3PA005

NMR によるリゾチーム 3SS 変異体の構造の
柔らかさの研究—metLYZ、 Δ 4_Aについて—

○富永剛史¹ 横田篤¹ 野田康夫¹ 橋秀樹²
瀬川新一¹ (¹関学大・理 ²神戸大・理)

ニワトリ卵白リゾチームには、C6-C127、C30-C115、C64-C80、C76-C94 のジスルフィド結合(SS 結合)が存在する。SS 結合の構造形成に対する寄与を調べるため、各 1 本の SS 結合を欠損させた 4 種の変異体リゾチーム(3SS 体)を作製して、これまで研究を行ってきた。3SS 体は N 末端に Met 残基が付加しているため、比較サンプルとして天然リゾチーム(wtLYZ)に Met 残基が付加した metLYZ を作製して研究を行っている。

これまでの研究の結果、metLYZ の unfolding rate は wtLYZ のそれと比べ、30 倍速くなっていることがわかった。そこで、N 末端 Met 残基の立体構造への影響を調べるため、主鎖アミドプロトンの重水素交換反応を観測した。pH3.8、25℃での交換反応速度より Protection factor を求めたところ、2 次構造領域は非常に硬いが、N 末端周辺の残基が揺らいでいることが分かった。

一方、C76-C94 が欠損した 3SS 体(Δ 4_A)について 2D-NMR スペクトルを測定したところ、N 末端周辺の残基及び C76-C94 欠損領域に大きく化学シフトの差が見られた。metLYZ と同様 Δ 4_A についても重水素交換反応を観測し、3SS 体と 4SS 体の違いを詳細に比較検討したので、その結果を報告する。また、一部の交差ピークの同定はまだ不確実のままなので、¹⁵N にラベルしたサンプルを用いて 3D-NMR 測定を行っている。これらの結果についてもポスターにて報告する。

T.Tominaga, A.Yokota, Y.Noda, H.Tachibana & S.Segawa: A NMR study of Structural flexibility of 3SS variants of hen lysozyme -metLYZ and Δ 4_A.

3PA007

NMR 法による Cys30-Cys115 結合を欠損した
リゾチーム変異体 Δ 2_A の構造変化の研究

谷阪喜昭, 富永剛史, 横田篤, 野田康夫, 橋秀樹¹,
瀬川新一 (関学大・理 神戸大・理¹)

ニワトリ卵白リゾチームには、4 本のジスルフィド結合(SS 結合)が存在する。今回、我々は SS 結合の 1 つである C30-C115(SS2 結合: 疎水性核の中心に位置し、B, D ヘリックス間に架っている)を欠損させた変異体リゾチーム(Δ 2_A)の NMR スペクトルを測定し、交差ピークの帰属を出来る限り行った。これまでの我々の研究から、 Δ 2_A は蛍光スペクトルおよび 220nm 近傍の CD スペクトルが他の 3SS 変異体とは明確に異なっている事が分かっている。また、280nm 近傍の CD スペクトルも天然リゾチーム(wtLYZ)に比べ著しく減少している。これらの事から、SS2 結合近傍の構造は何らかの変化をしていると推定されるものの、どのような変化であるか分らなかった。NMR スペクトルも、この B, D ヘリックス近傍の残基の化学シフト値が大きく変化して、ピークの位置を同定する事が出来なかった。今回、我々は pH3.8 25℃の重水中で、 Δ 2_A の NMR スペクトルを測定し残基毎の Protection Factor を求めた。上記の B, D ヘリックス内の残基の未知の交差ピークは、急速に HD 交換して、D₂O 中のスペクトルからは消滅していることが分かった。すなわち、B, D ヘリックス近傍の立体構造の柔らかさも大きく増大している事が分かった。さらに最近、¹⁵N 置換した Δ 2_A 変異体を作製することに成功したので、これらのラベルした試料の NMR 法による研究について報告する予定である。

Y. Tanisaka, T.Tominaga, A.Yokota, Y.Noda, H.Tachibana & S.Segawa: The study of conformational change of Δ 2_A lacking C30-C115 by NMR method.

3PA006

リゾチーム 3SS 体の立体構造のゆらぎ

—ゆらぎの速さとスケール

○澤村利康、野田康夫、瀬川新一 (関学大・理)

SS 結合を一本欠損したリゾチーム 3SS 体の立体構造は著しく不安定になる(熱転移温度で約 30~40℃)。我々は、特定の SS 結合を一本欠く 4 種のリゾチーム 3SS 変異体の構造のゆらぎを研究しているが、その一つの例として、今回は化学修飾法によって残基 6 と 127 間の SS 結合をカルボキシメチル化したリゾチーム誘導体(rcmLYZ)の HD 交換反応速度を詳細に観測した。以前、我々は天然リゾチーム(wtLYZ)を用いて主鎖アミド水素の HD 交換反応の活性化エンタルピーを各アミノ酸残基毎に決定し、リゾチームの立体構造のゆらぎがドメイン毎(分子表面領域、 α ドメイン核、 β ドメイン核)に異なることを見出した。今回は 3SS 体を用いて、このドメイン毎のゆらぎの様子がどのように影響を受けるか、実験的に観測することが目的であった。

本実験では、25℃、pH3.8 の条件下で rcmLYZ の HOHAHA スペクトルを測定した。finger print 領域のピーク体積の時間変化から、各残基毎の時定数 τ を算出した。その τ から protection factor を計算した。さらに、各残基の活性化エンタルピーを求めるために、温度を変えて測定を行った(15℃、25℃、32℃)。これらの速度定数を 1/T に対してプロットし、その勾配から活性化エンタルピーを求めた。その結果、速く交換するアミド水素は活性化エンタルピーが小さく、遅い交換速度のものは大きな活性化エンタルピーを伴うという相関関係が見られた。これらの結果について報告する。

T.Sawamura, Y.Noda, S.Segawa: Structural fluctuations in a 3SS-variant of lysozyme — Rates of HD exchange reaction and the scale of structural fluctuations

3PA008

Unfolding 条件下にあるリゾチームの折りたたみ構造の
H-D 交換反応に対する Protection Factor の研究

○東田 欣也、野田 康夫、瀬川 新一
(関学大・理)

これまで我々はニワトリ卵白リゾチームの Unfolding 過程を、水素パルスラベル法によって残基毎に観測してきた。その結果、61 個の主鎖アミドプロトンは、Unfolding 速度定数からも、その活性化エンタルピーからも、全く協同的に Unfolding することが分かってきた。そのような研究の中から溶液が Unfolding 条件下(4M GuHCl)にあるとき、過渡的には折りたたまったままの状態にある蛋白質の H-D 交換反応の Protection Factor (PF) がどのようなものであるかという点に興味を持った。

そこで今回我々は 4M GuHCl, pH8.0 という条件下で、リゾチームを徐々に Unfolding させるが、その反応はまだほとんど進行していない時間範囲内(過渡的に折りたたまったリゾチーム)で、H-D 交換反応を測定し、31 個の主鎖アミドプロトンに対し Protection Factor を求めることができた。その結果、比較的分子表面上に存在するアミドプロトンに対しては、4M GuHCl の存在が、ほとんど Protection Factor に影響しないことが分かった。以上の実験結果について報告する。

K.Toda, Y.Noda & S.Segawa: Protection factors for HD exchange reactions in the folded state of lysozyme under the unfolding condition.