3PA021

時分割X線小角散乱による oligomer 蛋白質変性過程の測定

藤澤哲郎¹、〇八木直人² (¹理研、²JASRI)

複数のポリペプチド鎖からなる oligomer 蛋白質は小さな蛋白質の折れ畳み、変性過程と比べると各ポリペプチド鎖の3次構造の変化だけでなくサブユニットの相互作用、4次構造の変化を伴うので複雑である。X線小角散乱は逆空間における散乱角領域の違いで異なる距離の実空間情報を一度に計測できる。すなわち、小角領域は回転半径に代表される全体構造を中広角領域ではサブユニット構造や2次構造のパッキング情報が反映される。我々は従来時分割小角散乱では計測が困難であった、中広角の測定をSPRING-8・理研ビームライン1 (BL45XU) においてX線イメージンテンシファイアー+CCD検出器を使用し実現した。

pH 5.4 から pH 2.7 へストップフロー装置を用いて pH を変化させアルドラーゼが酸変性し、各サブユニットに解離する過程を 5℃ において測定した。その結果、サブユニットの解離が始まる前に (< 200 msec) 回転半径が 37 Å から 39 Å に増加し、その後回転半径および分子量に比例する原点散乱強度が減衰していった。中広角領域におけるサブユニット干渉関数はおおよそ 100 msec で消滅した。これらの事実はアルドラーゼが解離する以前に4次構造を持たず、しかも解離していない中間体を経ることを示している。

年会では特異値分解法による散乱曲線のさまざまな散乱角における解析と、中間状態の構造を報告する。

T. Fujisawa, N. Yagi: Time-resolved x-ray scattering study on the unfolding of oligomeric protein.

3PA023

タンパク質結晶成長の初期過程にあたる磁場の効果

〇三屋 新吾, 平井光博 (群大・工)

タンパク質の結晶成長を制御する物理的な因子としては、温度や溶媒条件等の様々なものが考えられる。近年では結晶成長と外場環境 (圧力, 磁場, 電場等) の依存性に関連した研究が盛んに行われている。中でも磁場をパラメータとした研究は、分子の表面電荷分布, 構造特異性や分子間相互作用を反映するため、注目されている。一般にタンパク質は反磁性体であり、磁場印加はタンパク質分子の会合に何らかの影響を与えると考えられる。

我々はこれまでに立体構造異方性を持った生体超分子系 (タバコモザイクウィルス分散系) の磁場印加により生じる粒子間の協同的な構造の揺らぎと巨視的な構造形成, 磁場液晶相転移について研究を進めてきた。一般に生体高分子の反磁性帯磁率異方性は分子内の組成と高次構造を反映し、分子間相互作用も表面電荷分布等により大きく変化すると考えられる。そこで今回は新たに立体構造異方性の小さい球状タンパク質に注目し、タンパク質分子の会合とタンパク質の結晶成長に与える磁場の効果を検討した。

年会では卵白リゾチームの結晶成長の初期過程を、磁場強度を変化させて放射光時分割 X 線小角散乱法を用いて測定を行ったのでその結果と、印加磁場強度 (0~0.6 tesla) によって結晶化にともなう回転半径の違いがみられたので、その結果を報告する予定である。

S. Mitsuya, M. Hirai: Effect of a magnetic-field on protein crystal growth in early stage

3PA022

時分割X線小角散乱による apomyoglobin refolding 中間体の測定

〇藤澤哲郎、磯貝泰弘 (理研)

蛋白質の折れ畳み過程においてどのような中間体を経るのか、大きさの変化に着目してX線小角散乱時分割測定を時間分解能 8.2 msec から 100 msec の範囲で測定を行った。測定は日本で最初の挿入光源型小角ビームラインであるSPRING-8 理研ビームライン1 (BL45XU) の小角散乱ステーションにおいて、ストップフロー装置とX線イメージンテンシファイアー+CCD検出器を用いて行われた。ミオグロビン (10 mM HEPES (pH 7.0), 5℃) は回転半径 27 Å から回転半径 21 Å におよそ時定数 150 msec 程度で変化した。S/N 比の向上により従来報告されていた molten globule 状の中間体より早い構造変化が始めて小角散乱により観測された。⁽¹⁾ Wright のグループらの CD 実験によると2次構造の形成は 5 msec 以内に起こっているため、小角散乱の結果は2次構造形成の後に3次構造が形成されていることを示す。⁽²⁾ さらに平衡状態での CD と小角散乱の urea 変性点を比較してみるとそれぞれ 2.7 M と 2.0 M であった。散乱曲線の特異値分解による解析では3状態がはっきり確認できるので、年会では時分割での特異値分解の結果との比較と CD 時分割測定の結果を報告したい。

(1) D. Eliez, P. A. Jennings, P. E. Wright, S. Doniach, K. O. Hodgson, H. Tsuruta (1995) Science, 270, 487-488.

(2) P. A. Jennings and P. E. Wright (1993) Science, 262, 892-896.

T. Fujisawa, Y. Isogai: Study on the myoglobin refolding intermediate by using time-resolved x-ray scattering

3PA024

Pressure dissociates aggregation of disulfide-deficient lysozyme

T. Niraula, H. Li, H. Yamada, K. Akasaka and H. Tachibana
Graduate School of Science and Technology, Kobe University

A variant hen lysozyme has been constructed in which all the cysteine residues are replaced with serine or alanine. Since the protein contains no disulfide bonds, it is considered to constitute a good model for unordered protein. CD measurements at mildly acidic pH showed that the variant lysozyme retained only residual secondary structures. When protein concentration is high, it has the tendency to aggregate, which increase with increasing pressure.

One-dimensional ¹H and two-dimensional ¹⁵N-¹H HSQC NMR spectra of ¹⁵N-labeled variant lysozyme were measured, along with diffusion measurement, at variable pressures between 30 and 2000 bar at 20 °C. The protein sample was dissolved to a concentration of 0.53 mM in 90% H₂O/10% D₂O (v/v) in 50 mM deuterated maleic acid buffer at pH 2.0.

At 30 bar, NMR signals were unusually broad, giving almost no HSQC signals. However, the peaks started to be resolved at 300 bar and became almost completely resolved at 400 bar. Beyond this pressure, changes in chemical shifts occurred in notable manner. Diffusion measurements showed that the diffusion constant of the protein increased by 1.4 fold from 30 bar to 400 bar and by 1.6 fold from 30 to 2000 bar. By considering the change in viscosity of the solvent at higher pressure, it was estimated that the effective molecular weight of the protein decreased roughly by several times at 2000 bar from the value at 30 bar. The results indicate that the protein is in aggregated state at normal pressure, but that this aggregation dissociate at 300-400 bar. The high sensitivity of the aggregate to pressure and its reversible nature of molecular association gives an interesting model system for studying mechanisms of protein aggregation. We found that not all the signals were broadened simultaneously with decreasing pressure, suggesting that the intermolecular association may occur at specific sites. Further analyses of the stepwise resolution of signals from different residues in different range of pressure will give us clues to understand how unordered polypeptide chains may aggregate and how the reaction may be controlled.