

氏名	ありいやすひろ 有井康博
学位(専攻分野)	博士(農学)
学位記番号	農博第1111号
学位授与の日付	平成12年3月23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 Cellular Localization and Thermostability of Ovalbumin Produced in <i>Escherichia coli</i> (大腸菌で生産されたオボアルブミンの細胞内局在と熱安定性に関する研究)

論文調査委員 (主査) 教授 廣瀬正明 教授 内海成 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オボアルブミンは、一次構造と立体構造の類似性からセルピン・スーパーファミリーに属するが、その生体での分泌機構並びに熱安定性の点でユニークな性質を持つ。すなわち、本タンパク質は通常の分泌タンパク質とは異なり、シグナル鎖の切断を受けることなく鶏の輸卵管において分泌される。また、鶏卵の保蔵中には炭酸ガスの蒸散により卵白のpHが上昇して弱アルカリ性となり、熱安定な分子に変換される。しかし、通常のセルピンとは異なり、セリンプロテアーゼの切断による熱安定化現象は、オボアルブミンでは認められない。本論文では、これらオボアルブミンのユニークな性質と分子構造の関係を明らかにするため、大腸菌における組換え型オボアルブミンの大量発現系を用い、ペリプラズムへの分泌並びに熱安定性に関する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. オボアルブミンの切断を受けない分子内シグナル鎖が大腸菌のペリプラズムへの分泌シグナルとして機能するかを解析している。オボアルブミン遺伝子を発現させた大腸菌を用い、浸透圧ショック法によりペリプラズム画分、細胞質画分および不溶性画分に画分し、細胞内局在性を検討した。その結果、野生型オボアルブミンの約30%がペリプラズム画分に確認されるのに対し、分子内シグナル鎖部位を欠失したオボアルブミンはペリプラズムへの分泌が全く起こらず、ほとんどが不溶性画分に局在した。また、システイン残基をアルキル化修飾したサンプルのゲル電気泳動法による分析の結果、オボアルブミンの分子内ジスルフィド結合はペリプラズムに分泌された直後には形成されず、時間の経過とともに形成されることを見出した。これらの結果から、オボアルブミンの分子内シグナル鎖が、原核細胞である大腸菌でも分泌シグナルとして機能すること、またこの分泌に際し、分子内ジスルフィド結合の形成が連動しないことを明らかにした。

2. 大腸菌で生産された組換え型オボアルブミンを精製し、その構造特性と熱安定性を解析している。円偏光二色性と蛍光のスペクトル分析並びに化学分析の結果から、組換え型オボアルブミンは卵白由来のオボアルブミンと同一のコンフォメーション並びに分子内ジスルフィド結合を有することを確認した。これに対し、卵白由来のオボアルブミンで知られている翻訳後修飾(リン酸化、糖鎖付加およびアミノ末端のアセチル化)は、大腸菌で発現させた組換え型オボアルブミンでは起こらないことを見出した。一方、示差走査型熱量計を用いた熱変性の実験結果から、組換え型オボアルブミンがアルカリ処理により、卵白のオボアルブミンと同様の熱安定化型に変換されること、またこの処理後も分子内ジスルフィド結合が保持されることを見出した。これらの結果から、オボアルブミンの熱安定化の機構として、翻訳後修飾部位やジスルフィド結合の化学的変換が関与する新たな分子内架橋形成の可能性を明確に否定した。

3. オボアルブミンの部位特異的変異体を用い、セリンプロテアーゼによる部分加水分解産物の熱安定性について解析している。野生型オボアルブミンでは、プロテアーゼ切断に際して熱安定な分子への構造変換が起らないが、この原因として、通常のセルピンのループ構造変化に際して蝶番の機能を果たすトレオニン残基が、オボアルブミンではアルギニン残基に置換していることに着目し、オボアルブミンの339番目のアルギニン残基をトレオニン残基に変異させた部位特異的変異体タ

ンパク質を調製した。本変異体オボアルブミンにセリンプロテアーゼの一種であるエラスターゼを作用させた結果、一ヶ所でペプチド結合の切断が起こるとともに、熱変性温度が15.8℃上昇することを見出した。さらに、ペプチド結合切断に関する詳細な速度論的解析を行った結果から、変異体オボアルブミンにおける熱安定化は、切断を受けたループ構造部位のコンフォメーション変化に基づく全体構造の安定化に起因すると結論した。

論文審査の結果の要旨

卵白タンパク質の主成分であるオボアルブミンは、その構造上の類似性からセルピン・スーパーファミリーに属するが、熱安定性並びに分泌機構の点でユニークな性質をもつ。すなわち、本タンパク質は通常のセルピンとは異なり、セリンプロテアーゼの切断により熱安定化しないが、鶏卵の保蔵中にプロテアーゼの切断を受けることなく熱安定な分子に変換される。

また、通常の分泌タンパク質とは異なり、シグナル鎖の切断を受けることなく鶏の輸卵管において分泌される。本論文の著者は、大腸菌における組換え型オボアルブミンの大量発現系を用い、本タンパク質のユニークな性質とその分子構造の関係を明らかにするための詳細な研究を行い、重要な知見を得ている。評価すべき主な点は次のとおりである。

1. 野生型および分子内シグナル鎖部位を欠失したオボアルブミン遺伝子を大腸菌で発現させたのち、ペリプラズム画分、細胞質画分および不溶性画分に分画し、本タンパク質の細胞内局在性を検討した結果、分子内シグナル鎖がペリプラズムへの分泌シグナルとして機能することを明らかにしている。

2. 大腸菌より精製した組換え型オボアルブミンは、卵白由来のオボアルブミンと同一のコンフォメーションを有するが、翻訳後修飾（リン酸化、糖鎖付加およびアミノ末端のアセチル化）を受けないこと、また、アルカリ処理により卵白のオボアルブミンと同様の熱安定化型に変換されることから、本タンパク質の熱安定化機構として翻訳後修飾部位の化学的変換が関与する分子内架橋形成の可能性を明確に否定している。

3. オボアルブミンの339番目のアルギニン残基をトレオニン残基に変異させた部位特異的変異体タンパク質を調製し、エラスターゼを作用させた結果、一ヶ所でペプチド結合の切断が起こるとともに、熱変性温度が15.8℃上昇することを見出している。さらに、ペプチド結合切断に関する詳細な速度論的解析を行い、変異体オボアルブミンにおける熱安定化は、切断を受けたループ構造部位のコンフォメーション変化に基づく全体構造の安定化に起因するとの結論を得ている。

以上のように、本論文はタンパク質工学的手法を駆使し、卵白タンパク質の主要成分であるオボアルブミンの構造・機能特性の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、食品生化学、タンパク質化学に寄与するところか大きい。

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12年2月15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。