

論文審査の結果の要旨

氏名 なかにひろやす 仲谷博安

本博士論文は3章から成っており、英語で書かれている。第1章は序論であり、Anfinsen や Levinthal 以来のタンパク質のフォールディング機構に関する研究のレビューおよび本研究の目的と意義について述べられている。第2章は本論であり研究対象であるイヌ・ミルク・リゾチームのリフォールディングとアンフォールディングの平衡論と速度論に関し、試料の作成と実験手法、実験結果および考察が述べられている。第3章は結論である。

本研究では、イヌ・ミルク・リゾチーム (129 残基、分子量約 14500 の Ca^{2+} 結合蛋白質) のモルテングロビュール (MG) 状態がそのフォールディング反応においてどのような役割を果たすかを明らかにすること、さらに、 Ca^{2+} のフォールディング反応への影響について解明するため、ホロ型 (10 mM CaCl_2 存在下) とアポ型 (EGTA 2 mM 存在下) 蛋白質の GdnHCl によるアンフォールディング反応の平衡論的解析とリフォールディング/アンフォールディング反応の速度論的解析を行った。

近紫外、遠紫外領域の CD (円二色性) およびトリプトファンの蛍光をプローブとして、ホロ型およびアポ型の平衡論的アンフォールディングを測定した。アポ型では二段階の転移が観測されたため、解析では、N 状態、U 状態及び MG 状態の蓄積を仮定する三状態モデルを用いた。解析結果は、実験結果とよく一致した。ホロ型のアンフォールディング転移は、見かけ上二状態的であったが、わずかに中間体を蓄積する三状態モデルの方が実験結果とより一致し、またアポ型の結果とも整合性があった。X 線結晶構造を観察すると、この蛋白質では α ドメインと β ドメインの間にある深いクレフトによって両ドメインが分断されており、それぞれが独立してアンフォールドするためにホロ型およびアポ型で三状態的な挙動を示すと考えられる。

リフォールディング反応をストップフローCD法を用いて測定した。両方の型の蛋白質とも、リフォールディング反応は一つの指数関数で表され、反応曲線を時間ゼロに外挿した CD 値と平衡測定の結果から予測される U 状態の CD 値との間に大きな差(バースト相)が観測された。これは装置の不感時間内に、バースト相中間体(I_B)が蓄積することを意味している。また、 I_B の転移曲線はホロ型とアポ型で一致した。この結果は、 I_B は Ca^{2+} と結合しないことを示す。また二状態モデルで解析した I_B と U 状態との自由エネルギー差はアポ

型の MG 状態と U 状態との自由エネルギー差と一致し、 m 値も一致した。このことは I_B がアポ型の MG 状態と同一であることを示している。ホロ型とアポ型ではリフォールディングの機構は共通であり、MG 状態と同一の中間体を經由するスキームで表される。

アンフォールディング反応をストップフローCD法を用いて測定した。ホロ型のアンフォールディング反応は、一つの指数関数で表され、バースト相も見られなかった。これに対して、アポ型のアンフォールディング反応では、バースト相と単一指数関数的な反応曲線が観測された。また、アンフォールディング反応の速度定数に、GdnHCl 濃度依存性が殆ど認められなかった。ここから示唆されるアポ型において天然状態が不均一であるスキームを確認するため、様々な遅延時間でのダブルジャンプ実験を行った。その結果、全ての反応曲線は一つの指数関数で表され、その速度定数はアンフォールディング時間によらず不変であり、この速度定数はリフォールディング反応の速度定数と一致した。また指数関数相の変化量のアンフォールディング時間依存性を調べると、これは同濃度の GdnHCl におけるアンフォールディング速度定数の値と天然状態の不均一性を含むスキームから予測される値とよく一致した。これはアポ型では天然状態が不均一であることを示しており、 α -ラクトアルブミン/リゾチームファミリーでは初めて観測された事実である。

ホロ蛋白質について平衡論測定の m_{IU} 、 m_{NU} 値および速度定数の変性剤濃度依存性から求められる遷移状態の m 値を用いて中間体および遷移状態での構造形成度を求めたところ、遷移状態での構造形成度はファミリー蛋白質で最も大きいことが判明した。さらに構造形成度は中間体から遷移状態にかけて大きくなり、これは U 状態から MG 状態、遷移状態そして N 状態の順に構造形成が進むことを示していた。

Ca^{2+} 結合部位の Φ 値を求めたところ、-0.15 となった。このことは、フォールディング反応の遷移状態では Ca^{2+} 結合部位の構造が形成されていないことを示している。イヌ・ミルク・リゾチームと配列の相同性があるウシ α -ラクトアルブミンでは、 Φ 値は 0.76 であり、遷移状態において Ca^{2+} 結合部位は構造形成していると考えられる。これらの結果は、同じファミリーに属する相同な蛋白質間でフォールディングの過程が異なることを示している。この様な例は今までほとんど報告されていない。

なお、本論文第2章は、友田修司、榎亘介、佐伯喜美子、相沢智康、出村誠、河野敬一、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分析及び検証を行ったもので、論文提出者の寄与が充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。