3PA017

酵母シトクロムcの構造変化の1分子イメージング

○西田智幸¹、和沢鉄一²、石井由晴²、後藤祐児³、柳田敏雄^{1,4}
¹阪大・基、²科技振・1分子過程Prj、³阪大・蛋白研、⁴阪大・医

シトクロムc(Cyt c)は、環境に依存してネイティブ状態・変性状態・モルテングロビュール状態の3状態をとることが知られている。今回、変性状態とモルテングロビュール状態における個々のCyt c分子の挙動を1分子顕微鏡で観察した。

酵母Cyt cの107位には、ヘムとのチオエーテル結合に関わっていない唯一のシステイン残基があり、これを蛍光色素TMR(テトラメチルローダミンマレイミド)で標識した。TMR修飾Cyt c(TMR-Cyt c)の多分子計測において3つの状態におけるTMRの蛍光強度は、変性状態>モルテングロビュール状態>ネイティブ状態となった。これは、コンフォメーション変化に伴ってTMR-ヘム間の蛍光エネルギー移動効率が変化したためである。

全反射蛍光顕微鏡で個々のTMR-Cyt c分子の蛍光強度測定を行なった。その結果、変性状態の蛍光強度は一定であったが、モルテングロビュール状態と思われる高塩濃度では数百ミリ秒〜数秒のスケールで蛍光強度が0と変性状態時の蛍光強度の遷移を繰り返すことが分かった(右図)。このようにして、1分子のタンパク質分子の動的な構造変化を実時間で観察することができた。

1分子の蛍光強度の時間変化

T. Nishida, T. Wazawa, Y. Ishii, Y. Goto, T. Yanagida:
 Single molecule imaging of conformational changes in
 Cytochrome c from *Saccharomyces cerevisiae*

3PA018

蛋白質分子に結合した発色団の1分子蛍光スペクトル

○和沢鉄一¹、石井由晴¹、柳田敏雄^{1,2} (1) 科技技術振興事業団・1分子過程プロジェクト、(2) 大阪大学医学部

光学顕微鏡下で個々の蛋白質分子の状態変化を検出する目的で、水溶液中の蛍光1分子のスペクトル測定を行なうシステムの開発を我々は行ってきた(日本生物物理学会 3170, 1996年; IQ34, 1997年)。今回さらに、1分子蛍光スペクトルに対する環境変化の効果、そして蛋白質分子に結合した蛍光色素の1分子スペクトルについて検討を行なった。

1分子スペクトルを検討する試料として、ミオシンサブフラグメント1のSH1と呼ばれるシステイン残基をTetramethylrhodamine maleimideで特異的に修飾した蛍光性蛋白質(TMR-S1)を用いた。TMR-S1を石英製スライドガラス上に吸着して蛍光顕微鏡で観察すると、それぞれの分子が個々の輝点として観察された。このような単一輝点由来の蛍光に対して0.5秒の露光時間で分光測定を行なった。

まず、1分子スペクトルに対する環境変化の効果を検討するために、中性の水溶液およびメタノール中でTMR-S1の分光測定を行なった。1分子測定で得られた個々の分子のスペクトル位置は数nmの幅の分布を示した。しかし、その平均値は溶媒を中性の水溶液からメタノールに換えることにより短波長側へシフトし、多分子測定で得られたスペクトル変化と一致した。これにより、1分子蛍光分光で色素の環境変化を検出できる可能性が示された。

また、水溶液中のTMR-S1の単分子スペクトルを検討すると、同一分子から測定されたのスペクトル位置が時間経過に伴って変化することがしばしば観察された。一方、ガラスに直接結合した単一蛍光色素ではそのような変化はほとんど検出されなかった。したがって、TMR-S1で見られたスペクトルの変化は蛋白質の状態変化に起因すると考えられる。すなわち、この結果はTMR-S1が秒・サブ秒のスケールで多状態間遷移を行なっている可能性を示唆するものである。

T. Wazawa, Y. Ishii, T. Yanagida: Single-Molecule Fluorescence Spectra of Fluorophore Conjugated to a Protein Molecule.

3PA019

Interleukin 6のV8 proteaseによる限定分解とその断片複合体の再構成 ○高田 一幸、酒井 朝也、栗本 英治
 (名市大・薬・薬品製造工学)

Interleukin 6 (IL-6)はそのファミリーに共通の four α -helix bundle 構造を持つサイトカインであるが、その特徴的な構造はタンパク質構造の安定性や、レセプターとの相互作用という点から興味深い。我々は recombinant human IL-6 を 10mM phosphate buffer (pH7.8)中、V8 protease で数種の fragments に分解した。それぞれの fragments を RP-HPLC により分離し一次構造を調べた結果、最初に切断される箇所は IL-6 の 1 本目と 2 本目の α -helix を結ぶ loop 上にある Glu55 であることが明らかとなった。互いに相補的な Pro1 から Glu55 までの fragment N と Ala56 から C 末端の Met184 までの fragment C を精製し、それぞれを 6M GdmCl で一旦変性させた後、希釈法によりそれぞれ単独で、またあらかじめ 1:1 で混合してから refolding させる実験を行った。単独で refolding させた場合、fragment N は特定の 2 次構造をほとんど形成しないが、fragment C はかなりの量の α -helix を含む構造に refold することが CD スペクトルから分かった。Refold した fragment C は、ゲル濾過クロマトグラフィーにおいて実際の分子量の約 2 倍である 32kD の位置に溶出されることから、やや緩んだ状態になっているかあるいは 2 量体となっていることが予想された。実際、refolding 後の fragment C は不安定で会合体を形成しやすい傾向が認められた。混合してから refold させた場合、両者は速やかに安定な complex を形成した。この complex は、ゲル濾過クロマトグラフィーでは native IL-6 とほぼ同じ位置に溶出され、さらにその far-UV CD スペクトルも native のものとほぼ同じであったことから、native と同様な構造を形成しているものと予想された。

K. Takada, T. Sakai, E. Kurimoto: Limited proteolysis of rhIL-6 by V8 protease and reconstitution of the complex consisting of complementary two fragments

3PA020

固定化を利用した pepsin の *in vitro* refolding 条件の選定
 ○栗本 英治、高田 一幸、秋山 綾子、原田 拓志、酒井 朝也
 (名市大・薬・薬品製造工学)

胃で分泌される protease である pepsin は、44 残基のプロ配列を伴って合成され、酸性条件下でプロ配列が除去されて活性型になる。Pepsin は pH2 という条件でも構造を維持し活性を発揮するという興味深いタンパク質であるが、 α -lytic protease などと同様に、プロ配列が除去されると refolding が極めて困難になるとされており、その高次構造形成メカニズムにも興味が持たれるタンパク質である。我々は、固定化法を利用して porcine pepsin の *in vitro* refolding を試みた。固定化は refolding を阻害する autolysis や aggregates 生成を排除できるため、refolding 溶液の選定に非常に有効な方法である。Pepsin の固定化には CNBr-activated Sepharose 4B gel を用いた。固定化は pepsin が native 構造を保持した状態でを行い、8M 塩酸グアニジン (pH8.0)により変性させた後、種々の溶液を用いて refolding を行った。Refolding 収率は酸変性ヘモグロビンを基質とした protease 活性により測定した。実験の結果、pH が中性付近の溶液中では pepsin は refold せず、その活性の至適 pH である pH2 の溶液中でもほとんど refolding しなかったが、pH4~5 の条件下で非常にゆっくりとはあるが活性が回復してくることが明らかとなった。最終的な活性回復率は pH4 の溶液を用いた場合約 30%であり、これには室温でおよそ 200 時間を要した。Pepsin 分子内の酸性残基間の反発を弱めるために 1M NaCl を refolding buffer に加えると、pH4 ではほとんど効果がなかったが、pH5~7 では活性回復率が顕著に上昇することが認められ、1M NaCl を含む pH5 の溶液中では活性回復率は約 80%にまで達した。

E. Kurimoto, K. Takada, A. Akiyama, T. Harada, T. Sakai: Selection of effective conditions for *in vitro* refolding of immobilized pepsin