OUKA
Osaka University Knowledge Archive

Title	STRUCTURE AND STABILITY OF BENCE JONES PROTEINS
Author(s)	Azuma, Takachika
Citation	大阪大学, 1974, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/1574
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

【22】

氏名・(本籍)	東(あずま)　隆親(たかちか)
学位の種類	理学博士
学位記番号	第3021号
学位授与の日付	昭和49年3月15日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位論文題目	ベンス・ジョンス蛋白の高次構造と安定性
論文審査委員	(主査) 教授 浜口 浩三
	(副査) 教授 松原 央　教授 京極 好正

論文内容の要旨

Bence Jones 蛋白は、免疫グロブリンのL鎖に相当する蛋白で、一般の免疫グロブリンと異り、均一な標品であることから、抗体の構造の研究には欠くことができない。本研究では Bence Jones 蛋白の高次構造および側鎖の状態と、変性剤に対する安定性を、滴定、差吸収スペクトル、化学修飾、円偏光二色性（CD）などの方法で調べた。

κ 型の Ta 蛋白の滴定の結果を Linderstrom-Lang の式で解析した結果、カルボキシル基、α-およびε-アミノ基は正常なpK値で滴定され、9個の Tyr のうち1個と2個の His のうち1個は正常なpK値で滴定されるが、残りの8個の Tyr と1個の His は、native 状態では滴定されないことがわかった。native 状態で滴定される Tyr の数は、低濃度のN-アセチルイミダゾールと反応する Tyr の数と一致した。

Trp 残基の状態は、2-Hydroxy-5-Nitrobenzyl Bromide (HNB bromide)による修飾と差吸収スペクトルで調べた。κ 型の Ta 蛋白には native 状態で HNB bromide と反応する Trp は無いが、6M尿素中では、2個の Trp が同試薬と反応する。一方、λ 型の Fu 蛋白では、native 状態で1個、6M尿素中では3個の Trp が HNB bromide と反応した。この結果、Ta および Fu 蛋白とも、native 状態では2個の Trp が分子内部に埋っていると考えられる。両蛋白を酸変性させた場合の差吸収スペクトルで、293 nmにおける差分子吸光係数（$\triangle\varepsilon_{293}$）は、約－2,000で、いずれの蛋白とも1個の Trp が溶媒に露出したことを示している。また尿素変性では両蛋白とも、2個の Trp が露出することがわかった。このような酸および尿素変性における挙動の類似性と、一次構造上の位置の関連性から、κ 型の Ta 蛋白では Trp-35と Trp-148が、また λ 型の Fu 蛋白では Trp-34と Trp-150が分子内部に埋っており、Fu 蛋白の Trp-187が分子表面にあることを推定した。

Bence Jones 蛋白の Stable Dimer の鎖間S－S結合を選択的に還元し、生じた－SH 基に

Fluorescein Mercuric Acetate (FMA) を結合させ、そのCDスペクトルを測定し、FMAの結合しているConstant 部分の構造を調べた。κ型のTa、Ham、Ya蛋白とFMAとの結合体のExtrinsic Cotton 効果は、いずれも510nm近傍に負の極大を示し、互によく似ており、Carrier である蛋白のFMA の結合している部分の環境の類似性を反映しているものと考えられる。

Bence Jones 蛋白の種々の変性剤に対する安定性を調べた。塩酸グアニジン (GuHCl) の変性を250nmにおける平均残基旋光度 ($[m']_{250}$) の変化で調べた結果、κ型、λ 型の蛋白とも Native ⇆ Denaturedの二状態転移でなく、変性の過程に中間体が存在することがわかった。変性の過程をCDスペクトルで詳細に検討した結果、λ型蛋白の中間体は、Constant 部分が unfold し、Variable 部分が fold したままの分子であることが示唆された。この中間体のCDスペクトルを用いて、Constant 部分と Variable 部分のCDスペクトルを、それぞれ計算によって得た。Constant 部分のCD スペクトルは、標品間でよく似ているが、Variable部分のそれは、一次構造の多様性を反映して標品によって大きく異った。一方、κ型蛋白の中間体はλ型の場合と異り、いずれの部分とも Conformation 変化していることがCDより推定された。

κ型のGuHCl 変性で観察された中間体を明らかにするため、変性作用がGuHClより弱いとされている尿素による変性を調べた。Ta蛋白の尿素による $[m']_{250}$ の変化は、2～4Mまでの段階と、4M以上での段階との、ふたつから成っており、GuHCl 変性の場合と同様に、二状態転移とならない。HNB bromideによる修飾および差吸収スペクトルから、分子内部にある2個のTrpは4M尿素までに、すべて露出することがわかった。一方、2個ある鎖内S－S結合は、ジチオスレィトール (DTT) により、4M尿素までに1個還元されるが、もう一方のS－S結合は、5M以上の尿素濃度で除々に反応することがわかった。Titani ら (J. Biol Clem., 244, 3521(1969)) の結果を考え合わせると、5M以上の尿素濃度で反応するS－S結合は Variable 部分のものと考えられ、κ型蛋白の中間体は、Constant 部分が完全に unfold し、Variabl 部分も unfold してはいるが、完全ではない（特にS－S結合が存在する部分）分子であると推定した。λ型蛋白の場合は、GuHCl 変性の場合と同じように、Constant 部分が、まず unfold することが、CD の測定からわかった。

酸変性では、κ、λ型の蛋白とも Constant 部分の方が Variable 部分より不安定であることが示され、Bence Jones 蛋白の Constant 部分は Variable 部分より変性剤に対して弱いことがわかった。

論文の審査結果の要旨

Bence Jones 蛋白は免疫グロブリンのL鎖に相当する蛋白で、一般の免疫グロブリンと異なり均一な標品であるため、抗体の構造の研究には欠くことができない。

東隆親君の研究は、Bence Jones 蛋白の高次構造、安定性を酸塩基滴定、化学修飾、円偏光二色性などの方法を用いて詳細に調べたものである。酸変性による紫外吸収スペクトルの変化および化学修飾の結果から、2個のTrpをもつκ型 Bence Jones 蛋白では、35と148にあるTrpはともに分子内部に存在し、3個のTrpをもつλ型 Bence Jones 蛋白では、34と150にあるTrpは分子内部に、

187にあるTrpは分子表面にあることを推定した。

次に、塩酸グアニジンによる変性を調べたところ、変性過程に中間体の存在することを見出し、この中間体は一定構造部分のみが変性し、可変構造部分は変性していない状態であることを明らかにした。尿素変性、酸変性の結果からも、Bence Jones 蛋白の可変構造部分の方が一定構造部分より安定であることが示された。また、一定構造部分のSH基に結合させた fluorescein mercuric acctate の円二色性測定から、一定構造部分の立体構造の類似性を明らかにした。

以上、東君の論文は、Bence Jones 蛋白の立体構造が2つの独立な領域からできており、各領域の安定性がそれぞれ異なることを明らかにし、抗体蛋白の構造研究に大きな貢献をしたものであり、理学博士の論文として十分価値あるものと認める。