3PA045

光解離性*o*-nitrobenzyl誘導体の導入によるチトクロム *c* の構造変化の研究

○廣田俊、奥野貴士、山内脩 (名大院理)

タンパク質のフォールディングは生体系で最も注目されている現象の1つである。タンパク質溶液に一定濃度以上の塩酸グアニジンや尿素などを加えるとタンパク質は変性するが、変性剤の濃度を薄めると、比較的分子量の小さいチトクロム *c* (cyt *c*) などは再びもとのネイティブ状態に巻き戻る。本研究では化学修飾によりアミノ酸残基の側鎖を光解離性の*o*-nitrobenzyl誘導体に変換し、このアミノ酸残基の*o*-nitrobenzyl誘導体をタンパク質の構造変化の研究に利用することをcyt *c* を用いて試みた。

本研究ではウマcyt *c* を用いた。cyt *c* はよく知られているようにタンパク質表面に多くのリシン残基を有し、ウマcyt *c* は2つのメチオニン残基を持つ。本研究では、リシン残基あるいはメチオニン残基を*o*-nitrobenzyl基で化学修飾した。いずれのアミノ酸残基の修飾によっても、cyt *c* の2次及び3次構造が部分的に崩れた。この修飾により、酸化型ヘムとメチオニンの結合に由来する695 nmの吸収帯が消失したので、ヘム鉄に配位しているメチオニンが解離したことが判明した。また、修飾により、ネイティブ状態からアンフォールド状態への転移に必要な塩酸グアニジンの濃度が2.8から2.1 Mに減少したので、修飾cyt *c* は非修飾cyt *c* に比べて不安定化したことが判明した。さらに、この修飾cyt *c* に300 nm付近の紫外光を照射すると、修飾を受けたアミノ酸誘導体はもとのアミノ酸残基に戻り、メチオニンが再びヘム鉄に配位し、 α ヘリックスの含有量が増大し、cyt *c* はもとの2次及び3次構造を回復した。

S. Hiorta, T. Okuno, O. Yamauchi : Studies on the protein structure of cytochrome *c* by introducing photo-cleavable *o*-nitrobenzyl derivatives

3PA047

ウマ β ラクトグロブリン構造状態の相図

○藤原和夫、池口雅道、須貝新太郎 (創価大・工・生物工)

我々は、ウマ β ラクトグロブリン (ELG) の尿素による変性過程において見いだされる中間状態がpHによって異なることを、CDとゲル濾過による観測により見いだしている。1つはpH4での非天然 α ヘリックスを含むコンパクトなモルテングロビュール (MG) 状態、もう1つはpH8.7での変性状態に近い分子の広がりを持つ中間体である。また、それぞれのpHでの変性状態からの巻き戻り過程においても、これらの平衡中間体と同等の構造を持つ巻き戻り中間体が形成されていることが、遠紫外部CDによる観測により明らかとなっている。

そこで今回我々は、ELGの折れたたみ機構を理解する上で、ELGのとりうる4つの状態、つまり、2つの中間状態と天然状態、変性状態、をグローバルに解析することが重要であると考え、様々なpH、尿素濃度でのCDスペクトルの観測を行った。

現在、グローバル解析時の変数を減らすために、pH滴定により、いくつかの解離基のpKaの測定を行っている。その結果も含めたグローバル解析の結果について報告する予定である。

K. Kazuo, M. Ikeguchi, S. Sugai : Phase diagram of equine β -lactoglobulin conformation

3PA046

ウマ β -lactoglobulinのSS結合形成と立体構造形成

○平良ひとみ、池口雅道、清水昭夫、須貝新太郎 (創価大学・生物工学)

ウマ β -lactoglobulin (ELG) は Cys66-Cys160・Cys106-Cys119の2本のSS結合をもっており、ウシ β -lactoglobulin(BLG)と違って、フリーのCys残基はもっていない。BLGのX線結晶構造解析により、Cys66-Cys160はタンパク質分子表面に露出しており、Cys106-Cys119は分子内に埋もれていることがわかっている。我々は、ELGのSS結合の還元・再酸化反応を二段階アルキル化及び、逆相-HPLCを用いて追跡し、ペプチドマッピング法により還元・再酸化過程での中間体のSS結合の同定を行うことにより、ELGのフォールディング機構を明らかにしようとしている。

還元過程において、天然条件下ではfast phaseとslow phaseが存在し、それら両相の速度定数はDTT濃度に比例した。またペプチドマッピング法により、2本のSS結合のうちCys66-Cys160が最初に還元されることを確認した。Cys66-Cys160が還元された中間体[106-119]は天然様の立体構造を保持していることがわかった。

また、再酸化過程において、非天然のSS結合を形成した中間体の有無をペプチドマッピング法により確認したところ、天然条件・変性条件下ともに非天然のSS結合を形成する中間体は存在せず、再酸化反応は還元反応の逆戻り反応であるということを示した。

H. Taira, M. Ikeguchi, A. Shimizu, S. Sugai : Disulfide-coupled folding and unfolding of equine β -lactoglobulin

3PA048

C末欠損がStaphylococcal Nucleaseの構造に与える効果

○平野聡¹、三原憲一¹、上久保裕生²、片岡幹雄¹
(¹NAIST・物質創成 ²KEK・物構研)

蛋白質の立体構造は、一次構造であるアミノ酸配列により決定される。そのアミノ酸配列の一部を改変し、それによって決定される立体構造を比較することは、蛋白質の構築原理を理解するうえで有効な手段である。その改変の手法として我々は欠損に注目した。

これまでの研究によりStaphylococcal NucleaseのC末を13残基欠損させた変異体 (Δ 137-149) は生理的条件下で、コンパクトな変性構造を取っているが、活性を保持していること、阻害剤であるpdTpの添加により天然構造が回復することが知られている。この欠損したC末部位の効果をより詳細に解析するため、より欠損量の少ないC末欠損変異体を作成し、その物性を調べた。

これまでにC末欠損変異体 Δ 141-149、 Δ 140-149を作成し、CD及びX線溶液散乱法を用いて、これら変異体の構造と野性型、 Δ 137-149との比較を行った。この結果から、生理的条件下において Δ 140-149は Δ 137-149と同様の二次構造及び三次構造を失っているコンパクトな変性構造をとっていることが判明した。一方 Δ 141-149は、生理的条件下で二次構造も三次構造も形成されている。

また、これら変異体のカルシウムやpdTpの添加による巻き戻り能を調べた結果、 Δ 141-149、 Δ 140-149はともに Δ 137-149と同様、pdTpによる巻き戻り能を有するが、 Δ 141-149はさらに Δ 137-149と異なりカルシウムの添加のみで天然構造が回復することが判明した。

以上の結果から、 Δ 141-149は Δ 140-149や Δ 137-149と比較して、天然構造がより安定化されていることが結論できる。140番目の残基であるトリプトファンが生理的条件下での天然構造の安定化に対して重要な役割を果たしていることが示唆される。

S. Hirano, K. Mihara, H. Kamikubo, M. Kataoka
Effect of deletion at C-terminal on the structure of Staphylococcal Nuclease