



Title	Structure and dynamics of non-native state of proteins studied by nuclear magnetic resonance spectroscopy
Author(s)	加藤, 秀典
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/45099">https://hdl.handle.net/11094/45099</a>
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。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏 名 加 藤 秀 典

博士の専攻分野の名称 博 士 (理 学)

学 位 記 番 号 第 18404 号

学 位 授 与 年 月 日 平成 16 年 3 月 25 日

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第4条第1項該当

理学研究科生物科学専攻

学 位 論 文 名 Structure and dynamics of non-native state of proteins studied by nuclear magnetic resonance spectroscopy  
(核磁気共鳴法による蛋白質の非天然状態の構造とダイナミクスについての研究)

論 文 審 査 委 員 (主査)

教 授 後藤 祐児

(副査)

教 授 阿久津秀雄 教 授 高木 淳一

## 論 文 内 容 の 要 旨

第一章では、 $\beta$ ラクトグロブリン ( $\beta$ LG) のフォールディング反応、アミロイド、 $\beta$ 2ミクログロブリン ( $\beta$ 2m) のアミロイド線維形成に関する一般的な説明を行った。最後に、本論文の目的、構成について記した。

第二章では、 $\beta$ LG の低温変性状態の構造を円二色性、X線小角散乱、核磁気共鳴法 (NMR) を用いて調べた結果について記述した。 $\beta$ LG の低温変性は古くから研究されているが、低温変性状態がどのような構造をしているかは明らかになっていなかった。X線小角散乱から低温変性状態は比較的コンパクトな変性状態であり、NMR から G、H の二本のストランドからなる  $\beta$ ヘアピン構造が残存していることが明らかになった。

第三章では、疎水性コアに位置するフリーのチオール基 (Cys121) を化学試薬で修飾した  $\beta$ LG を作製し、その構造、安定性、中性での会合状態を様々な分光法を用いて調べた。その結果、化学試薬による修飾によって、中性では分子が変性し、モノマーに解離しやすくなることが明らかになった。一方、酸性では安定性は低下するものの、構造には大きな変化がないことが示された。以上の結果から、Cys121 が  $\beta$ LG の安定性において果たす役割について考察した。

第四章では、 $\beta$ 2m のアミロイド線維形成の中間体の構造を NMR を用いて解析した。特に分子内ジスルフィド結合を還元すると典型的な線維形成が失われることから、ジスルフィド結合酸化型と還元型の両方を調べ詳細な比較を行った。実験結果から中間体は変性状態であるが、ヘリックス構造をとる傾向が強いことがわかった。さらに分子の運動性を調べたところ、酸化型では SS 結合の間のループの運動性が著しく抑えられているのに対し、還元型では分子全体にわたり様に運動性が高いことが明らかになった。以上の結果から、ヘリックス構造が線維形成を阻害する働きをもっているが、酸化型では SS 結合が運動性を抑制するため阻害作用を発揮できない。ところが還元型では SS 結合による運動の抑制が解かれ、ヘリックス構造がもつ阻害作用が有効になる結果、典型的な線維形成能が失われると考えた。

第五章では、出来上がった線維自体の構造を NMR を用いた重水素交換実験によって解析した。線維を元の単量体に可溶化し、その後の交換反応をとめて NMR をスペクトルを測定するため、高濃度のジメチルスルフォキシド (DMSO) を用いた。また通常の線維の他に、高塩濃度下で自発的に形成される細く柔軟な形態をした別種の線維に

についても実験を行った。その結果、二種類の線維は異なるコア領域から形成されていること、通常の線維では分子内ジスルフィドが埋もれているのに対し、フィラメントでは溶媒に露出していることが明らかになった。以上のように  $\beta 2m$  の二種類のアミロイド線維は、異なる分子間の相互作用によって形成されていることが明らかになった。

### 論文審査の結果の要旨

本論文では、透析アミロイドーシスの原因となる  $\beta_2$  ミクログロブリンや、牛乳の主成分である  $\beta$  ラクトグロブリンを用いて、蛋白質の非天然状態の構造とダイナミクスを原子レベルで研究した。生体内で蛋白質分子が機能を発揮するのは多くの場合、その天然構造である。しかしながら最近の研究によって、しばしば非天然状態が重要な役割を果たしている場合のあることが明らかになってきた。これらの非天然状態の中で特に注目されているのが、アミロイド線維である。本論文では、 $\beta_2$  ミクログロブリンを材料として核磁気共鳴方法により、アミロイド線維の形成機構と構造安定性をアミノ酸残基レベルで明らかにした。また、 $\beta$  ラクトグロブリンの低温変性状態に特異的な構造の存在することを、核磁気共鳴方法によって明らかにした。本論文は、蛋白質の非天然状態に天然構造とは異なる特異的構造の存在することを示し、またその方法論を確立した独創的なものであり、関連分野に大きく貢献する優れた成果である。よって本論文は博士（理学）の学位論文として十分に価値あるものと認める。