OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Study of pH-dependent conformational change of bovine β-lactoglobulin
Author(s)	櫻井, 一正
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45592
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名	櫻井一正（さくらい かずまさ）
博士の専攻分野の名称	博士（理学）
学位記番号	第 19234 号
学位授与年月日	平成17年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 理学研究科高分子科学専攻
学位論文名	Study of pH-dependent conformational change of bovine β-lactoglobulin （ウシβラクトグロブリンのpHに依存したコンフォメーション変化の研究）
論文審査委員	（主査） 教授 後藤 祐児 （副査） 教授 佐藤 尚弘　教授 中川 敦史

論文内容の要旨

ウシβラクトグロブリン（βLG）はpH 2から8という広い範囲で天然構造をほとんど変化することなく保持している蛋白質であるが、pH の変化に伴い様々な性質が変化することが知られている。これらの性質変化は局所的な構造変化と関連があると考えられるため、アミノ酸残基レベルの構造変化を調べる必要がある。このような観点に基づき、pH 依存的な性質の中でβLG の二量体形成反応、EF ループ構造変化、及びリガンド結合の研究を行った。

熱力学的解析により、二量体形成反応の主要な駆動力を調べた。分析用超遠心機を用い、会合定数の温度依存性を酸性条件下で調べた。測定データの解析から会合反応のΔCp が負であることが分かり、このことから会合の主な駆動力は疎水相互作用であることが分かった。

また、アミノ酸置換法により二量体会合面に存在する各アミノ酸の役割を調べた。βLG 二量体の結晶構造から、会合に重要であると考えられる残基を置換し、それらの影響を超遠心分析で調べた。測定の結果、I ストランドにおけるβシート形成能をなくした変異体では会合定数が減少した。また、AB ループの側鎖の電荷を除いた変異体では会合定数に変化がなく、野生型と逆の電荷を導入した変異体では会合定数の減少が観察された。

これらの結果から、より詳細なβLG の会合メカニズムが分かった。二量体会合に関わる残基には安定化への寄与と特異性の獲得の2つの役割があると考えられる。AB ループでの側鎖間の相互作用は主に特異性の獲得に寄与しており、疎水相互作用はエネルギー的な安定化に寄与している。I ストランドにおけるβシート形成は部位特異的でありかつエンタルピー的に大きな寄与をするため、両方の役割を持っていると考えられる。

続いて、中性 pH におけるβLG の NMR 測定を行った。これまで、中性ではシグナル広幅化によるスペクトルの劣化が起こるため NMR 測定はなされていなかった。そこでβLG 中性 NMR の測定条件検索を行った。様々な条件検討の結果、分子間 SS 結合により二量体構造が安定化した変異体、A34C で高分解能のスペクトルを取得することができた。

A34C 変異体を用いて、EF ループの pH 依存的なコンフォメーション変化を調べた。タンフォード転移はβLG のよく知られた構造変化であり、EF ループの“open”と“closed”と2つの構造間の転移が pH 7 付近で起こる。HSQC シグナルの変化からこの構造変化は非常に遅いことが示唆された。また、“open”と“closed”両方のコンフォメー

ションにおいて、EF ループと隣接する GH ループの間で水素結合が形成されており、この水素結合が EF ループの運動性に寄与していることが示唆された。

更に、中性条件下でβLG と ANS やパルミチン酸との結合を調べた。測定の結果からパルミチン酸はバレルの中に結合することが観察され、結晶構造の結果と一致した。一方、ANS はバレルの入口と二量体会合面の2箇所に結合することが示唆された。これらの結果はβLG の多様な分子への結合能を示しており、このような性質が生体内での機能と関連があるものと考えられる。

論文審査の結果の要旨

βラクトグロブリンは蛋白質の構造安定性やフォールディングの特に重要なモデル蛋白質であるにも関わらず、中性溶液中での原子レベルの研究は進んでいなかった。本論文では、ウシβラクトグロブリンの pH に依存した二量体形成反応と、構造安定性の変化、疎水性分子結合を、さまざまな部位特異的アミノ酸変異体と核磁気共鳴や熱測定などの手法を用いて研究し、それらの分子機構を原子レベルで明らかにした。本論文は、βラクトグロブリンの構造安定性やフォールディング機構の原子レベルでの理解に新たな知見を与える独創的なものであり、関連分野の進展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。