

論文審査の結果の要旨

氏名 友寄 克亮

本論文は3章からなる。第1章は全体的な序論で、蛋白質のフォールディング問題、とくにフォールディング過程の主要な中間体であるモルテン・グロビュール構造について概説されている。第2章は本論で、研究の目的について述べた「緒言」、実験で用いた試料と方法について述べた「試料および方法」、実験結果の詳細について述べた「結果」、実験結果についての考察を行った「考察」から構成されている。第3章は結論で、本論文の結論がまとめられている。

本論文で研究の対象となっている α ラクトアルブミンは123残基、分子量およそ1,4000のカルシウム結合蛋白質である。X線結晶構造解析により構造はすでに明らかになっており、2つのドメイン、すなわち、 α ドメインと β ドメインから構成されている。 α ドメインは主に4本の α ヘリックスからなり、 β ドメインは一連のループ構造と3本の反平行 β ストランドで構成されている。

本論文において、論文提出者は、ヤギ α ラクトアルブミンのN末端残基がその構造の熱力学的安定性とフォールディングおよびアンフォールディングの速度過程に及ぼす影響を定量的に調べる研究を行った。N末端の残基が異なる蛋白質として、真性体、組換え体、 $\Delta E1$ 変異体の3種類が用いられた。真性体は新鮮なヤギ乳から抽出・精製されたヤギ α ラクトアルブミン蛋白質である。組換え体は大腸菌で大量発現させたヤギ α ラクトアルブミン蛋白質で、N末端に余分なメチオニン残基(Met)が付加されている。 $\Delta E1$ 変異体は大腸菌で大量発現させたヤギ α ラクトアルブミン蛋白質であるが、真性体のN末端のグルタミン酸残基(Glu)をMetに置換したアミノ酸配列をもつ。

論文提出者は、これら3種類の蛋白質の塩酸グアニジンによるアンフォールディング転移の平衡論的解析、アンフォールディングおよびフォールディング反応の速度論的解析を行った。また、N末端残基の違いが Ca^{2+} 結合に及ぼす影響を調べるために、 Ca^{2+} 存在下(ホロ型)および Ca^{2+} 非存在下(アポ型)で同様の解析を行った。構造の転移は遠紫外および近紫外の波長における円二色性(CD)により測定された。また、速度論的解析は混合時間が25ミリ秒のストップフロー装置を使用して行われた。

N末端のアミノ酸残基が異なる3種類の蛋白質を用いた実験および解析から、論文提出者が明らかにしたことは以下のとおりである。(1)アンフォールディング

グのストップフローCDによる解析から、N末端残基の違いによらず、アンフォールディングにおいてもバースト相が存在することをはじめて明らかにした。そして、バースト相がアンフォールディングの初期中間体 (I_N) によってもたらされていることを示した。(2) フォールディングおよびアンフォールディングのストップフローCDによる解析から、ヤギ α ラクトアルブミンのフォールディング過程は、N末端残基によらず、変性状態 (U) からフォールディング中間体 (I_D) とアンフォールディング中間体 (I_N) を経て天然状態 (N) へ転移する逐次的四状態モデルに従うことを明らかにした。また、フォールディングおよびアンフォールディングの速度は2つの中間体の間に存在する遷移状態 (\ddagger) によって律速されることを示した。(3) N末端部位の ϕ 値解析の結果から、アポ型のN末端部位の各状態の安定化エネルギーレベルはホロ型に比べて高く、ホロ型とアポ型の構造形成安定化の開始部位が異なることを明らかにした。(4) 組換え体は真性体よりも熱力学的な構造安定性は低い、 $\Delta E1$ 変異体では安定性が回復し、その安定性は真性体に酷似していることを明らかにした。また、見かけの速度定数の塩酸グアニジン濃度依存性 (シェブロンプロット) の測定結果から、 $\Delta E1$ 変異体はフォールディングおよびアンフォールディングの速度論的描像も真性体と酷似していることを示した。

以上のように、論文提出者は、N末端アミノ酸残基がヤギ α ラクトアルブミンの構造の安定性とフォールディングに及ぼす影響を詳細に調べ、真性体のN末端のGluをMetに置換した $\Delta E1$ 変異体の構造の安定性とフォールディングの性質が真性体と酷似していることをはじめて明らかにした。この結果はヤギ α ラクトアルブミンのフォールディング機構を調べる研究において $\Delta E1$ 変異体が良い擬似野生型蛋白質となり得ることを意味する。したがって、蛋白質のフォールディングの研究を進める上で重要な足跡を残したといえる。

なお、本論文は中村敬、佐伯喜美子、榎互介、桑島邦博との共同研究であるが、論文提出者が主体となって実験、解析及び考察を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士(理学)の学位を授与できると認める。