

論文審査の結果の要旨

氏名 中尾 正治

この論文では、イヌ・ミルク・リゾチームについて、①円二色性 (CD) とトリプトファン残基の側鎖の蛍光をプローブとした、平衡条件下におけるアンフォールディング転移と、巻き戻りの速度過程の測定、②CDを用いた、巻き戻りの過程において観測される中間体の構造の特定とフォールディング過程の解析、について二章に分けて述べられている。

蛋白質のフォールディングはDNAからの転写、翻訳を経て得られたアミノ酸の一次配列が生体内で「蛋白質」としての機能を持つ天然の特異的な三次元立体構造に変換される物理化学的過程であり、遺伝情報発現の最終段階と考えることができる。

平衡条件下における変性剤によるアンフォールディング転移が様々な蛋白質で測定された結果、主鎖二次構造が天然構造類似で分子形態はコンパクト、さらに分子内部の側鎖のタイトなパッキングが失われているという共通特徴を持つ中間体が観測された。この中間体のことは「モルテン・グロビュール状態」と呼ばれるようになった。さらに、このモルテン・グロビュール状態が、様々な蛋白質における巻き戻りの速度過程の初期に蓄積する中間体であることが、実験の結果から示唆されている。

イヌ・ミルク・リゾチームの平衡条件下における熱変性実験の結果から、このリゾチームは熱変性の過程において、構造が類似している他のリゾチームや α ラクトアルブミンと比較して、より安定でかつより天然構造類似なモルテン・グロビュール中間体を形成することが知られている。一方、他のリゾチームや α ラクトアルブミンについて、変性剤である塩酸グアニジンを用いた平衡状況下でのアンフォールド実験で観測されるモルテン・グロビュール中間体の構造と、アンフォールド状態からの巻き戻し実験で観測される中間体の構造が一致することも知られている。

このような現状から本論文では、(1)熱変性実験で観測されたより天然条件に近いモルテン・グロビュール中間体が、塩酸グアニジンを用い

た平衡条件下でのアンフォールド実験においても観測されるかどうか、また、(2)もし観測されるのならば、巻き戻し実験で観測されるであろう中間体と構造の面でどのような関係があるのかという問題に対する研究を行っている。

第一の問題に対して、222 nm、295 nmのCD、370 nm以上の蛍光強度、350 nm付近の蛍光強度の4つをプローブとして、平衡条件下におけるイヌ・ミルク・リゾチームのアンフォールディング転移曲線を測定した。その結果、明らかに二段階の転移が存在することがわかった。得られた4つの転移曲線を解析するために、三状態モデルを仮定して、平衡条件下での変性状態に対する天然状態、中間体の自由エネルギー変化を見積もることが出来た。結果、イヌ・ミルク・リゾチームの中間体は、同じ溶液条件で測定したウマリゾチームやウシの α ラクトアルブミンと比較して、非常に安定であることが明らかになった。

第二の問題に対して、イヌ・ミルク・リゾチームのフォールディング反応を測定した。結果、装置の不感時間内に形成されるバーストフェーズ中間体とは別に222 nmのCD値にオーバーシュートを生じさせる別の中間体の存在することがわかった。これは、バーストフェーズ中間体のみしか観測されないウマリゾチームや α ラクトアルブミンでは見られなかった現象である。観測された二つの中間体をより特徴づけるために、フォールディング反応を、CDをプローブとして10個の波長で測定を行った。結果、平衡条件下における中間体の構造は、巻き戻りの速度過程におけるバーストフェーズ中間体と類似していることがわかった。さらに、得られた速度過程における各中間体のスペクトルから、バーストフェーズ中間体から速度過程における中間体への相、および速度過程における中間体から天然状態への相のそれぞれにおける差スペクトルを得ることが出来た。前者の相においては、二次構造成分の再構成とチロシン残基やトリプトファン側鎖の周りの環境が非対称になっていく過程であることがわかった。一方後者の相では、エキシトンカップリング時に見られるスペクトルが得られた。このことから、この相においてトリプトファン側鎖のパッキングが起こっていると推測される。

本論文では、イヌ・ミルク・リゾチームが非常に安定な平衡論的中间体を形成し、さらに、巻き戻りに関してバーストフェーズ中間体以外の

速度論的中間体を経ることを世界で初めて測定した。同じ構造ファミリー内でこのような現象は今まで観測されなかったため、本論文の結果が一般のフォールディング機構の解明に大きく寄与するものである。

この論文の第三章は、新井宗仁博士、小柴琢己博士、新田勝利教授、桑島邦博教授との共同研究、第四章は、榎互介博士、新井宗仁博士、小柴琢己博士、新田勝利教授、桑島邦博教授との共同研究であるが、論文提出者が主体となって研究を行ったもので、提出者の寄与が十分であると認められる。従って審査員一同は同提出者に博士（理学）の学位を授与出来ると判断する。