

Title	STRUCTURE AND STABILITY OF BENICE 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

氏名・(本籍)	あづま 東	たか 隆	ちか 親
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 ($\Delta\epsilon_{293}$) 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 \rightleftharpoons 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、2~4 M までの段階と、4 M 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 4 M 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、ジチオスレイトール (DTT) により、4 M 尿素までに 1 個還元されるが、もう一方の S-S 結合は、5 M 以上の尿素濃度で徐々に反応することがわかった。Titani ら (J. Biol. Chem., 244, 3521(1969)) の結果を考え合わせると、5 M 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、Variable 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 acetate 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。