



Title	Investigation of Folding Dynamics of Single Proteins
Author(s)	木下, 雅仁
Citation	大阪大学, 2008, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/48778
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	木下 雅仁
博士の専攻分野の名称	博士(理学)
学位記番号	第 21779 号
学位授与年月日	平成 20 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	Investigation of Folding Dynamics of Single Proteins (单一蛋白質分子の折り畳み運動の研究)
論文審査委員	(主査) 教授 後藤 祐児 (副査) 教授 原田 明 准教授 高橋 聰

論文内容の要旨

本論文では、蛋白質の折り畳みにおける協同性の起源について明らかにすることを目指した。特に、バルクの測定から協同性を解析することは困難であるため、一分子の蛋白質の折り畳み運動を観測する新規手法を開発し、協同性に関する知見を得た。

第二章では、酵母由来シトクロム *c* (cyt *c*) の折り畳み過程についてバルクの測定を行った。測定には、cyt *c* の 102 番目と 66 番目のシステインに蛍光色素 Alexa532 を修飾した試料 (C102-FL, E66C-FL) を用いた。Alexa532 の蛍光強度はシトクロム *c* の持つ補欠分子族であるヘムとの距離に応じて変化した。C102-FL と E66C-FL について、グアニジン塩酸塩 (Gdm) を用いた平衡変性実験や速度論的実験を行った結果、cyt *c* は平衡論的に天然状態 (N)、中間体 (I)、変性状態 (U) の三状態を持つことを明らかにした。さらに、cyt *c* の速度論的な折り畳み機構について議論した。

第三章では、一分子の折り畳み運動を基板に固定化することなく数百ミリ秒の時間にわたって連続して観測することが可能な新しい一分子測定手法を開発した。さらに、C102-FL の折り畳み転移を一分子測定した。U 状態での蛋白質の運動について知見を得るために、一分子測定で得られた蛍光強度分布の広幅化の解析と自己相関解析を行った。その結果、U 状態では、蛋白質はミリ秒程度の時間スケールで運動することが示された。このことから、C102-FL の U 状態は完全なランダムコイルではなく、ヘムへの誤配位や、疎水性残基間の相互作用などによる部分構造の形成や崩壊に対応する遅い運動を示すことが示唆された。

第四章では、C102-FL の一分子測定で得られた結果を詳細に検討するために、Alexa532 をグルタチオンに修飾した G-Alexa の蛍光サイクルと自己相関関数との関連を検討した。G-Alexa の飽和挙動から三重項状態の自己相関関数への影響が示唆された。そのため、三重項状態の緩和を早める試薬 Trolox を用い G-Alexa の一分子測定を行った。その結果から C102-FL で得られた自己相関関数は、主にヘムによる三重項状態の消光とヘムと Alexa532 間の距離の変化によるものであることを確認した。

第五章では、折り畳みにおける協同性の起源にさらに迫るために、今後の装置の改良の可能性について議論した。

本論文で観測された C102-FL の U 状態内での運動と状態間変化の時間スケールは近く、U 状態内での運動が状態変化に直接関係することが示唆された。このことから、状態変化に近い時間スケールの運動が、蛋白質の構造形成に重要な相互作用の形成に寄与し、折り畳みにおける協同的を生み出すのではないかと提案した。今後、第五章で論じた装置改良により、折り畳みにおける協同的の起源に迫ることができると考えられる。

論文審査の結果の要旨

蛋白質の協同的な折り畳みの分子機構を明らかにすることは、蛋白質の構造や機能の理解に重要である。しかしながら、バルクの測定から折り畳みの協同性について解析することは困難である。本論文では、一分子の折り畳み運動を観測して、蛋白質の折り畳みにおける協同性の起源について明らかにすることを目指した。

まず、酵母由来シトクロム *c* (cyt *c*) の折り畳み過程についてバルクの測定を行った。cyt *c* の 102 番目と 66 番目のシスイティンに蛍光色素 Alexa532 を修飾した試料 (C102-FL, E66C-FL) を用いた。Alexa532 の蛍光強度はシトクロム *c* の持つ補因子ヘム間の距離に応じて変化した。C102-FL と E66C-FL について、平衡変性実験や速度論的実験を行った結果、cyt *c* は折り畳みの過程において天然状態 (N) 、中間体 (I) 、変性状態 (U) の三状態を持つことを明らかにした。つぎに、一分子の折り畳み運動を基板に固定化することなく数百ミリ秒の時間連続して観測することが可能な新しい一分子測定手法を開発した。C102-FL の一分子測定の結果から、蛋白質は U 状態でミリ秒程度の時間スケールで運動していることを明らかにした。このことから、C102-FL の U 状態は完全なランダムコイルではなく、ヘムへの誤配位や、疎水性残基間の相互作用などによる部分構造の形成や崩壊に対応する遅い運動を示すことが示唆された。また、Alexa532 をグルタチオンに修飾した G-Alexa の蛍光サイクルと自己相關関数との関連を検討した。折り畳みにおける共同性の起源にさらに迫るべく、装置の改良についても議論した。

本論文は、一分子の折り畳み運動を観測する新たな一分子測定手法を開発し、それを用いて U 状態の運動を明らかにした画期的な論文である。よって、本論文は博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。