3PA041

高温分子動力学によるヤギ α -ラクトアルブミン
のアンフォールディングの構造変化の観察

○依田隆夫1、斎藤 稔2、堀井克紀3、津本浩平3、
松島正明4、熊谷 泉3、桑島邦博1
1東大・理、2弘前大・理工、3東北大・院工、
4山之内製薬筑波研究センター

我々は、 α -ラクトアルブミン(LA)の折れ畳み反応の研究を行っている。LAは、その折れ畳みの中間体としてモルテングロビュール(MG)が蓄積することが知られている。MG状態では、この蛋白質の α -ドメインは二次構造とバックボーンポロジの一部分を獲得しており、 β -ドメインは比較的構造が大きく揺らいでいる。 α -ドメイン内のアミノ酸の疎水性を変える変異体やヤギLAの折れ畳み反応について以前に報告した。

今回は、最近新たに解かれた、組換え体ヤギLAの結晶構造を初期構造として行った高温における分子動力学シミュレーションの結果を報告する。蛋白質分子と溶媒の水分子を含む系の温度を、約600ピコ秒の平衡化の後に400 Kに上げ、約6ナノ秒の計算を行った。昇温後の蛋白質の構造変化を、特に α -ドメイン内部の疎水的な領域に注目して観察した。この6ナノ秒の間に、分子の半径が大きく増大するような構造の崩壊は観察されなかった。計算された蛋白質分子の慣性半径(15.2Å)は、天然状態における値とほぼ同じであり、この6ナノ秒のシミュレーションの間にはMGには至らなかったと言える。

しかし、一次配列上離れたアミノ酸残基間のコンタクトの有無や、疎水的な領域のサブ構造のrmsdを調べたところ、天然の構造が保たれやすい部位(aromatic cluster2など)と、残基間の天然のコンタクトが失われやすい部位(N末端近傍、Thr29近傍など)とがそれぞれ見いだされた。また、このシミュレーションでは、N末端付近の残基のコンフォメーションが大きく変化することも観察された。これらの結果の一部は、以前に発表した変異体を用いた速度論的リフォールディング・アンフォールディングの実験結果と一致する[1,2]。また、この結果の再現性を評価するために異なる条件(600 K)でもシミュレーションを行っており、その結果も報告したい。

1. 依田, 新井, 伊倉, 内山, 熊谷, 桑島, 第35会生物物理学会年会(1997)
2. Chaudhuri *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 285, 1179-1194, (1999)
- T. Yoda, M. Saito, K. Horii, K. Tsumoto, M. Matsushima, I. Kumagai, K. Kuwajima, Observation of unfolding structural changes of goat α -lactalbumin by molecular dynamics simulations at high temperature

3PA043

大腸菌ジヒドロ葉酸還元酵素のトポロジカル変異が

折れ畳みに及ぼす影響

○横 互介、巖倉 正寛 (工技院・生命研)

タンパク質の立体構造は、その一次配列によって決定されることが知られているが、そのタンパク質を構成する全てのアミノ酸残基が立体構造形成に等しく関与しているわけではない。我々は、タンパク質の立体構造形成に重要であると思われる folding elements の存在を提唱し、大腸菌のジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)の folding elements を circular permutation analysis によって決定した。

タンパク質分子が機能を持つ天然構造に至るためには、その分子を構成するアミノ酸ポリペプチド鎖が適切に折れ畳まれることが必要である。配列上で folding elements の順序を変える操作(トポロジカル変異)により folding elements 間の相互の距離を変化させることができる。一次配列上での folding elements 相互の距離の変化が折れ畳み過程に及ぼす影響を調べることは興味深い。本研究では大腸菌の DHFR のトポロジカル変異体(GHF34)を用いて、折れ畳み過程を野生型と比較した。折れ畳み過程の測定は、遠紫外領域の CD ストップ・フロー法を用いた尿素濃度ジャンプによって行った。野生型 DHFR の折れ畳みは中間体の形成とそれに続く4個の parallel な経路を経て達成される。遠紫外領域での CD の測定ではこの過程は見かけ上少なくとも3相で記述され、GHF34においてもこの性質には定性的には変化がなかった。従って CD の測定に於いては folding elements 間の配列上での相互距離は基本的な折れ畳みの振る舞いには影響を及ぼさないと考えられる。

K. Maki, M. Iwakura : Effects of the topological mutation on the refolding kinetics of dihydrofolate reductase.

3PA042

緑色蛍光タンパク質(GFP)のフォールディング
○福田宏幸、新井宗仁、桑島邦博(東大・理)

緑色蛍光タンパク質(Green Fluorescent Protein, GFP)は発光オワンクラゲ(*Aequorea Victoria*)の持つ、アミノ酸残基数238の球状タンパク質である。このタンパク質は天然条件下で他の基質の作用なしに緑色の蛍光を発するため、近年の分子生物学の分野において、その特性から、遺伝子マーカーとして盛んに利用されている。

GFP が遺伝子マーカーとしての役割を果たすためには、*in vivo* で発現したタンパク質が正しく天然状態へ折れたたまる必要がある。しかしながら、多くの生体内環境はクラゲが通常生息している環境より高温であり、正しい折りたたみが行われないことが多い。1996年、Cramer らはPCR法を用いてランダムにアミノ酸変異を導入することで、比較的高温でも正しく折れたたまる変異体を作成した(Cramer, *et al.* 1996. *Nat. Biotechnol.* 14:315-319)。

本研究は、これらの野生型と変異型の特性の違いに物理化学的な考察を与えるものであり、大腸菌による大量発現系の構築から行っている。まず、CLONTECH のプラスミド(pGFP)から GFP の遺伝子部分を制限酵素 *Xba* I 及び *Eco* R I で切り出し、遺伝子断片を発現ベクター pSCREEN-1b(+) (Novagen)の *Nhe* I 及び *Eco* R I 切断部位に挿入した。さらに、遺伝子の5側の余分な塩基配列を除いて読み枠を合わせるため、Kunkel 法による削除変異を行って、発現プラスミド(pGFP17)を作成した。変異型の GFP については、文献に従い、これに F99S・M153T・V163A の3重変異を導入した。続いてタンパク質試料を調製した後、天然状態での緑色の蛍光を指標として、発現したこれらのタンパク質の巻き戻り速度過程を比較した。結果、変異型は天然型に比べて、変性の速度が遅くなっていることが明らかとなった。この結果を元に現在、FT-IR を用いた重水素交換反応の測定を行っており、両者の安定性の違いをさらに定量的に解析する。この結果も合わせて報告する予定である。

H.Fukuda, M.Arai, K.Kuwajima : Folding of green fluorescent protein (GFP)

3PA044

SH 基滴定によるタンパク質に対するアルコール作用の解析

○中岡(廣田)奈美、後藤祐児(大阪大学たんぱく質研究所)

アルコールはタンパク質やペプチドに対してさまざまな作用を及ぼす。我々は今まで(1)メリチン(26アミノ酸残基のハチ毒ペプチド)に対する α ヘリックス形成効果と(2) β ラクトグロブリン(BLG)の天然構造を壊す効果(アルコール変性)について、円二色性を用いて調べてきた。今回は5,5'-dithiobis(2-benzoic acid) (DTNB)によるウシ・ β ラクトグロブリンのSH基滴定を行い、各アルコールの安定化・不安定化作用を探った。

BLGは2つのSS結合と1つの遊離のSH基をもつ。このSH基はタンパク質内部に埋もれており、水中におけるDTNBとの反応性は低い。塩酸グアニジンなどの変性剤で不安定化させるとDTNBとの反応性は高まる。37℃、pH7において、さまざまな種類のアルコール存在下でDTNBによるSH滴定を行った。その結果、アルコールの種類や濃度によって滴定反応が変化した。BLGに対して α ヘリックスを形成させやすいアルコールほど滴定反応を促進することがわかった。例えば、トリフルオロエタノールは低濃度でDTNBによる滴定反応を促進した。他方、グリセロールは滴定反応を抑制した。

DTNBによる滴定反応はタンパク質の構造のゆらぎを反映している。さまざまな溶液中でのSH基の反応性を調べることによって、各溶媒の安定化・不安定化作用を定量することが可能である。我々は既にグリセロールが α ヘリックス形成能力(タンパク質に対する不安定化作用)を持つことを報告した。今回はグリセロールの安定化作用を明らかにできた。これらを結びつけることによりグリセロールをはじめとするさまざまな溶媒の作用機構を解明することが期待される。

N. Hirota-Nakaoka, Y. Goto: SH titration as a tool for understanding the effect of alcohols