

タンパク質-脂肪酸会合反応の圧力による改変

伊藤 大樹¹、櫻井 一正^{1,2}

要旨

牛乳中には α ラクトアルブミンや β ラクトグロブリンのように脂肪酸を結合するタンパク質が多いことが知られており、栄養成分の生体内への輸送を担っていると考えられる。加えてこれらのタンパク質と脂肪酸が結合し、HAMLET という抗腫瘍活性を示す複合体を形成することも報告されている。これらの脂肪酸とタンパク質の相互作用は特異的ではなく、タンパク質分子は三次構造が緩んだ中間状態をとると考えられている。ここでタンパク質の脂肪酸結合の量や結合機構を制御することで、輸送機能や牛乳の栄養価の増強、抗腫瘍能の強化が期待される。これまで我々は、タンパク質の機能や構造、安定性や運動性に対する圧力の効果を調べてきた。圧力はタンパク質の運動性を変化させたり、酵素活性を上昇させたりすることが示されている。そこで、この脂肪酸結合の圧力効果の理解のために我々はウシ β ラクトグロブリン(β LG)の脂肪酸結合の圧力効果についての知見を得ることを目指した。高圧 NMR とそのデータ解析の結果、高圧条件下では、常圧と同じバレル内空洞への結合に加え、加圧によって引き起こされた β LGの部分変性に伴い、新たに結合部位が生じることが示唆された。これらの結果は、高圧処理によるタンパク質機能の改変にひとつの応用可能性を示唆したと考えられる。

キーワード：圧力、NMR、タンパク質、リガンド結合、タンパク質-脂肪酸複合体、 β ラクトグロブリン

1. 緒論

生体内では様々な分子が含まれる。それらの間での相互作用が、シグナル伝達や生体分子の輸送、物質の代謝を担い、複雑な生命現象を支えている。近年はプロテオーム解析により、細胞内の様々な相互作用の網羅的な理解が目指されている。ただし、これらの方法では、分子間の生化学的關係は説明するものの、相互作用の物理的・構造的な説明は与えない。

生体内の重要な分子間相互作用に分子輸送がある。例えば水溶性の低い分子は輸送タンパク質に結合し必要な場所まで運ばれる。チロキシン結合グロブリン⁽¹⁾、レチノール結合タンパク質⁽²⁾などがこのような働きを担う。牛乳中にも脂肪酸結合タンパク質⁽³⁾や β ラクトグロブリン⁽⁴⁾のように脂肪酸を結合するタンパク質が多く含まれることが知られている。これらの分子間結合は必須栄養成分の生体内への輸送を担うものであり、これらの複合体形成の制御は、食品の機能性上昇にもつながる。

また、これら牛乳中のタンパク質と脂肪酸の複合体には HAMLET という興味深い現象が知られている。HAMLET とは α -ラクトアルブミン (α LA) とオレイン酸 (OA) によって形成された複合体であり、腫瘍細胞のアポトーシス誘導活性を示すことから名づけられた (HAMLET: human α -lactalbumin made lethal to tumor cells)。⁽⁵⁾中村らは α LAだけでなく、イヌ乳リゾチーム、アポミオグロビン、および β 2-ミクログロブリンといったほかの様々なタンパク質もオレイン酸と HAMLET 様の複合体を形成し抗腫瘍能を示すことを報告した。興味深いのはこれらの複合体中では、OA とタンパク質の相互作用は特異的ではなく、さらにタンパク質分子はモルテングロビュールという、二次構造は保持するものの三次構造が緩んだ状態

原稿受付 2020年12月25日

1. 近畿大学先大学院生物理工学研究科 生物工学専攻, 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930

2. 近畿大学先端技術総合研究所 高圧力蛋白質研究センター, 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930

をとっていることである。これらの結果から、中村らは腫瘍細胞に対する細胞毒性には OA そのものが重要であり、複合体のタンパク質成分には特異性はなく、いずれも細胞膜を透過させる役割を担っているものと主張した。⁽⁶⁾

ここでタンパク質の脂肪酸結合の量や結合機構を制御することで、輸送機能や HAMLET 様抗腫瘍能の強化につながると期待される。これまで我々は、タンパク質の機能や構造、安定性や運動性に対する圧力の効果を調べてきた。圧力はタンパク質の運動性を変化させたり、酵素活性を上昇させたりすることが示されている。^(7,8)そこで、この脂肪酸結合の圧力効果の理解のために我々はウシ β ラクトグロブリン(β LG)の脂肪酸結合の圧力依存性に着目した。

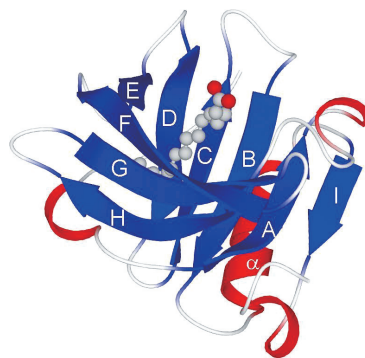


図1 PAと複合体状態の β LGの結晶構造(PDB ID:1B00⁽⁹⁾)のリボンモデル。 α ヘリックスと β ストランドはそれぞれ赤、青のリボンで示してある。 β ストランドはN末端側からA-Iと命名されている。図中ボールアンドスティックモデルで表示されているのはパルミチン酸である。 β LGのバレル構造の中に結合していることが分かる。

β LGは牛乳中に含まれる乳清タンパク質で、162アミノ酸残基からなり、A-Iの9本の β ストランドが2枚の β シートを形成した構造を持つ(図1)。2つのジスルフィド結合(Cys66-Cys160およびCys106-Cys119)と遊離チオール(Cys121)を含む。⁽¹⁰⁾ β LGの3次構造は、2枚の β シートがバレル構造(樽状構造)をとっており、その内部には、疎水性残基で覆われた大きな空洞が存在する。パルミチン酸(PA)などのさまざまなリガンドとの複合体状態の β LGのX線結晶構造が報告されている。多くの脂肪酸リガンドで、このバレル内空洞に存在していることから、リガンドの主要な結合部位だと示されている。^(9,11)我々もNMRを用い、PA結合に関わる残基がこのバレル内空洞に集中している結果を示し、PAはこの部位に特異的に結合することを示した。⁽¹²⁾ β LGはさまざまな他の疎水性分子もリガンドとして結合することが知られており、その生物学的機能はレチノールまたは脂肪酸の輸送であると考えられており、これらの情報の蓄積から、 β LGは疎水性リガンド結合研究のモデルタンパク質として扱われている⁽⁴⁾

我々の以前の報告で、 β LGのPA結合を2次元NMRで測定した結果、多くの残基がPA結合に伴い、非結合型の信号位置から結合型の信号位置へを変化することを示した。⁽¹²⁾また β LGのOAやリノレン酸との複合体がHAMLET様の腫瘍細胞死を引き起こすことも報告された。⁽¹³⁾そこで我々は、 β LGのPAの結合速度の圧力依存性を調べることで、結合の機構に関する知見を得ることを目的とし、圧力による脂肪酸結合制御の可能性について検証することを目指した。

2. 材料と方法

2. 1 ^{15}N 標識疑似野生型 β ラクトグロブリンの発現と精製

本実験では βLG 試料として A34C/C121A 変異 βLG を疑似野生型として用いた。この変異体は βLG の構造が野生型とほとんど同じだが、折り畳み能が改善されており、分子間ジスルフィド結合によって常にダイマーを形成するため安定であり、かつ中性条件でも NMR 測定が可能であるためである。 $^{14,15}\text{N}$ 標識疑似野生型 βLG の発現は、このタンパク質の遺伝子を含む pPIC11 プラスミドによって形質転換したメタノール発酵酵母 *Pichia pastoris* GS115 株 (Invitrogen) を用いて行った。タンパク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。 15 精製後は凍結乾燥した粉末標品として試料を得た。

2. 2 NMR 測定

βLG の NMR 測定の溶媒条件は、常圧測定サンプルは 12 mg/mL A34C/C121A βLG , 1 mM パルミチン酸 (PA)、10% D_2O (pH 6.5)、高圧測定サンプルは 10 mg/mL A34C/C121A βLG , 1 mM PA, 10% D_2O (pH 6.5) とした。どちらのサンプルも緩衝液は使用しておらず、pH 調整は NaOH を添加することで行った。常圧測定では NMR ガラスサンプル管にエタノールで溶解した 1 mM PA を 500 μL 添加し、50°C の恒温槽に浸しながら窒素ガスを吹き付けることで乾燥させたのち、上記の NMR 測定サンプルを 500 μL 添加することで測定サンプルを用意した。また、高圧測定では高圧用サンプルセル⁽¹⁶⁾ にアセトンで溶解した 1 mM PA を 500 μL 添加し、減圧乾燥させ 37°C のインキュベータに移して乾燥させたのち、上記の NMR 測定サンプルを 600 μL 添加することで測定サンプルを用意した。

NMR 測定はブルカー社製 AVANCEIII-600 分光器 (Bruker BioSpin, Rheinstetten, ドイツ) を用いて行った。通常の NMR ガラスサンプル管を用いた常圧測定では 1 次元 ^1H スペクトル測定と 2 次元 ^1H - ^{15}N HSQC 測定を行った。高圧用サンプルセルを用いた測定では常圧、100 MPa、200 MPa の各圧力点で 1 次元 ^1H スペクトルの連続測定を行った。なお、セル内の気泡の発生を抑えるために 5 MPa を常圧時の測定とした。1 次元 NMR スペクトルデータは TOPSPIN を用いて、2 次元 HSQC スペクトルの信号強度は Sparky (Goddard, T.D., and Kneller, D.G., SPARKY 3, University of California, San Francisco) を用いて解析した。

3. 結果

本研究では、 βLG 分子に対する PA 結合の経時変化測定が必須だが、NMR によるその経時変化測定には、1 点当たりの測定が短時間で済む 1 次元測定の方が都合がよい。我々は以前、2 次元スペクトルで結合型と非結合型の違いが明確に検出できることを報告したが⁽¹²⁾、1 次元スペクトルで PA 結合の経時変化をモニタ出来るかは不明である。そこで初めに、1 次元測定と 2 次元測定を同時に行い、その結果の比較から 1 次元測定によって PA 結合が正しく検出できるかを検証した。

測定は、PA を乾燥固化させた NMR サンプル管に βLG 溶液を注入することで開始させた。なお PA の終濃度は、固化した PA がすべて溶解した場合 1 mM になるよう調整した。 βLG 溶液注入後、1 次元 NMR スペクトルと 2 次元 HSQC スペクトルを交互の測定を繰り返し行った。1 次元測定と 2 次元測定 1 セットの測定時間は約 30 分であった。測定結果を図 2 に示す。図 2a は PA 結合型と非結合型の βLG の 2 次元スペクトルを重ね合わせたものの一部の拡大図である、多くの残基で結合型と非結合型で異なる位置に NMR 信号を示す。図 2b-f は結合反応開始後からの 2 次元スペクトルの同じ領域の変化を示したものであるが、非結合型の信号が次第に減少し、それに伴い結合型の信号強度が上昇している様子が分かる。

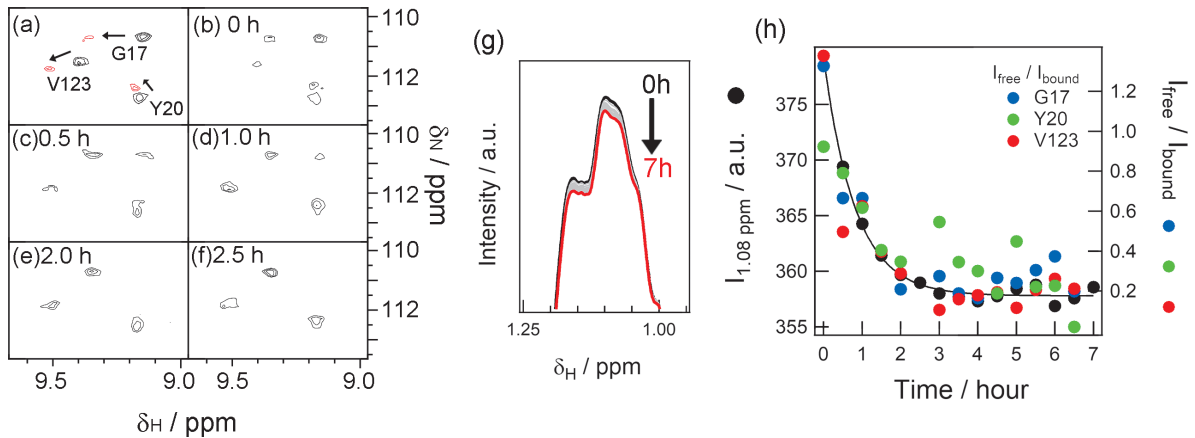


図 2. pH 6、40°Cにおけるパルミチン酸結合の経時変化測定。(a-f) β LGの2次元 HSQC スペクトルの拡大図。(a)PA 非存在下(黒)と PA 結合後(赤)のスペクトルの重ね合わせ。範囲内に見られる G17, Y20, V123 由来の信号が PA 結合に伴い異なる位置に移動していることがわかる。(b-f) β LG と PA 混合後のスペクトルの変化を示す。3 残基とも非結合型の信号強度が減少し、それに伴い結合型の信号が増加していることがわかる。(g) (b-f)の二次元スペクトルと同じ時点で測定した 1 次元スペクトルの重ね合わせ。(h) (b-f)で見られた各残基(青: G17、緑: Y20、赤: V123)の結合型と非結合型のシグナル強度比(右軸)と(g)で見られた 1.08 ppm における信号強度の変化(左軸)の重ね合わせ。いずれも同様の減衰曲線を描いていることから、1 次元信号強度変化も PA 結合の経時変化を捉えていると考えられる。

同時に測定した 1 次元スペクトルを重ね合わせたのが図 2g である。時間経過に伴い、スペクトルの形状が変化していることがわかる。ここで 1.08 ppm の信号強度の時間変化をプロットしたものが図 2h の黒色のプロットであり、減衰曲線を描いていることがわかる。一方、図 2b-f で示した 3 残基(G17、Y20、V123)の結合型と非結合型の信号強度の比をプロットしたものが図 2h の青、緑、赤のプロットである。これらのプロットも、黒色のプロットと同じようなタイミングで減衰していることがわかる。このことから、1 次元スペクトルの時間変化は、PA 結合に伴う非結合型から結合型への構造変化を反映することが示された。よって今後は、PA 結合の経時変化を、1 次元測定でモニタすることとした。

次に加圧下で β LG の脂肪酸結合の速度への影響を調べるために、上と同様の脂肪酸結合実験を高圧 NMR を用いて行った。図 3a-c に、常圧、100 MPa、200 MPa における PA と β LG 溶液の混合後の 1 次元 NMR スペクトルの変化を示した。先ほどと同様、PA 結合を反映すると思われるスペクトル変化が観測された。なお、図 3d は各圧力点の最初に得られた 1 次元スペクトルのアミド水素領域を拡大して重ね合わせたものである。200 MPa では 8~9 ppm にシグナルが集中しているが、これは変性時のスペクトルの特徴的な形状である。後ほど議論するが、この条件で β LG は天然状態と変性状態をほぼ 1:1 の割合でとると考えられており、その解釈と矛盾の無いスペクトルとなっている。⁽¹⁷⁾ 図 3a-c の 3 つの化学シフトにおける信号強度の経時変化をプロットしたのが図 3e-g である。その経時変化データを指数関数でフィッティングし、各圧力における peak A, B, C の速度定数をまとめたのが表 1 である。

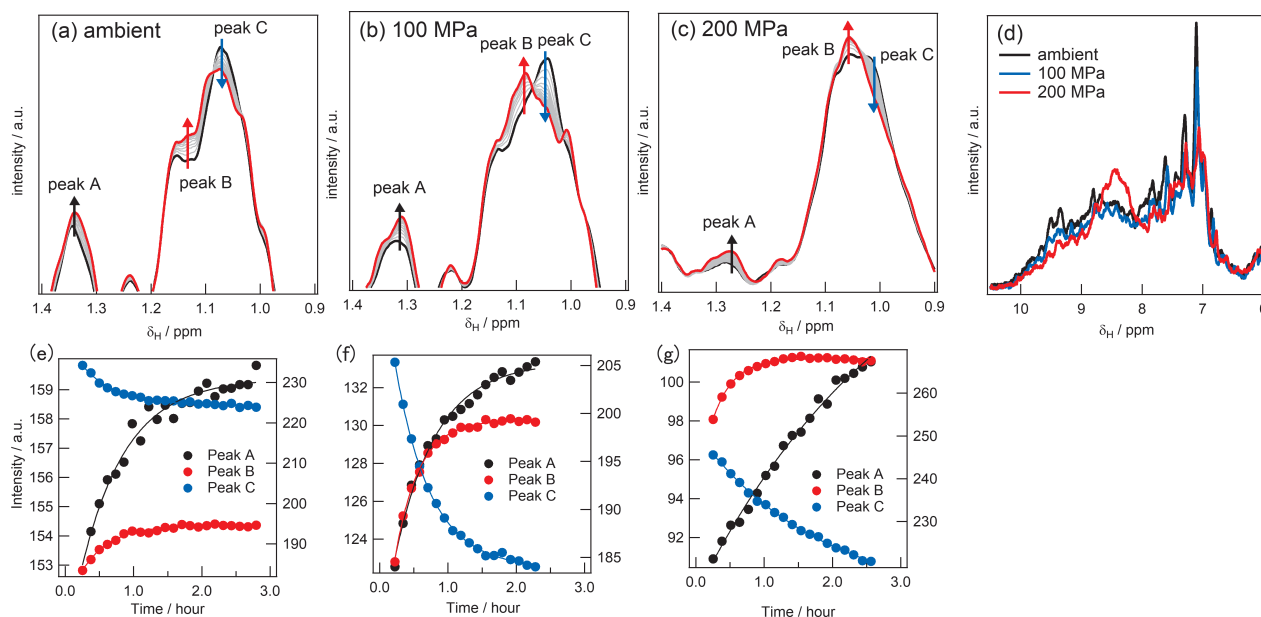


図 3 各圧力点における β ラクトグロブリンのパルミチン酸結合経時変化の 1 次元 NMR スペクトルによる観察。(a-c) 常圧 (a)、100 MPa (b)、200 MPa (c)における 1 次元 NMR スペクトルの変化。図中では各圧力で peak A、B、C の位置 (化学シフト) における強度の経時変化が示されている。(d) 常圧、100 MPa、200 MPa における 1 次元スペクトルのアミド水素領域の重ね合わせ。(e-g) 常圧 (e)、100 MPa (f)、200 MPa (g)における各 peak の強度の時間変化のプロット。図中の曲線は各 peak のデータを指数関数でフィッティングした理論曲線を示す。そのフィッティングで得られた各 peak の速度定数は表 1 に示されている。

表 1. 各圧力における異なる化学シフトにおける PA 結合の速度定数のまとめ

	k at 5 MPa / 10^{-4} s^{-1}	k at 100 MPa / 10^{-4} s^{-1}	k at 200 MPa / 10^{-4} s^{-1}
Peak A	4.11 ± 0.41	4.48 ± 0.32	0.899 ± 0.183
Peak B	6.58 ± 0.37	7.89 ± 0.23	9.13 ± 0.46
Peak C	5.55 ± 0.35	5.29 ± 0.12	1.50 ± 0.10
推定される結合部位	第 1 のみ	第 1 (peak B) と 第 2 (peak A、C)	第 1 (peak B) と 第 2 (peak A、C)

常圧においては、3つのピーク A~C の速度定数がそれぞれ $4.11 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 、 $6.58 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 、 $5.55 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ となり、近い値を示している。これは、スペクトル全体が非結合状態のスペクトルから結合状態のスペクトルへ変化していることを示しており、結合が 2 状態変化で進行することを示唆している。一方で 200 MPa では各ピーク A~C の速度定数がそれぞれ $8.99 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 、 $9.13 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 、 $1.50 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ となった。注目して欲しいのは、ピーク A と C の速度定数がほぼ同じであるのに対し、ピーク B は一桁近く大きな値を示していることである。つまり、 $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 程度の結合反応と $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 程度の結合反応の二つが同時に進行していることを示している。なお、100 MPa ではピーク A と C の速度定数は常圧時のそれと大きな変化はなかったが、ピーク B の速度定数は常圧のそれより多少の増加を示した。

以上の観察結果は以下の2点にまとめられる。(i)加圧に伴い、結合様式が常圧では2状態的な変化であったものが、高圧下では速い結合と遅い結合の二つの結合様式が混在して進行する。(ii)ピークによって結合の速度定数の圧力依存性が異なり、加圧によって速度定数の大きくなる(つまり結合が速くなる)部位と速度定数の小さくなる(つまり結合が遅くなる)箇所の両方があること。これらの結果から考えられる β LGのPA結合様式について考察する。

4. 考察

ウシ β ラクトグロブリンへのパルミチン酸結合の経時変化の圧力依存性の結果から、常圧ではPA結合様式が単一であったのに対し、高圧下では複数(少なくとも2つ)の様式で結合が進行することが示唆された。この現象について考察を行いたい。緒論で述べた通り、 β LGはバレル型の構造を有しており、その内部の空洞に疎水性分子を結合することが知られている(図1)。常圧下におけるPA結合は、このバレル内空洞のみへの結合しか起きておらず、スペクトル上のどの化学シフトでモニタしても同じ速度定数を示したと考えられる。それに対し、高圧下では第2の結合サイトが生じてPAが結合できるようになり、その結果スペクトル上の位置(化学シフト)によって異なる速度の結合挙動が同時に観測されたと考えられる。

それではなぜ常圧では見られなかった第2のPA結合サイトが高圧下で生じたのか。それは β LG分子の圧力による構造変化に起因すると考えられる。以前の報告から野生型の β LGは中性条件において100 MPaから200 MPaにかけて変性し、その変性中点圧力(P_m)が175 MPaであることが知られている。⁽¹⁷⁾また、 β LGの野生型と比べて、A34C変異体では天然状態と変性状態の自由エネルギー差 ΔG が6.36 kJmol⁻¹高いことも報告されている。⁽¹⁸⁾ここで、野生型とA34C変異体の天然状態と変性状態の体積差 ΔV が同じであると仮定すると、これまでの圧力研究から導かれた $\Delta G = \Delta G_0 + P\Delta V$ の式⁽¹⁹⁾から、A34Cの P_m は206 MPaと計算される。つまり常圧や100 MPaでは天然状態が優勢であるのに対し、200 MPaでは天然状態と変性状態がほぼ同じだけ存在し、その間の中間構造を含めた多くの構造が存在することになる。なお、上式の ΔG_0 は常圧における天然状態と変性状態の自由エネルギー差である。

ここで、 β LGが天然構造をとっている時は第2のサイトにはPAはアクセスできずバレル内空洞にのみ結合するが、100 MPa以上では部分的に変性した構造が混在しており、その中で第2のサイトに結合可能になった種が存在するのではないかと推測される。その第2のサイトへの結合が、バレル内空洞とは異なる結合挙動として観測されたと考えられる。中村らはHAMLET様複合体形成においても、 α ラクトアルブミンやそのほかのタンパク質がモルテングロビュール状態という緩い三次構造を保持する変性中間体状態をとることで、オレイン酸との結合を促進していることを示唆している。⁽⁶⁾今回の β LGの場合も、圧力によって生じた部分変性状態が、天然構造で本来持つ第1の結合サイト(バレル内空洞)とは別の結合部位を生じさせたことが強く示唆される。

そもそも、変性中間状態に脂質分子が結合するという現象は、球状タンパク質共通の性質ではないだろうか。強い変性条件では構造が完全に失われるため、疎水性分子が結合することは無いが、弱い変性条件では、タンパク質分子の天然構造を安定化する疎水性残基がある程度集まったままとなり、そこに疎水性の蛍光分子が結合することがよく観察される。⁽²⁰⁾脂肪分子も疎水性が強いため、このような変性中間体で結合能が上がることは、変性過程で中間体が生じるような球状タンパク質では一般的な現象の可能性はある。

しかし変性中間状態でどの部位に結合サイトが生じるかは、タンパク質によって異なるはずである。こ

ここで、高圧下で生じた第2のサイトの部位がどこか考察する。もし高圧下で2次元 ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルを測定し、どの残基の信号が変化したかを調べれば、第2結合部位の同定ができる。しかし、高圧下では βLG が部分変性しているため、2次元スペクトルでは信号の分離が悪くなり、残基ごとの情報を得るのが難しい。そこで、これまでの研究結果を基に、想定される第2結合部位を推測したい。

これまでの βLG 分子はバレル内空洞の他の部位にも疎水性分子を結合することが報告されている。例えばビタミン D_3 分子は、このバレル内空洞に加え、 α ヘリックスとバレルの間の溝（クレフトと呼ばれている）にも結合することが結晶構造から示されている。⁽²¹⁾我々も NMR で、別の疎水性分子（1-アニリノ-8-ナフタレンスルホン酸）がこのクレフト部位に結合することを示した。⁽²²⁾つまり高圧下ではこのような第2の結合サイトにも PA が結合できるようになり、その結果異なる結合挙動が同時に観測されたのではないかと思われる。

これまでの βLG 構造の圧力依存性の研究から、 βLG は高圧下で、 βLG の折り畳み中間体と同様の構造をとることが示唆されている。^(23,24)緒言で述べた通り、 βLG のバレル構造は2枚の β シートからなる。ストランド A, H, G, F, E からなる片方のシートは折り畳み初期に形成されることからコアシートと呼ばれ、ストランド B, C, D からなるもう片方のシートはサブシートと呼ばれる（図4右）。 βLG の折り畳み過程に様々な中間体を取ることが知られているが、その中でこのコアシートは天然状態と同じでありながら、サブシートと α ヘリックスがまだ十分に折りたたんでいない中間体の存在が示唆されている。 α ヘリックスとコアシートは疎水性相互作用で結合しているが、この二者間のパッキングが十分でないため、その間の疎水性残基が露出していると考えられる（図4左）。おそらく高圧下ではこの部位の疎水性残基の露出があるため、第2の結合サイトとして PA が結合可能になったのではないかと考えられる。我々は以前、折り畳み経路が変化する変異体2種、G17E と E44L、を報告した。これらの変異体では上で述べたような折り畳み中間体の安定性が、前者では安定化し、後者は不安定化する。⁽²⁵⁾よって、部分的に変性した中間状態において第2サイトが生じるという上の提案の検証のためには、これらの変異体で今回と同様の実験を行うことが考えられる。つまり今回の提案が正しければ、G17E でより低圧で第2サイトの結合が観測される一方、E44L で第2サイトへの結合が観測されにくくなることが期待される。今後検証したい。

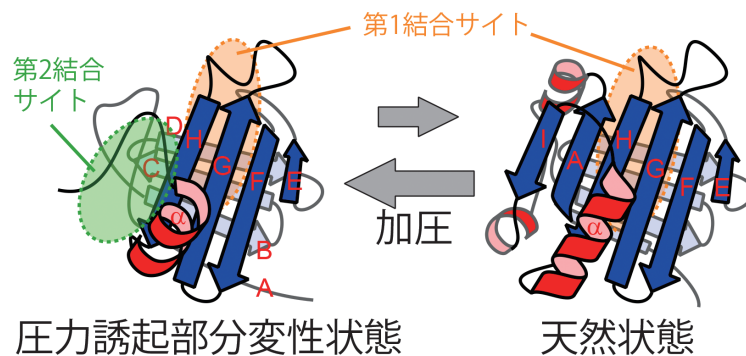


図4 想定される、圧力印可による β ラクトグロブリン脂肪酸結合機構の変化。図中の橙色と緑色で示した領域はそれぞれ第1結合サイト（バレル内空洞）、第2結合サイト（クレフト）の位置を示している。

一方圧力印可によって、第1サイトであるバレル内空洞への PA 結合の速度が上がった。第1サイトへの結合は主に疎水性相互作用が主な駆動力になっていると考えられる。PA の長い炭化水素基が結合前は

溶媒の水に露出しているのに対し、結合後は β LG のバレル内空洞中の疎水性残基との相互作用が主になるからである。この結合によって PA の疎水性表面がサイト中に埋もれ、水との接触面積が減少する。ここで、Chalikian も Makhatadze も疎水性残基の水への露出は、系の体積を増加させると述べている。^(26,27)つまり、PA がバルク水から β LG 分子内に移動すると、それに伴う系の体積減少が大きい（つまり ΔV がより負の値になる）ということになる。上述の通り二状態間の自由エネルギー差 ΔG が $\Delta G = \Delta G_0 + P\Delta V$ の式で求められ、その ΔG の値に従って各状態の占有数が変化することが分かっている。⁽¹⁹⁾つまり、 ΔV が負の方向に大きいと、高圧条件下での安定化がより顕著になる。よって、脂肪鎖の大部分を埋没させるような結合は高圧下ではより安定化することが予想される。第 1 サイトへの結合の速度が高圧下で上昇しているのは、疎水性相互作用が主な結合であり、200 MPa までの圧力条件下で結合能を保持しているためだと考えられる。

なお、今回はタンパク質由来の NMR 信号を議論の対象としたが、結合した PA 由来の NMR 信号を解析することで、結合サイトごとに結合後の PA のコンフォメーション分布や結合機構を議論することが可能だと考えられる。今回、結合した PA 由来の信号を同定しようと試みたが、PA のカルボキシ基やメチル、メチレン基由来の信号はタンパク質由来の信号と完全に重なってしまうため、PA 分子の構造情報を直接得ることはできなかった。しかし、安定同位体標識した PA を用いることができれば、タンパク質分子由来の信号を抑え、直接 NMR 観測が可能となる。実際 β LG に結合した ^{13}C 標識 PA の NMR 信号から、バレル内空洞に結合すると運動性が下がるという報告がなされている。⁽²⁸⁾これらの実験系でさらに J 結合定数の測定⁽²⁹⁾など、コンフォメーション分布を調べられる測定を行うことで、各結合サイトに PA 分子がどのような構造や機構で結合するかを調べられると期待される。こちらも今後の課題として検討したい。

5. 結論

β LG の脂肪酸結合能の圧力依存性の観察とその機構についての考察を行った。常圧では β LG は単一のパルミチン酸結合挙動を示し、主要な結合サイトであるバレル内空洞への結合のみが起きていると考えられる。一方高圧条件下では、パルミチン酸が速く結合する部位と遅く結合する部位があることが示された。速く結合する部位は、常圧と同じバレル内空洞だと考えられるが、遅い部位の方は加圧によって引き起こされた β LG の構造変化に伴い、新たに生じた部位だと考えられる。これらの結果から、加圧により、従来の結合サイトの結合能が上昇するだけでなく、新たな結合サイトが生じることが示唆されたため、牛乳の栄養の増強という面や、抗腫瘍能の増加が期待される。詳細な構造変化の情報や、機能増強の有無についてはさらなる実験が必要であるが、高圧処理によるタンパク質機能の改変にひとつの応用可能性を示唆した結果であると考えられる。

6. 参考文献

- (1) Zhou, A., Wei, Z., Read, R. J., Carrell, R. W. (2006) Structural mechanism for the carriage and release of thyroxine in the blood, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 13321-13326.
- (2) Zanotti, G., Ottonello, S., Berni, R., Monaco, H. L. (1993) Crystal structure of the trigonal form of human plasma retinol-binding protein at 2.5 Å resolution, *J Mol Biol*, 230, 613-624.
- (3) Sacchettini, J. C., Gordon, J. I., Banaszak, L. J. (1989) Crystal structure of rat intestinal fatty-acid-binding protein. Refinement and analysis of the Escherichia coli-derived protein with bound palmitate, *J Mol Biol*, 208, 327-339.
- (4) Le Maux, S., Bouhallab, S., Giblin, L., Brodkorb, A., Croguennec, T. (2014) Bovine beta-lactoglobulin/fatty acid complexes: binding, structural, and biological properties, *Dairy Sci Technol*, 94, 409-426.

- (5) Svensson, M., Hakansson, A., Mossberg, A. K., Linse, S., Svanborg, C. (2000) Conversion of alpha-lactalbumin to a protein inducing apoptosis, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 4221-4226.
- (6) Nakamura, T., Aizawa, T., Kariya, R., Okada, S., Demura, M., Kawano, K., Makabe, K., Kuwajima, K. (2013) Molecular mechanisms of the cytotoxicity of human alpha-lactalbumin made lethal to tumor cells (HAMLET) and other protein-oleic acid complexes, *J Biol Chem*, 288, 14408-14416.
- (7) Akasaka, K., Nagahata, H., Maeno, A., Sasaki, K. (2008) Pressure acceleration of proteolysis: A general mechanism, *Biophysics (Nagoya-shi)*, 4, 29-32.
- (8) Sakurai, K., Tomiyama, R., Shiraki, T., Yonezawa, Y. (2019) Loosening of side-chain packing associated with perturbations in peripheral dynamics induced by the D76N mutation of beta2-microglobulin revealed by pressure-NMR and molecular dynamic simulations, *Biomolecules*, 9, 491.
- (9) Wu, S. Y., Perez, M. D., Puyol, P., Sawyer, L. (1999) beta-lactoglobulin binds palmitate within its central cavity, *J Biol Chem*, 274, 170-174.
- (10) Brownlow, S., Morais Cabral, J. H., Cooper, R., Flower, D. R., Yewdall, S. J., Polikarpov, I., North, A. C., Sawyer, L. (1997) Bovine beta-lactoglobulin at 1.8 Å resolution--still an enigmatic lipocalin, *Structure*, 5, 481-495.
- (11) Kontopidis, G., Holt, C., Sawyer, L. (2002) The ligand-binding site of bovine beta-lactoglobulin: evidence for a function?, *J Mol Biol*, 318, 1043-1055.
- (12) Konuma, T., Sakurai, K., Goto, Y. (2007) Promiscuous binding of ligands by beta-lactoglobulin involves hydrophobic interactions and plasticity, *J Mol Biol*, 368, 209-218.
- (13) Fang, B., Zhang, M., Tian, M., Ren, F. Z. (2015) Self-assembled beta-lactoglobulin-oleic acid and beta-lactoglobulin-linoleic acid complexes with antitumor activities, *J Dairy Sci*, 98, 2898-2907.
- (14) Yagi, M., Kameda, A., Sakurai, K., Nishimura, C., Goto, Y. (2008) Disulfide-linked bovine beta-lactoglobulin dimers fold slowly, navigating a glassy folding landscape, *Biochemistry*, 47, 5996-6006.
- (15) Yagi, M., Kameda, A., Sakurai, K., Nishimura, C., Goto, Y. (2008) Disulfide-linked bovine beta-lactoglobulin dimers fold slowly, navigating a glassy folding landscape, *Biochemistry*, 47, 5996-6006.
- (16) Akasaka, K. (2018). Protein Studies by High-Pressure NMR. In *Experimental Approaches of NMR Spectroscopy* (Naito, A., ed.), pp. 3-36. Springer, New York.
- (17) Dufour, E., Hoa, G. H., Haertle, T. (1994) High-pressure effects on beta-lactoglobulin interactions with ligands studied by fluorescence, *Biochim Biophys Acta*, 1206, 166-172.
- (18) Sakurai, K., Goto, Y. (2007) Principal component analysis of the pH-dependent conformational transitions of bovine beta-lactoglobulin monitored by heteronuclear NMR, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 15346-15351.
- (19) Akasaka, K. (2006) Probing conformational fluctuation of proteins by pressure perturbation, *Chem Rev*, 106, 1814-1835.
- (20) Judy, E., Kishore, N. (2019) A look back at the molten globule state of proteins: thermodynamic aspects, *Biophys Rev*, 11, 365-375.
- (21) Yang, M. C., Guan, H. H., Liu, M. Y., Lin, Y. H., Yang, J. M., Chen, W. L., Chen, C. J., Mao, S. J. (2008) Crystal structure of a secondary vitamin D3 binding site of milk beta-lactoglobulin, *Proteins*, 71, 1197-1210.
- (22) Konuma, T., Lee, Y. H., Goto, Y., Sakurai, K. (2013) Principal component analysis of chemical shift perturbation data of a multiple-ligand-binding system for elucidation of respective binding mechanism, *Proteins*, 81, 107-118.
- (23) Sakurai, K., Yagi, M., Konuma, T., Takahashi, S., Nishimura, C., Goto, Y. (2017) Non-native alpha-helices in the initial folding intermediate facilitate the ordered assembly of the beta-barrel in beta-lactoglobulin, *Biochemistry*, 56, 4799-4807.
- (24) Kuwata, K., Li, H., Yamada, H., Batt, C. A., Goto, Y., Akasaka, K. (2001) High pressure NMR reveals a variety of fluctuating conformers in beta-lactoglobulin, *J Mol Biol*, 305, 1073-1083.
- (25) Sakurai, K., Fujioka, S., Konuma, T., Yagi, M., Goto, Y. (2011) A circumventing role for the non-native intermediate in the folding of beta-lactoglobulin, *Biochemistry*, 50, 6498-6507.
- (26) Chalikian, T. V. (2001) Structural thermodynamics of hydration, *J Phys Chem B*, 105, 12566-12578.
- (27) Chen, C. R., Makhatadze, G. I. (2017) Molecular determinant of the effects of hydrostatic pressure on protein folding stability, *Nat Commun*, 8, 14561.
- (28) Ragona, L., Fogolari, F., Zetta, L., Perez, D. M., Puyol, P., De Kruif, K., Lohr, F., Ruterjans, H., Molinari, H. (2000) Bovine beta-lactoglobulin: interaction studies with palmitic acid, *Protein Sci*, 9, 1347-1356.
- (29) Karplus, M. (1959) Contact electron-spin coupling of nuclear magnetic moments, *J Chem Phys*, 30, 11-15.

英文抄録

Pressure-based manipulation of the protein-fatty acid interaction

Hiroki ITO¹, Kazumasa SAKURAI^{1,2}

Cow's milk contains many fatty-acid binding proteins, such as α -lactalbumin (α LA), fatty acid binding protein (FABP), and β -lactoglobulin (β LG). It is assumed that they transport nutrition components around the body. In addition, α LA was reported to associate with oleic acid to form anti-tumor complexes, so called HAMLET (human α -lactalbumin made lethal to tumor cells). In these complexes, the interaction between protein and fatty acid is not specific and protein assumes intermediate state with a loosely packed tertiary structure. If we can modify the binding amount of the fatty acids and the binding mechanism, we will be able to enhance the nutrition transport activity and the anti-tumor activity. We have been investigating the pressure effects on function, structure, dynamics and stability of protein molecules. It is known that the pressure application modifies the protein dynamics and enhances enzymatic activity. In this report, we investigated the pressure effect on the fatty acid binding reaction of β LG. High-pressure NMR measurements told us that, under ambient pressure, only fatty acid binding to the internal cavity of β LG was observed whereas, at higher pressure, fatty acid also bound to another binding site of β LG. It is assumed that pressure application induced partial unfolding of β LG, which generated a new binding site. The present result will provide a possibility of a new application of pressure to modify the functionality of proteins, especially fatty acid-binding of milk proteins.

Key words: high-pressure NMR, protein, ligand binding, protein-fatty acid complex, β -lactoglobulin.

1. Graduate School of Biotechnological Science, Kindai University, Wakayama 649-6493, Japan

2. High Pressure Protein Research Center, Institute of Advanced Technology, Kindai University, Wakayama 649-6493, Japan