

学位論文審査の結果の要旨

氏名	石丸 隆行
審査委員	主査 阿座上 弘行 (印) 副査 小崎 紳一 (印) 副査 森 信寛 (印) 副査 澤 嘉弘 (印) 副査 松下 一信 (印)
題目	Conversion to the 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て評価したオボアルブミンの熱安定型 (S-OVA) への転換及び構造安定性におけるジスルフィド結合の役割)
<p>鶏卵白アルブミン (OVA) は卵白中に多量存在しているタンパク質であるが、その生理的意義はいまだにわかっていない。OVA は合成される際、アセチル化、リン酸化、SS 結合そして N 型糖鎖で翻訳後修飾される。また、OVA にのみ起こる翻訳後修飾として、有精卵では孵化時に、無精卵では貯蔵中に構造変化を伴わずに熱安定型 (S-OVA) への転換がある。本研究ではその翻訳後修飾の一つである S-OVA への転換機構、そして SS 結合、SH 基の構造安定化への役割を調べた。</p> <p>OVA は S-OVA へ転換することが知られており、その転換はアルカリ処理で再現できる。2003 年に S-OVA では Ser-164, 236, 320 残基がラセミ化していることが報告されたが、熱安定化との直接的な関係は不明であった。そこで、第 1 章では、S-OVA の形成に Ser 残基のラセミ化が寄与しているかどうかを調べた。S164A, S236A, S320A を構築し、アルカリ処理前後の熱安定性を調べた。S236A は野生型と同程度熱安定性を示したのに対し、S164A, S320A はアルカリ処理後、野生型の半分程度しか熱安定化しなかった。さらに、S164/320A では熱安定性の上昇が見られなかった。この結果より、Ser-164 及び Ser-320 残基のラセミ化が S-OVA への転換と関与していることが示唆された。DSer-164 と相互作用する部位として、近傍の Arg-142 残基に着目し、R142A を構築した。アルカリ処理後、R142A は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、Ser-164 と Arg-142 が相互作用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 R142A/S320A を構築した。アルカリ処理前後の熱安定性を測定すると、全く熱安定化しなくなった。以上の結果から、OVA の S-OVA への転換は Ser-164 及び Ser-320 がラセミ化し、次いで Ser-164 が Arg-142 と相互作用することで起きること</p>	

を明らかにした。

OVA は 6 つの Cys 残基 (11, 30, 73, 120, 367, 382) を持っており、その内 Cys-73 と Cys-120 間で SS 結合を形成している。第 2 章では、SS 変異体 C73A, C73S, C120A, C73/120A を構築し、OVA における SS 結合の構造安定性に及ぼす役割を検証した。構造を野生型と比較したところ、C73A のみ 3 次構造に変化が観察された。変性転移点を測定したところ、C73S, C120A, C73/120A は、SS 結合を還元した野生型の T_m 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。さらにエラストラーゼに対する感受性を調べたところ、変異体は新たに切断箇所が増えていた。還元、非還元状態での SDS-PAGE の結果、non-native な SS 結合を形成していた。この部位を同定すると、Cys-11 と Cys-30 で新たに SS 結合を形成していた。しかし、この non-native な SS 結合は熱安定性には寄与していなかった。SS 結合が S-OVA への転換に関与しているか調べたところ、SS 結合は S-OVA への転換に関与していなかった。以上の結果から、SS 結合を形成している Cys 残基を置換すると、エラストラーゼ感受性が変化すること、新たに non-native な SS 結合が形成され、この SS 結合は熱安定性には関与しないことを明らかにした。さらに、その non-native な SS 結合は S-OVA の形成には直接関与しないことを明らかにした。

OVA には Free の SH 基が 4 つ (Cys-11, 30, 367, 382) 存在するが、その役割が分かっていない。そこで、第 3 章では、その Free の SH 基の役割を調べた。変異体 C11A, C30A, C367A, C382A を構築した。構造、エラストラーゼ感受性、SS 結合の位置は野生型と同じであったが、熱安定性が少し上昇していた。次に Refolding を調べたところ、C30A のみ refold しなかった。さらに SS 結合の再形成を調べたところ、C30A のみ SS 結合が再形成されにくかった。以上の結果より、Cys-30 が構造形成の際、鍵となることを明らかにした。

以上のように、本論文では、アミノ酸の D 体化がタンパク質の熱安定性の直接の要因であることを明らかにし、さらに OVA 本来の SS 結合の欠損は新しい SS 結合の形成を導くが、構造安定性などに関与しないことを明らかにした。さらに、Free の SH 基が構造形成に大切であることも明らかにした。よって本研究により、タンパク質の新しい熱安定化機構を証明するとともに、SS 結合による熱安定化効果、タンパク質の folding などのタンパク質工学としての基礎研究と共に、タンパク質の熱安定化などの産業的に利用できる応用研究としても高く評価される結果をあげていると判断した。