

Title	A study on the folding mechanism of bovine b-lactoglobulin with cysteine mutagenesis
Author(s)	八木, 正典
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/47628
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	八木正典
博士の専攻分野の名称	博士(理学)
学位記番号	第 20888 号
学位授与年月日	平成 19 年 3 月 23 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	A study on the folding mechanism of bovine β -lactoglobulin with cysteine mutagenesis (システイン変異体を用いたウシ β ラクトグロブリンのフォールディング機構の研究)
論文審査委員	(主査) 教授 後藤 祐児 (副査) 教授 奥山 健二 教授 中川 敦史

論文内容の要旨

生体内に存在する種々のタンパク質は、そのアミノ酸の配列に基づき、天然構造と呼ばれる固有の立体構造を形成することで機能を発揮する。ペプチド鎖が天然構造へと折りたたまれるこの過程をタンパク質のフォールディングといい、遺伝情報が正しく発現されるために必要不可欠な過程である。

本研究で用いたウシ β ラクトグロブリン (BLG) は β バレル構造をもつタンパク質であるが、そのフォールディング過程において、過渡的に非天然の α ヘリックスを含む中間体を形成する。BLGは、フォールディング研究におけるモデルタンパク質として、このような興味深い特徴をもつが、変性の可逆性が低いという問題点も知られている。その原因として、BLGに存在するジスルフィド結合を形成していない Cys121 が、変性条件下において2つのジスルフィド結合と交換反応を起こし、不可逆な分子種を生成することが考えられてきた。

本研究では、まず、BLGの変性の可逆性を向上させ、フォールディング研究におけるモデルタンパク質としてより扱いやすくするために、Cys121を置換した変異体、C121A、C121S、C121Vを作製し、それらの構造、安定性、変性の可逆性を調べた。その結果、それぞれの変異体は、野生型とほぼ同じ構造を保ったまま、変性の可逆性が高くなっていることが示された。各変異体の尿素変性に対する安定性は、野生型よりは低くなっているものの、C121Aが野生型に近い安定性をもっていることが明らかになった。これらのことから、Cys121を置換することで、BLGの変性の可逆性の問題を改善でき、特に C121A は最も野生型に近く、野生型の代わりとしてフォールディング研究に用いることの有効性が示された。

次に、C121Aを用いたBLGのフォールディング研究のアプローチとして、C121A二分子をジスルフィド結合でつなぐことで分子サイズを大きくした A34C/C121Aを作製し、そのフォールディング反応初期に起こる現象を単量体のC121Aと比較した。その結果、C121Aのフォールディング反応が十数分で完了するのに比べ、A34C/C121Aでは、完了まで数時間を要する非常に遅いフォールディング反応が観測された。また、A34C/C121Aの変性状態からの再生効率率は、フォールディング反応を行う尿素濃度に依存し、低い尿素濃度においては再生効率が低く、3M程度の尿素の存在が再生効率を高くすることが明らかになった。低い尿素濃度において天然構造に到達できずにトラップされた分子種は、天然構造に近い立体構造をもちながらも、天然構造よりも疎水性表面が多く露出した状態でトラップされ

ていた。さらに、重水素交換パルスラベル法を用いて、フォールディング反応開始後 10 ミリ秒において形成されている中間体の構造を調べたところ、A34C/C121A においても、C121A と同様の疎水性コアが形成されていることが明らかとなった。これらのことから、「大きなタンパク質では、非天然の相互作用が安定化され、フォールディング反応速度が遅くなるが、フォールディング反応初期には近い残基間の疎水相互作用によって小さなタンパク質と同様に構造が形成される。また、中程度の濃度の変性剤の存在が、非天然の相互作用の過度な安定化を防ぎ、変性状態からの再生効率を高くする」というフォールディング機構が示された。

論文審査の結果の要旨

生体内に存在するタンパク質は、そのアミノ酸の配列に基づき、天然構造と呼ばれる固有の立体構造を形成することで機能を発揮する。ペプチド鎖が天然構造へと折りたたまれる過程をタンパク質のフォールディングといい、遺伝情報が正しく発現されるために必要不可欠な過程であるが、その詳細は不明である。本研究では、ウシβラクトグロブリンを用いて、フォールディングの分子機構を研究した。

本研究では、まず、βラクトグロブリンの変性の可逆性を向上させ、フォールディング研究におけるモデル蛋白質としてより扱いやすくするために、遊離のシステイン残基を置換したいくつかの変異体を作製し、それらの構造、安定性、変性の可逆性を調べた。その結果、遊離のシステイン残基を除去することで、変性の可逆性が大幅に改善することを明らかにした。

次に、βラクトグロブリン二分子をジスルフィド結合でつないで二量体化した変異体を作製し、フォールディング反応に対する影響を調べた。その結果、二量体化した変異体のフォールディング速度がきわめて遅いこと、変性剤濃度を低くすると天然構造に到達できずにトラップされた分子種の生じることを明らかにした。さらに、重水素交換パルスラベル法を用いて、フォールディング反応の分子機構を残基レベルで明らかにした。

本論文は、フォールディングを困難にする因子を同定すると共に、それらを解消して変性状態からの再生効率を高くする方法を明らかにした独創的なものであり、関連分野に貢献する優れた論文である。よって、本論文は博士（理学）の学位論文として十分価値のあるものと認める。