

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580180

研究課題名(和文) オボアルブミンの凝集体形成機構：初期中間体オリゴマーのX線結晶構造解析

研究課題名(英文) Mechanisms for polymerization of ovalbumin: X-ray crystallography of initial oligomer

研究代表者

高橋 延行 (Takahashi, Nobuyuki)

京都大学・(連合)農学研究科(研究院)・助教

研究者番号：20252520

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：卵の加工特性を特徴付けるオボアルブミンの凝集体形成やゲル化プロセスについては、これまで、オボアルブミン分子を球体で表した解像度の低いモデルで考察されてきたが、本研究では、X線結晶構造解析結果を活かして、凝集体形成時の本タンパク質の会合状態について、原子レベルの解像度で明らかにすることを目指した。凝集体形成の条件を検討し二量体三量体の単離を試みたが、X線結晶構造解析に適する結晶を得ることはできなかった。しかし、この過程で、本タンパク質のN末端領域が、会合に影響を及ぼすことと、本タンパク質表面に存在するセリン残基の存在状態が、本タンパク質の変性温度を大きく変化させることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Egg ovalbumin has been applied as a model for polymerization or gelation of general food proteins. The mechanisms for polymerization or gelation of the protein have been elucidated by low resolution model with the images like string of beads. Though an atomic resolution model for oligomers of ovalbumin was asked in the present study, good crystal of initial oligomers has not been obtained after a number of trials of purification and preparation under various conditions. On the way of investigation, the authors found the importance of N-terminal segment of the protein on the polymerization process and some solvent-accessible serine residues might be crucial for the thermostability of the protein.

研究分野：応用構造生物学

キーワード：タンパク質 オボアルブミン アミロイド コンフォメーション変化 認知症 熱安定性 ラセミ化 D-アミノ酸

1. 研究開始当初の背景 オボアルブミンは、ゆで卵で見られるように、加熱することにより凝集体を形成する。熱凝集の過程では、アミロイド特異的な指示薬であるチオフラビン T との反応性を獲得することから、ストランドを単位とした機構により凝集すると推定されているが、その実態は明らかになっていない。本タンパク質の X 線結晶構造解析と CD スペクトルからの予測によると、分子内の二次構造は、ヘリックス、シート、ランダムコイルが、それぞれ入り混じって分子全体に分布しており、典型的なアミロイド線維のようにシートのみが三次元的に展開したモデルは適用できない。これまで、オボアルブミンの凝集体に関して提唱されている分子モデルは、オボアルブミン分子を球体として扱ったもので、分解能で言えば数十オングストローム程度のものであった(図 1)。

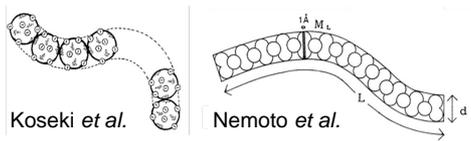


図 1 従来のオボアルブミン凝集体モデル

一方、近年、オボアルブミンと一次構造上の類似性が高いといわれる類縁タンパク質群(セルピン・スーパーファミリー)において、単離された二量体の X 線結晶構造解析が行われ、これに基づいて分解能 1 オングストロームに迫る凝集体ポリマーの分子モデルが構築された(図 2)。

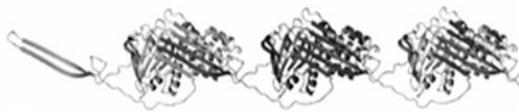


図 2 セルピン(アンチトリプシン)の凝集体ポリマーモデル

従来から、オボアルブミンについても二量体の存在は実験的に観察され、Nemoto らのモデルでも二量体が凝集体の基本単位と想定さ

れたが、その分子構造の実態は不明であった。そこで、本研究では、オボアルブミン二量体を実験的に単離精製し、X 線結晶構造解析を行い、その分子構造を明らかにするとともに、三量体、四量体とオリゴマーの単離・構造決定を行い、凝集体ポリマー形成のメカニズムを解明することを目指した。

< 引用文献 >

Azakami H *et al.*, *J Agric Food Chem* 2005, **53**, 1254-1257
 Takahashi N and Hirose M, *J Biol Chem* 1992, **267**, 11565-11572
 Koseki T *et al.*, *Food Hydrocolloids* 1989, **3**, 123-134
 Nemoto N *et al.*, *Biopolymers* 1993, **33**, 551-559
 Yamasaki M *et al.* *Nature* 2008, **455**, 1255-1258
 Yamasaki M *et al.* *EMBO Rep* 2011, **12**, 1011-1017

2. 研究の目的 オボアルブミンは、Yamasaki らにより凝集体の分子モデルが提唱されているセルピン・スーパーファミリーのタンパク質と一次構造のみならず、立体構造においても類似性が高いことが知られているので(図 3)、これらの凝集体モデル構築

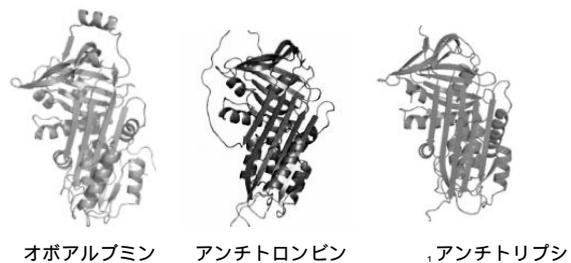


図 3 オボアルブミンとセルピン・スーパーファミリータンパク質の立体構造

のストラテジーに習い、オボアルブミンオリゴマーの単離精製と X 線結晶構造解析を行うことを目的とした。これらの立体構造から、さらに高分子化した凝集体ポリマーの構造を類推し、オボアルブミンのゲル化や組織化のモデルを構築することを目指した。

3. 研究の方法 オボアルブミンの加熱により生じる凝集体をゲルろ過カラムクロマトグラフィー、もしくは、陰イオン交換カラムクロマトグラフィーにより分離し、二量体、三量体、四量体、など、オリゴマーの精製操作を行った。それぞれのオリゴマーを多く含む画分について結晶化を試み、X線結晶構造解析に供する計画を立てた。これらを調製する段階で、それぞれのオリゴマーが生成しやすい条件の最適化を行った。これと平行して、結果として生じるポリマーがオリゴマー構造を連続して有するような規則的な構造を取っているかどうかを確認するために、ポリマーのX線繊維回折実験を行った。均質な繊維や粉末試料に特徴的な規則的な構造を有する場合、X線回折像に同心円状のリングが生じることが知られているので、これを利用して、オボアルブミンのオリゴマーについて、規則的な繰り返し構造を有する、重合体が形成しているかどうかの確認を行った。

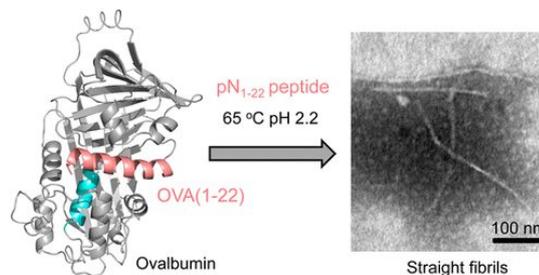
4. 研究成果

(1)凝集体形成初期中間体の調製と単離 初期中間体の単離を目的として、高度に凝集が進む前の、オリゴマーが主に形成する条件を探索するために、オボアルブミン濃度、バッファ濃度、pH、加熱温度などの条件を組み合わせ検討した結果、オボアルブミン濃度、1.5mg/ml、10mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.5) 中、80、3分以下の加温により、高度重合体の割合の少ないサンプルが調製できることが分かった。同様の条件で、調製した、二量体、三量体の混在したサンプルについて、カラムクロマトグラフィーによる単離を試みた。当初、ゲル濾過カラムによる分離を主に、検討していたが、良好な分離が得られなかったため、陰イオン交換カラムも対象に、良好な分離条件を検討した。その結

果、いずれのカラムを用いた場合も、アルカリ条件下での分離が良好であることが、わかってきたが、高 pH 条件下では、後述の、熱安定化型の分子種 S-オボアルブミンが生成混入する可能性があり、加熱後の挙動を解析するには不適切であると判断された。

(2)凝集体形成初期における N 末端配列の及ぼす影響の検討

オボアルブミンについて、マイルドな酸性条件下で、ペプシンを作用させると、N 末端部 22 残基のフラグメントが脱落し、残りの部分が単独で安定に存在できることから、p-オボアルブミンと名付けられ、その食品機能特性の詳細が報告されている。我々の先行研究においても、この領域が、オボアルブミンの線維状凝集体形成に寄与する可能性を見出していたので、N 末端 22 残基のペプチドの加熱凝集に及ぼす効果を検討した。その結果、この N 末端ペプチド単独で、加温すると、組織化の結果として、繊維状の凝集体を形成することがわかった。さらに、オボアルブミンの加熱凝集実験において、このペプチドを添加すると、オボアルブミンの組織化、繊維状凝集体形成が促進される可能性が示唆された (公表雑誌論文)。



(3)凝集体形成に影響を及ぼす熱安定化型分子種の形成とその機構に関する検討

鶏卵の保存中に、卵白が変質し、これを材料にしたケーキの品質に影響を及ぼすことを端緒として、S-オボアルブミンと名付けられた熱安定化型の分子種が見出されている。新鮮

な卵白から得られるオボアルブミンと、S-オボアルブミンの物理化学的性質が詳細に解析されてきたが、その差異は明らかにならず、その熱安定性が異なっているという点のみで区別できるものであった。しかし、我々のX線結晶構造解析結果によると、分子表面に存在するいくつかのセリン残基がD-化していることが見出され、タンパク質工学的な解析によっても、これらのセリン残基がS-オボアルブミンの熱安定化機構に寄与している可能性が示唆された。実際に、S-オボアルブミンに、D-セリンが存在するかどうかを検証するために、重水素交換を利用したマスペクトルにより解析したところ、X線結晶構造解析により見出された、セリン残基の数に応じた割合で、D-セリン残基が検出され、化学的にD-セリン残基の存在を確認することができた(公表雑誌論文)。S-オボアルブミンは、オボアルブミンに比べて、熱変性温度が8℃異なっており、凝集体を形成する挙動も同一条件では、大きく異なる可能性が高い。しかしながら、特定のセリン残基(Ser164、Ser320)の異性体構造により、安定性が左右されていることを利用して、凝集体形成の空間的な理解に寄与する可能性を見出したものと考えている。

<引用文献>

- Kitabatake, N and Doi, E, *Agric Biol Chem* 1985, **49**, 2457-2548
Tanaka, N *et al.*, *J Biol Chem* 2011, **286**, 5884-5894
Smith, MB and Back, JF, *Aust J Biol Sci* 1965, **18**, 365-377
Yamasaki, M *et al.*, *J Biol Chem* 2003, **278**, 35524-35530
Takahashi, N *et al.*, *Chem Biodivers* 2010, **7**, 1644-1650

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 5件)

Miyamoto T, Takahashi N 他 5名、Transition of serine residues to the D-form

during the conversion of ovalbumin into heat stable S-ovalbumin, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 巻号頁数未定、2015年、査読有
DOI: 10.1016/j.jpba.2015.04.030

Kawachi Y 他 4名中 4番、Role of the N-terminal amphiphilic region of ovalbumin during heat-induced aggregation and gelation, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **61** 巻、36号、8668-8675頁、2013年、査読有
DOI: 10.1021/jf402456v

[学会発表](計 6件)

Miyamoto T 他 6名中 2番、Analysis of D-Amino Acid residues in proteins treated with alkaline, The 2nd International Conference of D-Amino Acid Research, 平成 26年 9月 4日、Tochigi Prefectural Culture Center (栃木・宇都宮)

Yamasaki M 他 3名中 4番、Storage of Hen-Egg induces D-Serine generations at specific sites in Egg-White protein, Ovalbumin, modulating its properties for food processing and allergy, The 2nd International Conference of D-Amino Acid Research, 平成 26年 9月 3日、Tochigi Prefectural Culture Center (栃木・宇都宮)

河内 悠希他 4名中 4番、オボアルブミンの加熱凝集に対するN末端ペプチドの役割、日本農芸化学会 2014年度大会、平成 26年 3月 28日、明治大学(神奈川・川崎)

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.structure.kais.kyoto-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

高橋 延行 (TAKAHASHI Nobuyuki)

京都大学・農学研究科・助教

研究者番号：20252520

(2)研究分担者

無し

(3)連携研究者

無し