

氏 名	ミレーユデュムラン Mireille Dumoulin
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 1058 号
学位授与の日付	平成 11 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 農 芸 化 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	High Pressure-Induced Cold Denaturation of Proteins: Structural and Functional Study of Wild Type and Unglycosylated Carboxypeptidase Y (高圧力により誘発されるタンパク質の低温変性：野生型および無糖鎖型カルボキシペプチダーゼ Y の構造と機能の研究)
	(主査)
論 文 調 査 委 員	教 授 林 力 丸 教 授 天 知 輝 夫 教 授 加 藤 暢 夫

論 文 内 容 の 要 旨

一般に、タンパク質は加熱ではもちろんのこと、低温にすることでも立体構造が壊れ変性する。この低温変性は水の凝固点以下の温度で見られることが多く観測しにくいいため、研究例が少ない。本研究は、高い圧力の下でタンパク質の構造が乱れ、同時に水の凝固点が低下する現象を利用し、*Saccharomyces cerevisiae* 由来の糖タンパク質である野生型カルボキシペプチダーゼ Y と部位特異的変異により得た無糖鎖型カルボキシペプチダーゼ Y の低温変性の機構を明らかにしたものである。高圧力の影響は「その場」(*in situ*) 観察法と圧力処理後 (*ex situ*) 観察法で行なっている。

本論文の内容は以下のように要約される。

第 1 編では、タンパク質の低温変性と圧力変性に加え、カルボキシペプチダーゼ Y の研究の歴史と現状を紹介し、本論文における研究の目的と意義について述べている。

第 2 編の第 1 章では、圧力により誘発されるカルボキシペプチダーゼ Y の低温変性を *in situ* で研究している。このため、本酵素の圧力に依存した活性変化のほか、タンパク質に固有の蛍光測定による芳香族アミノ酸残基の環境、蛍光色素の結合性測定による疎水性コアの環境などを調べている。合わせて、高圧下での電気泳動により全体構造の変化も追跡している。

その結果、圧力による構造変化は、次に示す少なくとも 3 状態遷移で起こることを明らかにしている。すなわち、第一段階は 150 MPa 以下の圧力で見られるもので、活性変化はわずかであり、固有の蛍光変化が多少見られるが、蛍光色素の増加は観察されないことから、天然の構造はほとんど完全に保持されていると判断している。むしろ、活性の減少は反応速度に対する圧力効果が原因であると結論している。第二段階は 200~500 MPa の圧力で見られるもので、急激な活性の減少や蛍光色素の結合性の増加を伴うことから、圧力変性により芳香族残基や疎水性コアが溶媒に露出するものと推定している。第三段階は 550 MPa 以上の圧力で見られるもので、固有の蛍光の大きな減少や蛍光色素の結合性増加を伴い、大きな構造変化を引き起こすとしている。

第二、第三番目の状態は、圧力により誘発されるモルテングロビュール様の状態であることを立証している。さらに、このような多状態遷移は無糖鎖酵素でも観察できることを明らかにしている。

各遷移段階の中間圧力はタンパク質の構造的感受性を比較するためのパラメータとして有効であると述べている。この感受性は野生型酵素が無糖鎖型酵素より約 50 MPa も高いことを示し、糖鎖が圧力に誘発される低温変性からタンパク質を保護していると結論している。この結論は高圧力下での活性測定や電気泳動実験によっても支持されている。

第 2 編の第 2 章では *ex situ* での研究として、圧力 (0.1-400 MPa) と温度 (-22-25℃) を変化させて圧力処理をした後、大気圧下で活性を測定した結果を述べている。すなわち、室温での圧力失活は非常に速く部分的に可逆的に回復すること、失活した酵素はより高い分子量を持つことを明らかにしている。また、蛍光色素の結合性がないこと、円偏光二色性の解折

から二次構造が半分残った状態であることなどを総合し、その構造はモルテングロビュールの特徴を持つと結論づけている。さらに、低温高圧力処理すると、野生型に比べ無糖鎖型酵素は2倍も速く不可逆的に失活することを明らかにし、この相違は両タンパク質の低温安定性の違いによるものと結論している。

第3編では、以上の実験結果を総括し、本研究において得られた成果のまとめが述べられている。

論文審査の結果の要旨

タンパク質の低温変性の機構に関しては古くから関心がもたれているが、その解明のための解析は技術的制限のため遅れている。本研究は野生型と部位特異的変異により得た無糖鎖型カルボキシペプチダーゼYの高圧力(200-400 MPa)の下で見られる低温変性の機構を明らかにし、同時に糖鎖の役割を解明した研究であり、評価される点は次のとおりである。

1. 圧力により誘発される低温変性を*in situ*で研究した結果、圧力による構造変化は、少なくとも3状態遷移で起こることを明らかにした。第一段階は150 MPa以下の圧力で見られるもので、反応速度に対する圧力効果が原因で活性が減少する。第二段階は200から500 MPaの圧力で見られるもので、芳香族残基や疎水性コアが溶媒に露出するものである。第三段階は550 MPa以上の圧力で見られるもので、大きな構造変化が起こるものである。このような多状態遷移は無糖鎖型酵素でも観察できることを明らかにした。

2. 上記の1. で述べた第二、第三段階の状態は、圧力により誘発されるモルテングロビュール様状態であることを立証した。

3. 各遷移段階の中間圧力は、タンパク質の構造的感受性を比較するための有効なパラメータであることを提唱した。

4. 高圧下での低温変性は野生型酵素の方が無糖鎖型酵素より約50 MPaも高い圧力で起こることを示し、糖鎖が圧力に誘発される低温変性からタンパク質を保護していると結論した。

5. 圧力(0.1-400 MPa)と温度(-22-25℃)を変化させて圧力処理した後、大気圧下で活性を測定する*ex situ*の研究により、低温高圧力処理すると野生型に比べ無糖鎖型酵素は2倍も速く不可逆的に失活することを明らかにし、この相違は両タンパク質の低温安定性の違いによるものと結論した。

6. 同様の*ex situ*の研究を室温で行なうと酵素失活は可逆的に非常に速く回復すること、失活した酵素はより高い分子量を持つことなどを明らかにし、この構造はモルテングロビュールの特徴を持つと結論した。

以上のように、本論文は野生型と無糖鎖型カルボキシペプチダーゼYの低温変性の機構とその糖鎖のタンパク質の構造安定性に果たす役割について新知見を得たものであり、生体高分子化学、酵素化学、構造生物学の分野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2月12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。