

Title	Renaturation of The Trimeric Integral Membrane Protein, OmpF Porin
Author(s)	渡邊, 康
Citation	大阪大学, 1994, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38851
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	わた なべ やすし 渡 邊 康
博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)
学位記番号	第 1 1 2 3 8 号
学位授与年月日	平成 6 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 理学研究科高分子学専攻
学位論文名	Renaturation of The Trimeric Integral Membrane Protein, OmpF Porin (トライマー内在性膜蛋白質 OmpF ポーリンの復元)
論文審査委員	(主査) 教授 高木 俊夫 (副査) 教授 勝部 幸輝 教授 小高 忠男 教授 蒲池 幹治 助教授 油谷 克英

論 文 内 容 の 要 旨

蛋白質は、その固有の立体構造を形成して生命現象を担っている。蛋白質の構造形成機構を調べることは、生命現象の理解のために不可欠である。蛋白質の復元実験は、その構造形成機構の解明のための重要な知見を与える。OmpF ポーリンは、大腸菌の外膜中に内在し、親水性低分子の通路としての非特異的な孔を形成している膜蛋白質である。この蛋白質は、モル質量が 37 kg/mol の同一のポリペプチド鎖からなるトライマー構造をもち、そのサブユニットは、 β バレル構造から構成されている。このような膜貫通 β 構造から構成されているオリゴマー膜蛋白質の構造形成機構はほとんど理解されていない。従って、本研究では、OmpF ポーリンの構造形成過程を調べることを目的とした。

まず、復元過程を理解するためには、対象蛋白質の天然状態と変性状態の特性を把握する必要がある。水に不溶性の膜蛋白質の研究には、界面活性剤による可溶化が必要である。本蛋白質は、ドデシル硫酸ナトリウム (sodium dodecyl sulfate, SDS) などの強力な変性作用を持つ界面活性剤存在下でも、そのトライマー構造を維持している。本研究において、SDS 可溶化条件でヘキサマーが安定に存在することが、低角レーザー光散乱法による分子量決定により明らかとなった。この結果は、膜中の存在状態との関連で、本蛋白質の天然状態の新たな知見と思われる。さらに、外膜の主要成分であるリポポリサッカライドは、トライマーの集合化に重要であることが示された。

一方、変性状態を理解するために、OmpF ポーリンの SDS 存在下での熱による変性を、主として円偏光二色性測定により追跡した。その過程は、不可逆的なトライマーの解離を伴っていることが確認された。そして、変性モノマーは、天然構造とは非常に異なったほどけた構造を持つことが示された。

復元実験としては、SDS で可溶化された変性モノマーの巻戻りおよび再集合過程を詳細に研究した。特に、オクチルグルコシド (OG) のような変性作用のマイルドな界面活性剤、あるいは非イオン性界面活性剤と脂質の混合溶液の添加による復元を試みた。つねに 50%以上の収率の得られる条件は、変性モノマー (0.1mg/ml) を以下の溶液中で 25°C において 24 時間放置した時であった：7 mg/ml OG, 2 mg/ml asolectin, 1 mg/ml SDS 0.1 M NaCl, 1.5mM NaN₃, 10mM MOPS buff-er, pH 6.9。

OmpF ポーリンの復元には、次の点が重要であることが見いだされた。まず、復元反応中の蛋白質分子の適度に分散された可溶化状態を保持する必要がある。そのためには、適度な濃度の SDS がその溶液中に残存する条件が有効である。また、脂質は基本的には、OmpF ポーリンの変性モノマーの巻戻りには必要ない。しかし、安定トライマーを高収率で得るには脂質と界面活性剤の混合系が有効である。

得られた結果を基に、OmpF ポーリンの構造形成機構を考察した。構造を一部に持つほどけたモノマーは、変性作用のマイルドな界面活性剤の添加により、さらにほぐれた構造に変換する。次に、それは、 β 構造を構成成分として持つコンパクトなモノマーになる。そのうち、天然の構造に近い β バレル構造から構成されるモノマーは、ダイマー、さらにはトライマーに集合する。そのトライマーは、リポポリサッカライドと結合することにより精製された天然のトライマーと同じ熱安定性を獲得する。

本研究で得られた結果は、OmpF ポーリンの天然のトライマー構造は、成熟した蛋白質の一次構造によって決定されていることを示している。このような試験管内で得られた反応経路は、その蛋白質の局在化および速度論的な面を除くと、生体系の反応の一部を再現しているものと思われる。また、本研究で示された復元方法は、多くの SDS で変性した蛋白質の復元に有効であり、特に、膜蛋白質の精製に適用できるとと思われる。

論文審査の結果の要旨

渡邊康君は SDS と略称される陰イオン性界面活性剤、ドデシル硫酸ナトリウム、によって変性を受けて本来の立体構造を喪失した大腸菌外膜蛋白質 OmpF に、変性作用を欠いている非イオン性界面活性剤を添加することによって当初の構造に復元することを見だし、復元過程を支配する諸要因とともに中間生成物の性状を明らかにした。本研究は未解決であった生体膜蛋白質の構造形成の理解に重要な知見を提供したものであり、博士（理学）の学位論文として十分価値のあるものと認められる。