

氏名	やま さき まさ ゆき 山 崎 正 幸
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学位記番号	農 博 第 1273 号
学位授与の日付	平成 14 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	農学研究科応用生命科学専攻
学位論文題目	Studies on the Conformational Transition of Ovalbumin into Thermo-stabilized Forms (Ovalbumin の熱安定化型へのコンフォメーション変化に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教授 廣瀬 正明 教授 池田 篤治 教授 北 畠 直文

### 論 文 内 容 の 要 旨

卵白タンパク質の主成分である Ovalbumin は、その熱安定性に関し 2 つのユニークな性質を持つ。すなわち、鶏卵を長期間貯蔵すると、ゲル化性、起泡性などの食品機能特性が顕著に低下するが、その主な原因は、卵白タンパク質の 50% 以上を占める Ovalbumin が貯蔵中に熱安定化した分子に変換され、その熱変性温度が 8°C 上昇することによる。この熱安定化に際しては、タンパク質主鎖のペプチド結合の切断がおこらないため、Ovalbumin のコンフォメーション変化が重要な役割を果たす可能性が指摘されてきた。一方、本タンパク質のアミノ末端から 339 番目のアミノ酸残基であるアルギニンをトレオニンに置換した Ovalbumin 精変異体 R339T は、そのペプチド結合 Ala352-Ser353 がエラスターゼの作用により切断を受け、熱変性温度が 16°C 上昇することが知られている。本論文では、Ovalbumin に関するこれら 2 つの熱安定化現象に着目し、従来不明であった熱安定化の分子構造機構を解明するため、X 線結晶構造解析を中心とした詳細な研究が行われている。主な研究成果は次のとおりである。

1. 鶏卵の貯蔵中におこる Ovalbumin の熱安定化とコンフォメーション変化の関係について明確な結論を得ている。鶏卵の貯蔵中には卵殻から炭酸ガスが蒸散し、卵白の pH が上昇することが Ovalbumin の熱安定化の誘因となることが知られている。そこで卵白から精製した Ovalbumin を試験管内で比較的温和なアルカリ条件下 (pH9.9, 30°C) に 1 週間インキュベートし、熱安定化 Ovalbumin を調製し、実験に供している。まずこの標品を用いたペプチド化学分析を行い、熱安定化に際してジスルフィド結合の変換がおこらないことを証明している。ついで、本タンパク質の X 線結晶構造解析を行うため、沈殿剤として硫酸アンモニウムを使った蒸気拡散法により良質の単結晶を調製し、X 線回折データを収集後、分子置換法により位相を決定している。構造モデルの精密化をくり返し行い、分解能が 2.0 Å, R 値が 0.194 のレベルで全立体構造を解くことに成功している。この熱安定化型 Ovalbumin の立体構造を、すでに報告のある熱安定化前の Ovalbumin の立体構造と比較することにより、コンフォメーションが変化する部位を詳細に解析している。その結果から、熱安定化には 2 つの構造部位のコンフォメーション変換、すなわち strand 2A 上にある Phe99 側鎖の反転、並びに helix E と strand 1A を結ぶループ部位のタンパク質分子外側への開きに伴う Arg126 側鎖の溶媒への露出が重要な役割を果たすと結論している。
2. エラスターゼの作用によりペプチド結合の切断をうけた熱安定化型の Ovalbumin 変異体 R339T の立体構造を X 線結晶構造解析により決定している。まず、本 Ovalbumin 変異体の遺伝子を大腸菌で発現・精製し、エラスターゼ処理によりペプチド結合 Ala352-Ser353 が特異的に切断を受けた熱安定化型分子を調製した後、沈殿剤として硫酸アンモニウムを用いた蒸気拡散法により良質の単結晶を得ている。この結晶を用いて X 線回折データの収集と重原子置換法による位相の決定を行った後、モデルの精密化をくり返し、分解能が 2.3 Å, R 値が 0.199 のレベルで全立体構造の決定に成功している。また、この立体構造の特徴を詳細に観察することにより、エラスターゼの切断によるコンフォメーション変換の実体を明確にしている。すなわち、15 個のアミノ酸残基からなるポリペプチドセグメント Gly338-Ala352 がエラスターゼの切断前にはコア構造部位から独立したループ部位に位置するのに対し、切断後にはコア構造の中心に位置する  $\beta$ -sheet A 上の

strand 3A と strand 5A の間に挿入されて strand 4A を形成し、より安定なコンフォメーションに移行することを明確にしている。

3. Ovalbumin は Serpin (serine proteinase inhibitor) と構造上の相同性をもつ。そこで上記 2 つの熱安定化型 Ovalbumin の結晶構造を、Serpin の立体構造と比較し、Ovalbumin における熱安定化の機構を検討している。その結果、鶏卵の貯蔵中に生成する熱安定化型 Ovalbumin およびペプチド結合の切断をうけた熱安定化型 Ovalbumin の立体構造は、おのおの Serpin と Proteinase 間の迅速平衡複合体および共有結合複合体の立体構造に相当することを見出している。Serpin の系では、細胞内でのタンパク質立体構造の形成が準安定な状態にとどまると考えられているため、Ovalbumin における 2 つの熱安定化現象は、いずれも準安定な構造状態から、より安定な状態への移行過程に相当するとの機構を提唱している。

### 論文審査の結果の要旨

鶏卵を長期間貯蔵すると食品機能特性が顕著に低下するが、その主な原因は、卵白タンパク質の50%以上を占める Ovalbumin が熱安定化型分子に変換され、その熱変性温度が 8°C 上昇することによる。一方、本タンパク質のアミノ末端から 339番目のアミノ酸残基であるアルギニンをトレオニンに置換した Ovalbumin 変異体 R339T は、そのペプチド結合 Ala352-Ser353 がエラスターゼにより切断を受けると、熱変性温度が 16°C 上昇することが知られている。本論文では、Ovalbumin に関するこれら 2 つの熱安定化現象の分子構造機構を解明するため、X 線結晶構造解析を中心とした詳細な研究が行われている。評価すべき主な点は次のとおりである。

1. 鶏卵の貯蔵中には卵殻から炭酸ガスが蒸散し、卵白の pH が上昇することが Ovalbumin の熱安定化の誘因となる。そこで卵白から精製した Ovalbumin を比較的温和なアルカリ処理により調製した熱安定化型 Ovalbumin を用い、構造特性を解析した。まず、ペプチド化学分析により Ovalbumin の熱安定化に際してジスルフィド結合の変換がおこらないことを証明するとともに、本タンパク質の X 線結晶構造解析を行い、分解能を 2.0 Å、R 値を 0.194 のレベルで全立体構造を解くことに成功した。この熱安定化型 Ovalbumin の立体構造を熱安定化前の Ovalbumin の立体構造と比較することにより、熱安定化には 2 つの構造部位のコンフォメーション変換、すなわち strand 2A 上にある Phe99 側鎖の反転、並びに helix E と strand 1A を結ぶループ部位に位置する Arg126 側鎖の溶媒への露出が重要な役割を果たすとの結論を得た。

2. エラスターゼの作用によりペプチド結合の切断をうけた熱安定化型の Ovalbumin 変異体 R339T の X 線結晶構造解析を行い、分解能が 2.3 Å、R 値が 0.199 のレベルで全立体構造の決定に成功した。また、この立体構造の観察結果から、エラスターゼの切断によりループ部位に位置するポリペプチドセグメント Gly338-Ala352 が Ovalbumin のコア構造部位の中心に位置する  $\beta$ -sheet A 上の strand 3A と strand 5A の間に挿入され、安定なコンフォメーションに移行することを明らかにした。

3. Ovalbumin は Serpin と構造上の相同性をもつ。そこで上記 2 つの熱安定化型 Ovalbumin の結晶構造を、Serpin の立体構造と比較した結果、鶏卵の貯蔵中に生成する熱安定化型およびペプチド結合の切断をうけた熱安定化型の立体構造は、おのおの Serpin と Proteinase 間の迅速平衡複合体および共有結合複合体の立体構造に相当することを見出し、Ovalbumin における 2 つの熱安定化現象は、いずれも準安定な状態からの構造安定化過程に相当するとの機構を提唱した。

以上のように、本論文は卵白タンパク質の主要成分である Ovalbumin の熱安定化の構造機構について重要な結論を示したもので、食品分子構造学、構造生物学、タンパク質化学に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成14年2月18日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。