氏　　名	加藤倫子（かとうみちこ）
学位(専攻分野)	博　士　（農　学）
学位記番号	農　博　第1075号
学位授与の日付	平成11年5月24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	農学研究科農芸化学専攻
学位論文題目	High Pressure Effects on Biomembranes : Structural and Functional Studies of Membrane-Bound Na^+, K^+-ATPase from Pig Kidney （生体膜に対する高圧力効果：ブタ腎臓膜結合型 Na^+, K^+-ATPase に関する構造と機能の研究）
論文調査委員	（主査）教授 林　力丸　教授 清水　昌　教授 松野隆一

論　文　内　容　の　要　旨

生体膜は脂質を主要成分とし，これに膜表在性タンパク質や膜貫通タンパク質が存在して，外界との隔離や生命の維持に必要なさまざまな機能を果たしている。このような生体膜の機能は，温度や圧力などの物理的因子により影響を受けるが，圧力による脂質の相転移や膜系タンパク質のサブユニットの解離会合・変性などには十分な解析のメスは加えられていない。

本研究は，脂質に与える高圧力効果とタンパク質の解離会合・変性に与える高圧力効果をそれぞれ別個に解析するとともに，脂質・タンパク質複合系のモデルとして膜貫通タンパク質であるブタ腎臓由来の Na^+, K^+-ATPase の構造と機能に対する圧力依存的変化を総合的に解析したもので，その成果の主要な点は以下に示すとおりである。

第一章では，人工的に作製したリン脂質二重膜に対する高圧力効果と高圧力により誘発される生体膜の変化，深海微生物の圧力適応および高圧力に誘発される細胞膜や細胞壁の変化などの生化学的現象について，現在までの研究成果をまとめるとともに，本研究の目的を明確にしている。

第二章では，脂質に与える高圧力効果の指標として，臨界ミセル濃度（CMC）について解析を行い，CMC の圧力および温度依存性を明らかにし，脂質の構造と CMC の相関関係を解明している。

第三章では，膜結合型 Na^+, K^+-ATPase に関して，次のような成果を述べている。

a. 活性は 0.1－100 MPa と 100－220 MPa の変化に加え，それ以上の圧力による急激な変化からなる少なくとも三段階の変化をすることを明らかにした。

b. 本酵素の分光学的性状変化を圧力下（*in situ*）で解析し，上記の三段階変化とタンパク質構造の変化の対応関係を解明した。

c. 高圧力下での H-T 交換実験を行った結果，トリチウムの不可逆的交換は 100 MPa 以上で始まり，220 MPa までは圧力の増加とともに増大するが，それ以上の圧力では急激に減少することを見い出した。これらの結果をもとに，活性の三段階変化について，次のように結論している。すなわち，第一段階は膜の流動性の変化であり，第二段階は脂質の相転移と本酵素のプロトマー間の解離を伴う変化であり，第三段階はタンパク質の変性と膜構造の崩壊が同時に起こるものである。

d. 以上のような脂質・タンパク質複合系の圧力下での動的な変化を総合し，高圧力下では生体膜脂質と貫通タンパク質との接触面に隙間ができ膜貫通孔ができること，そして，そこから膜が崩壊するという過程を分子論的に説明した。

以上の研究成果は，高圧力処理により細胞内酵素が溶出することや酵母の核膜が切断されるという電子顕微鏡観察などの従来報告されている現象を分子論的に説明できる新しい知見であると述べている。また，本論文は脂質自体と生体膜に関する新知見ばかりでなく，圧力因子はパーターバントとして生体膜系の動的形態を明らかにする上で重要な役割を果たしうる

ことを提起している。

論文審査の結果の要旨

本論文は，脂質とタンパク質に与える高圧力効果の解析を行うとともに，脂質・タンパク質複合系のモデルとして膜結合型タンパク質であるブタ腎臓由来の Na^+, K^+-ArPase の構造と機能に対する高圧力効果を解析することにより，高圧力により誘発される生体膜の生化学的諸現象を分子論的に明らかにしようとしたもので，評価すべき点は以下のとおりである。

1）デオキシコール酸ナトリウムとドデシル硫酸ナトリウムの CMC に対する温度と圧力の効果を系統的に解析し，脂質炭素鎖の構造と CMC との間の相関関係を解明した。

2）Na^+, K^+-ATPase の活性が 0.1－100,100－220 および 220 MPa 以上の圧力で少なくとも三段階変化することを見い出し，この三段階変化は，第一段階が膜の流動性の変化であり，第二段階が脂質の相転移と本酵素のプロトマー間の解離を伴う変化であり，第三段階はタンパク質の変性と膜構造の崩壊が同時に起こる変化であることを明らかにした。

3）Na^+, K^+-ATPase の分光学的性状変化を圧力下（*in situ*）で解析し，上記の三段階変化とタンパク質構造の変化を対応させることができ，さらに，膜貫通部位の構造変化と活性中心近傍の水溶性部位の構造変化が脂質二重層の圧力変化（相転移と流動性）と相関することを明らかにした。

4）高圧力下での H-T 交換実験により，脂質二重層とタンパク質の接触面が圧力により離れ，膜貫通孔ができることを明らかにした。

以上のように，本研究は脂質とタンパク質およびそれらの複合系に対する高圧力効果を系統的に解析し，高圧力下での生体膜の動的変化を分子論的に解明したものであり，高圧力生化学，タンパク質化学，生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 11 年 4 月 8 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。