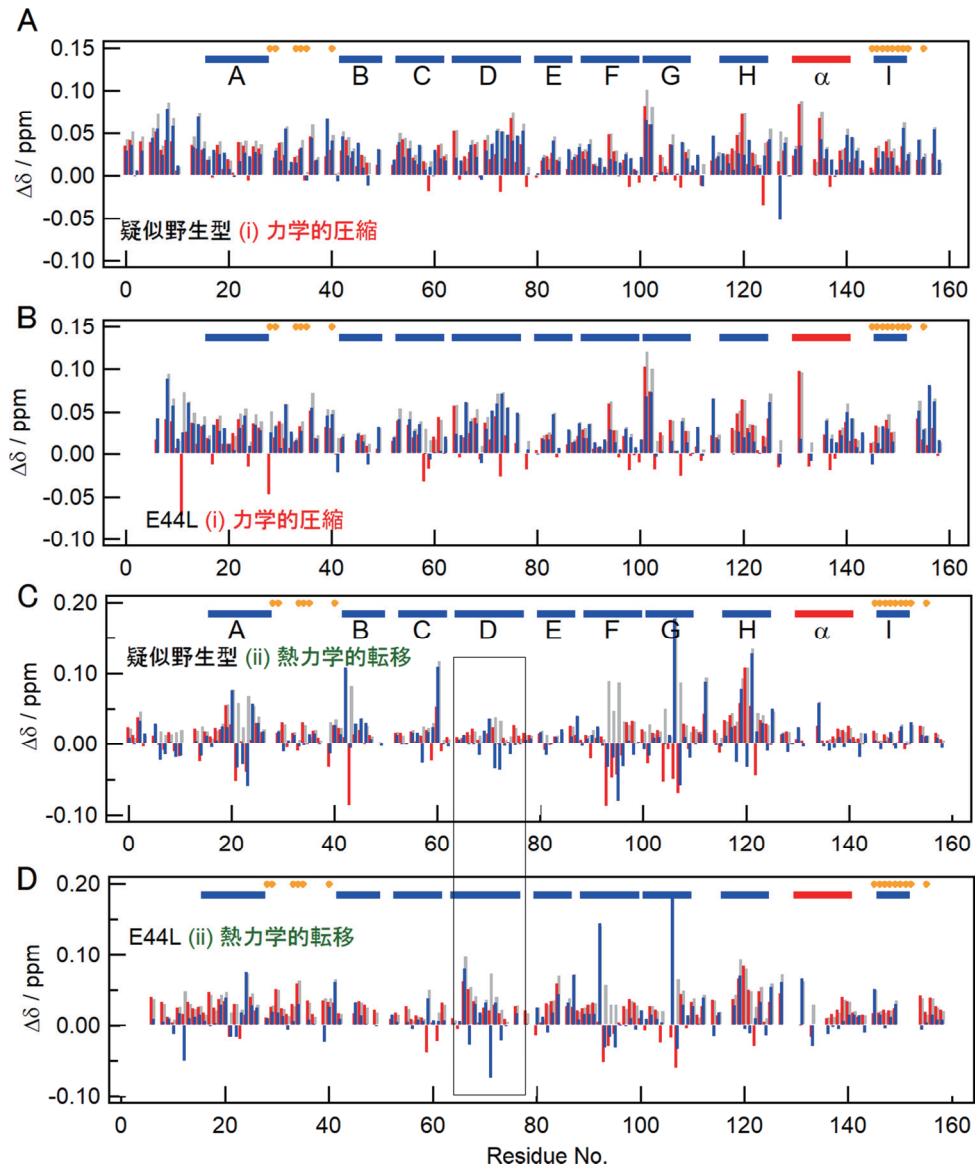


図3 CS-PCA 法によって得られた、疑似野生型(A,C)とE44L 変異体(B,D)の圧力変性における(i)力学的圧縮と(ii)熱力学的転移の化学シフト値( $\Delta\delta$ )プロファイル。A、B はそれぞれ疑似野生型、E44L 変異体の(i)力学的圧縮の $\Delta\delta$ 、C、D はそれぞれ疑似野生型、E44L 変異体の(ii)熱力学的転移に伴う $\Delta\delta$ のプロファイルである。主成分平面上の(i)力学的圧縮(図2C、D、赤矢印)、(ii)熱力学的転移(図2C、D、緑矢印)の方向に対応する各残基の $\Delta\delta$ の大きさを示す。各残基の $^1\text{H}$ 軸方向、 $^{15}\text{N}$ 軸方向の $\Delta\delta$ の大きさをそれぞれ、赤、青の線で示しており、その二つの値から式1によって計算されるみかけの $\Delta\delta$  ( $\Delta\delta_{\text{app}}$ )の値が灰色の棒グラフで表されている。分布範囲を考慮して、いずれのパネルでも $^{15}\text{N}$ 軸方向の値は1/5の値でプロットしている。図上部の横青線、赤線はそれぞれ $\beta$ 構造、 $\alpha$ 構造の位置を示す。パネルC、Dの四角に関しては本文参照。

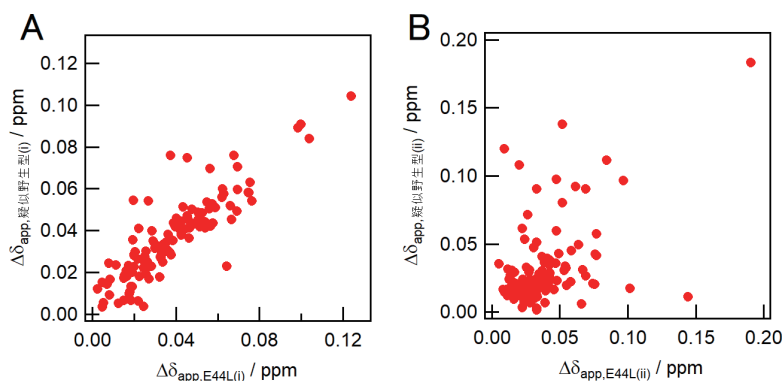


図4 CS-PCA 法によって得られた、疑似野生型  $\beta$ LG と E44L 変異体との間の(A) (i)力学的圧縮、(B) (ii)熱力学的転移に伴う $\Delta\delta_{\text{app}}$ の相関を示した図。

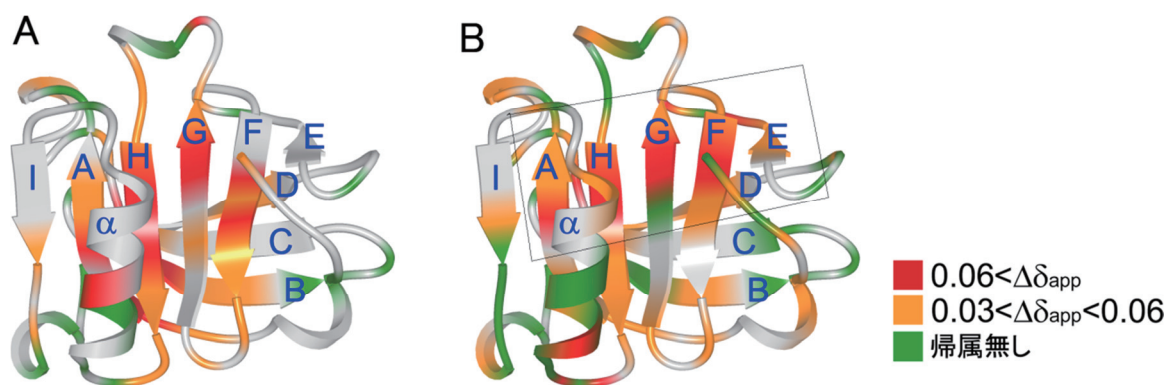


図5 CS-PCA 法によって得られた、圧力変性における(ii)熱力学的転移に伴う $\Delta\delta_{\text{app}}$ を立体構造にマッピングした図。(A) は疑似野生型  $\beta$ LG の、(B) は E44L 変異体の結果である。図中のカラースケールに従い着色した。各パネルには各  $\beta$  ストランドの名称を青字で示している。パネル B 中の四角に関しては本文参照。

変異点である 44 番目は、今回大きな $\Delta\delta$ が観測されたストランド D 上ではなく、ストランド B に位置する。これは、本来のアミノ酸残基であるグルタミン酸と比較するとロイシンは  $\beta$  構造を好むアミノ酸残基であるため、E44L 変異によってストランド B が安定化し、ストランド B, C, D からなるサブ  $\beta$  シート全体が安定化したと考えられる。その結果、上で述べたようなサブ  $\beta$  シートのストランド D 側でのコア  $\beta$  シートとの相互作用が促進されたものと考えられる。

上述の通り、以前我々はこの相互作用は主に疎水性相互作用によることを示した。<sup>(3)</sup> ここで、疎水性相互作用の圧力依存性はモデル系の測定やシミュレーションから調べられている。例えば水中のメタン分子の会合状態と解離状態の自由エネルギー差の圧力依存性のシミュレーションから、圧力増加に伴いメタン分子の会合状態が不安定になることが示された。<sup>(13)</sup> この場合のエントロピーの寄与は、解離状態では圧力に依存性はなく、会合状態で加圧に伴いエントロピーが増大していることが分かり、加圧下では水の構造化が顕著ではなくなりそれによるエントロピー増加が起きたため、疎水性相互作用の寄与が弱くなったと考えられる。<sup>(14)</sup> つまり、加圧による疎水性相互作用の減弱が蛋白質分子の圧力変性に寄与していると考えられる。しかしながら、結晶構造から見積もられる変性時の疎水性残基の露出表面積のみでは蛋白質の圧力変性の実

験値を十分には説明せず、他に親水性残基の露出表面積の寄与や天然構造中に存在する溶媒排除体積の寄与などを検討することで、結晶構造と圧力変性挙動の説明をすることが依然試みられている。<sup>(15,16)</sup> いずれにせよ、変性反応は天然構造だけでなく変性状態の構造も考慮する必要があるが、その検討は未だ十分ではなく今後の課題だと考えられる。今回我々は  $^1\text{H}$  と  $^{15}\text{N}$  の信号のみを解析対象としたが、 $^{13}\text{C}$  の化学シフト値は蛋白質のコンフォメーションの情報を比較的直接含んでいるため<sup>(17)</sup>、 $^{13}\text{C}$  信号を含めた解析を行うことで、より正確な変性反応の様子を理解することができると期待される。

## 5. 結論

高圧 NMR による圧力依存化学シフトデータの解析によって得られる(ii)熱力学的転移の寄与から、折り畳み中間体のコア構造に関する知見を得ることができる。今回我々は、野生型と異なる折り畳み経路を示す  $\beta$  ラクトグロブリン (BLG) の変異体に対して高圧 NMR 測定データの解析を行い疑似野生型の結果と比較することで、折り畳み中間状態に類似した圧力変性中間状態のコア構造の違いについての知見を得ることを目指した。疑似野生型の方は、コア構造に関わる残基はコア  $\beta$  シートにのみ見られたことから、天然構造に存在する 2 枚の  $\beta$  シートの間で強い相互作用はないことが示された。一方 E44L 変異体の方はコア構造に関わる残基はコア  $\beta$  シートとサブ  $\beta$  シートの両方に見られ、シート間に疎水性相互作用が働いていることが示唆された。以前の折り畳み研究の結果から、野生型は 2 枚の  $\beta$  シートが別々に形成されるため折り畳みがスムーズに起こるのに対し、E44L 変異体は 2 枚の  $\beta$  シートが同時に形成されるため側鎖の配置が効率よく行われず、折り畳みに時間がかかることが提案されていたが、それを裏付ける結果となった。特に E44L の変異点はストランド B 上であるのに対し、2 枚の  $\beta$  シートの相互作用はストランド D 付近で特に見られたことから、E44L 変異がサブ  $\beta$  シート全体を安定化し、コアシートとサブシート間の相互作用を引き起こすことが確認された。このように、高圧 NMR 解析は、構造安定性や折り畳みに関する知見を与える有用な解析法であることが示された。

## 6. 参考文献

- (1) K. Kuwata, M. Hoshino, S. Era, C. A. Batt, Y. Goto, (1998)  $\alpha \rightarrow \beta$  Transition of  $\beta$ -lactoglobulin as evidenced by heteronuclear NMR, *J. Mol. Biol.*, Vol. 283, pp. 731-739.
- (2) K. Sakurai, S. Fujioka, T. Konuma, M. Yagi, Y. Goto, (2011) A circumventing role for the non-native intermediate in the folding of beta-lactoglobulin, *Biochemistry*, Vol. 50, pp. 6498-6507.
- (3) K. Sakurai, M. Yagi, T. Konuma, S. Takahashi, C. Nishimura, Y. Goto, (2017) Non-Native alpha-Helices in the Initial Folding Intermediate Facilitate the Ordered Assembly of the beta-Barrel in beta-Lactoglobulin, *Biochemistry*, Vol. 56, pp. 4799-4807.
- (4) R. Kitahara, K. Hata, H. Li, M. P. Williamson, K. Akasaka, (2013) Pressure-induced chemical shifts as probes for conformational fluctuations in proteins, *Prog. Nucl. Magnet. Reson. Spectrosc.*, Vol. 71, pp. 35-58.
- (5) 櫻井一正, (2016) 化学シフトデータの主成分解析による、蛋白質状態変化の洞察, *Mem IAT*, Vol. 4, pp. 10-19.
- (6) T. Konuma, Y. H. Lee, Y. Goto, K. Sakurai, (2013) Principal component analysis of chemical shift perturbation data of a multiple-ligand-binding system for elucidation of respective binding mechanism, *Proteins*, Vol. 81, pp. 107-118.
- (7) K. Sakurai, Y. Goto, (2007) Principal component analysis of the pH-dependent conformational transitions of bovine  $\beta$ -lactoglobulin monitored by heteronuclear NMR, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, Vol. 104, pp.



15346-15351.

- (8) 櫻井一正, (2013) 化学シフトデータの主成分解析による、蛋白質状態変化の洞察, 日本核磁気共鳴学会学会誌, Vol. 4, pp. 10-19.
- (9) K. Sakurai, A. Maeno, L.-H. Lee, K. Akasaka, (2019) Conformational Properties Relevant to the Amyloidogenicity of  $\beta$ 2-Microglobulin Analyzed Using Pressure- and Salt-Dependent Chemical Shift Data, *J Phys Chem B*, Vol. in press.
- (10) M. Yagi, A. Kameda, K. Sakurai, C. Nishimura, Y. Goto, (2008) Disulfide-linked bovine beta-lactoglobulin dimers fold slowly, navigating a glassy folding landscape, *Biochemistry*, Vol. 47, pp. 5996-6006.
- (11) K. Akasaka. (2018). Protein Studies by High-Pressure NMR. In *Experimental Approaches of NMR Spectroscopy* (A. Naito, ed.), pp. 3-36. Springer, New York.
- (12) F. Delaglio, S. Grzesiek, G. W. Vuister, G. Zhu, J. Pfeifer, A. Bax, (1995) NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes, *Journal of Biomolecular NMR*, Vol. 6, pp. 277-293.
- (13) G. Hummer, S. Garde, A. E. Garcia, M. E. Paulaitis, L. R. Pratt, (1998) The pressure dependence of hydrophobic interactions is consistent with the observed pressure denaturation of proteins, *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 95, pp. 1552-1555.
- (14) S. W. Rick, (2000) Free energy, entropy and heat capacity of the hydrophobic interaction as a function of pressure, *J Phys Chem B*, Vol. 104, pp. 6884-6888.
- (15) T. V. Chalikian, R. B. Macgregor, Jr., (2009) Origins of pressure-induced protein transitions, *J Mol Biol*, Vol. 394, pp. 834-842.
- (16) C. A. Royer, (2002) Revisiting volume changes in pressure-induced protein unfolding, *Biochim Biophys Acta*, Vol. 1595, pp. 201-209.
- (17) D. J. Wilton, R. Kitahara, K. Akasaka, M. P. Williamson, (2009) Pressure-dependent  $^{13}\text{C}$  chemical shifts in proteins: origins and applications, *J Biomol NMR*, Vol. 44, pp. 25-33.

英文抄録

## Identification of inter-residue interactions appeared in the early stage of folding process of $\beta$ -lactoglobulin and its folding mutant, E44L, by using high-pressure NMR

Kazumasa SAKURAI

According to the previous studies, the following two types of conformational changes of protein occur upon increase in pressure: That is, (i) mechanical compression and (ii) transition between thermodynamically distinct states. Pressure-dependent chemical shift changes of individual residues can be measured by using high-pressure NMR apparatus. A principal component analysis can decompose the obtained data into the two types of conformational changes. The author previously applied this method to  $\beta$ -lactoglobulin ( $\beta$ LG) and found that the residues which are associated with the conformational change of (ii) agreed well with those which were included in the formation of core regions in the early step of the folding process. Thus, the high-pressure NMR method is suggested to be a potential method to identify the core region of the folding intermediate of protein molecule. In order to assess this suggestion, the author examined the same method to the E44L  $\beta$ LG mutant, which folds in a different route from that of the wild type. As a result of the analysis, the residues responsible for the conformational change of (ii) were found to be distributed on the both  $\beta$ -sheets in the native structure of  $\beta$ LG, indicating that these two  $\beta$ -sheets are interacting with each other in the early step in its folding process. The previous study indicated that the folding process of the mutant is perturbed due to the interaction between the two  $\beta$ -sheets. Thus, the present conclusion is consistent with that of the previous study, confirming the versatility of the method.

**Key words:** high-pressure NMR, protein folding,  $\beta$ -lactoglobulin, chemical shift, principle component analysis.