

(別紙様式第3号)

学位論文要旨

氏名: 石丸隆行

題目: Conversion to thermostable form (S-OVA) and role of disulfide bridge in the stability and structural integrity of ovalbumin evaluated by approach using a site-directed mutagenesis
部位指定変異体を使ったOVAの熱安定型 (S-OVA) への転換及び構造安定化に
及ぼすジスルフィド結合の評価

鶏卵白アルブミン (OVA)はアセチル基、リン酸基、S-S結合そしてN型糖鎖で翻訳後修飾されている。また、OVAにのみ起こる翻訳後修飾として、有精卵では孵化時の、無精卵では貯蔵中のOVAで観察されているこの現象は、構造変化を伴わずに熱安定型 (S-OVA)へ転換することである。本研究ではS-OVAへの転換機構、そしてS-S結合の役割を部位指定変異体を用いて評価・解析した。

OVAは有精卵では孵化の時に、無精卵では貯蔵中に熱安定型(S-OVA)へと転換する。この現象はin vitroのアルカリ条件下でも再現できる。現在までこの詳細な転換機構はわかっていないが、2003年にS-OVAの結晶構造解析が報告され、Ser-164, 236, 320残基がL型からD型へ転換していることが報告された。しかしながら、これらラセミ化と熱安定化との直接的な関係は不明であった。本実験ではS-OVAの形成にSer残基のL型からD型への転換が寄与しているかどうかを調べることを目的とした。

Ser残基をAla残基に置換したS164A, S236A, S320Aを構築し、大腸菌発現系を用いて精製した。精製後、アルカリ処理を行ったところ、S236Aは野生型と同程度熱安定性を示したのに対し、S164A及びS320Aは野生型の半分程度しか熱安定化しなかった。そこで両部位をAlaで置換した変異体S164/320Aを構築し、アルカリ処理前後の熱安定性(Tm値)を測定した結果、S164/320Aは全く熱安定化しなくなった。この結果より、Ser-164及びSer-320残基のL型からD型への転換がS化と直接関与していることが示唆された。

そこでD型への転換が熱安定化にかかわるメカニズムを解明することに着手した。Ser-164近傍のArg-142残基に着目し、ArgをAlaに置換したR142Aを構築し、精製した。精製後、アルカリ処理を行った結果、野生型の半分程度しか熱安定化しなかった。この結果より、アルカリ処理によりSer-164がD型に転換してArg-142と相互作用することで熱安定化することが示唆された。このことを検証するため、S320Aと組み合わせたダブルミュータントR142A/S320Aを構築し、アルカリ処理を行った。熱安定性を測定すると全く熱安定化しなくなった。この結果はD型へ転換したSer-164とArg-142が相互作用することで熱安定化に関与していることを示唆した。これらの結果から、OVAのS化は、まずSer-164及びSer-320がL型からD型へ転換し、次いでSer-164がArg-142と相互作用することで起きることが明らかになった。

OVAは6つのCys残基 (Cys-11, 30, 73, 120, 367, 382) を持っており、その内Cys73-Cys120残基の間でS-S結合を形成している。過去の研究で、還元アルキル化処理したOVAが熱安定性の低下、プロテアーゼ感受性の変化、及びS-OVA形成能の喪失を起こすことが示されている。しかし、このような化学修飾はしばしばその構造に影響を及ぼす。そこで本実験ではS-S結合を形成しているCys残基をAla残基に置換した変異体C73A, C73S, C120A, C73/120Aを構築し、OVAにおけるS-S結合の役割を検証することにした。

CD, トリプトファン蛍光を用いて野生型と構造を比較したところ、すべての変異体で2次構造に変化は見られなかったが、C73Aのみ3次構造に変化が観察された。次にCDによる222 nmでの楕円率の変化からTm値を求めたところ、C73S, C120A, C73/120Aは、DTTでS-S結合を還元した野生型のTm値と同程

度だったのに対し、C73Aの熱安定性は大きく低下していた。一方、S-S結合がS-OVAへの転換に関与しているか調べるため、アルカリ処理を行ったところ、C73A以外の変異体はすべてS型へと転換した。さらにS-S結合の切断によるタンパク質構造のフレキシビリティを調べるため、OVAの特定の部位を特異的に切断することが知られているエラスターゼに対する感受性を調べた。これら変異体は、野生型と比較して新たに切断箇所が増えていることが分かった。また、還元、非還元状態でSDS-PAGEを行ったところ、変異体はnon-nativeなS-S結合を形成していることが分かった。この部位を同定するため、エラスターゼ消化後、SDS-PAGE、ペプチドマッピング法を用いて調べた結果、Cys11-Cys30で新たにS-S結合を形成していることが分かった。しかしながら、このnon-nativeなS-S結合は熱安定化には寄与しないことが分かった。

以上の結果から、S-S結合を形成しているCys残基を置換すると、新たにnon-nativeなS-S結合が形成され、このS-S結合は熱安定性、プロテアーゼ感受性には関与していなかった。さらにOVA由来のS-S結合はS-OVAの形成には直接関与しないことが示唆された。