



Title	Studies of Protein Conformation by Fluorescence Measurements
Author(s)	Okabe, Nobuo
Citation	
Issue Date	
Text Version	ETD
URL	http://hdl.handle.net/11094/1352
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/repo/ouka/all/>

【 5 】

氏名・(本籍)	おかの 岡 部 亘 雄
学位の種類	理 学 博 士
学位記番号	第 2 1 3 1 号
学位授与の日付	昭 和 45 年 10 月 23 日
学位授与の要件	理学研究科無機及び物理化学専攻 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	ケイ光法によるタンパク質の構造研究
論文審査委員	(主査) 教 授 伊勢村 壽三 (副査) 教 授 宮沢 辰雄 教 授 新村 陽一

論 文 内 容 の 要 旨

〔I〕還元変性したタンパク質は適当な条件のもとでは元の構造に復元することが実証されている。我々の研究室においてもタカアミラーゼAの復元過程の流体力学的研究により還元変性タカアミラーゼAの復元過程はまず有効体積の減少が生じ、ついで分子内のS-S架橋が形成されることを推定した。しかし、S-S架橋の形成する前の段階での還元変性タカアミラーゼAの分子内における運動性については流体力学的方法でも分光学的方法によつても得られてきていない。本研究ではケイ光色素DNS基(1-Dimethylaminonaphthalen-5-sulfonyl基)をタカラアミラーゼA分子中に導入し、これを探索子としてケイ光の偏光解消法を用いてポリペプチド鎖の内部運動を調べた。偏光解消法を適用するに際しては、まずこれ迄のこの種の研究においてはほとんど検討されなかったケイ光の寿命をナノセカンド光源法により直接に測定しその妥当性について検討した。その結果、DNSタカアミラーゼA、還元カルボキシメチルDNSタカアミラーゼAがともに1個の寿命値を有することが確かめられた。これにより1個の寿命を仮定しているWeberの式 $[(\frac{1}{P} + \frac{1}{3}) = (\frac{1}{P_0} + \frac{1}{3})(1 + \frac{RT\tau}{V})]$ に適用出来ることが明らかとなった。DNSタカアミラーゼAの寿命はDNS基のタカアミラーゼAへの結合数に無関係で22nsecを示した。一方、還元カルボキシメチルDNSタカアミラーゼAは36nsecを示した。これらのケイ光の寿命の比は相対的なケイ光の収率比に等しいことも明らかとなり、ケイ光の寿命とケイ光の相対収率とは比例することが示唆された。これ迄の偏光解消の解析ではDNS基のケイ光の寿命値として12nsecが慣習的に使用された。しかし本研究で明らかにされたように、ケイ光寿命はその状態の変化に伴い変化し、今後の研究においてはケイ光の寿命の検討が必要であるということが強く示唆された。偏光解消度からの回転拡散の緩和時間の算出にあたっては、DNSタカアミラーゼAに対する還元DNSタカアミラーゼA、還元カルボキシメチルDNSタカアミラーゼAおよび8M尿素中での還元

カルボキシメチル誘導体のケイ光の相対収率を求め、この値とDNSタカアミラーゼAのケイ光寿命からそれぞれのケイ光寿命を算出して用いた。その結果、DNSタカアミラーゼAの回転緩和時間は88 nsecで、タカアミラーゼAの分子量を52,000、偏比容を0.700として剛体球を仮定した場合の2倍を示した。これに対し、還元DNSタカアミラーゼAでは154nsec~195nsecで、流体力学的方法で既に得られた有効体積から予期される値とよい一致がみられた。この結果はこの状態におけるポリペプチド鎖の内部運動が束縛されていることを示唆した。還元カルボキシメチルDNSタカアミラーゼAは123nsecの回転緩和時間を有し、ポリペプチド鎖の内部運動は還元誘導体ほどではないが束縛されていることを示した。還元カルボキシメチル誘導体についてはDNS結合数に関係し、1.1の結合数で123 nsec、2.5の結合数で6.1nsecに減少した。この結果は、還元カルボキシメチルDNSタカアミラーゼAのポリペプチド鎖が還元誘導体の場合よりもよりほどけた構造をとっているならば説明される。こように本研究では還元変性の状態でポリペプチド鎖はすでにあるまじりをもっていることが示唆された。またこれらと対照的に8 M尿素中での還元カルボキシメチル誘導体は11nsecという小さな運動単位を有していることが知られた。

〔Ⅱ〕本研究は還元変性させた卵白リゾチームの構造の復元におよぼすDNS基の影響をケイ光特性が環境の変化に鋭敏であるという性質を利用して調べたものである。リゾチーム1分子に平均1.3分子のDNS基が結合した試料を還元変性し、つぎに還元剤を除去して2 M尿素中で再酸化による復元反応を行なわせた。この再酸化試料はDNS基がタンパク質1分子に2個結合し会合したもの(Fr-I)と1個結合したもの(Fr-II)に分画された。本研究ではDNSリゾチームおよび上記のFr-IとFr-IIのそれぞれについて、ケイ光スペクトル、DNS基のジメチルアミノ基の解離、溶媒効果、塩酸グアニジンによる変性などの実験を行いDNS基の影響について比較検討した。その結果、DNSリゾチームとFr-IIは全く類似の結果を与えたがFr-Iの結果は前二者とは対照的なものであった。すなわち、Fr-Iのケイ光強度はDNSリゾチームおよびFr-IIに較べて著しく増大し、その発光極大は約540m μ から490m μ に青色移動をした。Fr-Iのジメチルアミノ基の解離定数はDNSリゾチームおよびFr-IIでのpKa \approx 3からpKa \approx 1に移行することが明らかとなった。しかしFr-Iのケイ光強度はDNSリゾチーム、Fr-IIのように有機溶媒ジオキサンの影響を受けなかった。また230m μ の波長における円二色性によって塩酸グアニジンによる赤性効果を調べた結果、DNSリゾチームおよびFr-IIの二色性が3 M塩酸グアニジンの濃度付近から協同的な変化を示したのに対し、何らの協同性も示さなかった。ケイ光強度によって調べた結果は、DNSリゾチーム、Fr-IIが3.2M塩酸グアニジン濃度に変曲点を有するのに対し、Fr-Iは4.2Mに変曲点を示して、塩酸グアニジンの高濃度まで強いケイ光性があることを示した。これらの実験の結果を総合すると、2個結合したFr-IではDNS基がタンパク質の分子内部或いは分子間に埋め込まれやすいということが認められ、DNS基の有する高度の疎水性が元の構造への復元を阻害することが示唆された。これに対し、1個結合したFr-IIでは本来分子内部にあった疎水性アミノ酸残基が分子表面に露出しなければならないなどの不都合のために復元が阻害されにくいものと推定される。このように本研究によって、DNS化タンパク質の復元がDNS基の結合部位の極性の変化により影響されるということが明らかとなった。

論文の審査結果の要旨

本論文はタンパク質の溶液状態におけるconformationを推定するためにタンパク質分子にケイ光色素を導入しそのケイ光特性を研究したものであってオ1部およびオ2部よりなっている。

まずオ1部ではケイ光の偏光解消を利用して球状タンパク質の分子内ジスルフィド結合を還元してえられる単一ポリペプチド鎖が再生復元せられる以前に内部運動がどの程度拘束せられているかについての情報をえんとしている。このような情報の獲得手段は現在ほとんど皆無であるが岡部君はこれに偏光解消法を適用して有用な知見を得ている、すなわち—S—S—結合をかくタカアミラーゼAのポリペプチド鎖は生の分子にくらべほどけた状態にあるに拘らずケイ光寿命の時間スケールで測定する限り内部運動は著しく拘束されていることを見出している。このことは今後タンパク質分子の挙動を考える上重要である。また岡部君は従来ケイ光色素に一律に適用されていたケイ光の寿命値に疑問を感じnsec法を利用しケイ光の絶対寿命を測定するとともに試料におけるケイ光色素のラベル数をそろえる等配慮して結果をより信頼性の高いものとしている

オ2部ではタンパク質分子表面に存在する親水性基に疎水性基を導入することがそのタンパク質分子にどのような影響を与えるかをタンパク質としてはリゾチーム、色素としては1-dimethylaminonaphthalene-5-sulfonyl基(略してDNS)を用いて検討している。とくにこのように化学修飾されたタンパク質のポリペプチド鎖が一旦ほどけた後に元通りにrefoldする反応におよぼす効果に重点がおかれている。従来親水性の残基の導入の効果は広範に研究されており再生にほとんど影響しないことが知られている。この研究では1分子当りDNSが1ヶ結合したものは元通りにrefoldするが、2ヶ結合したものは全く異った様式にfoldingがおこり、元の球状タンパク質の再生が見られないことを示した。ラベル数の差異がこのような劇的な効果を持つことを示したのはこの研究が最初である。恐らく数少ない従来類以の研究においてもこのことがおこっていてそれに気付かず混合物について誤った結論を出していたと考えられる点を指摘している点は重要である。DNS基のケイ光性はその基の環境を鋭敏に反映する特性を巧みに利用していることは注目に値する。この研究は疎水性残基が分子内部に、そして親水性残基が分子表面に分布することによって安定を保持されている球状タンパク質の構造がそのバランスをくずすに足るだけ化学修飾をうけると致命的な影響をうけることを例示したのとして高く評価される

以上岡部君の研究はタンパク質物理化学に寄与するところが少なくなく理学博士の学位論文として十分な価値があるものとみとめる。