3PA061

ミオグロビンの酸変性状態における3次的残存構造
○関 安孝, 城所 俊一, 曾田 邦嗣
(長岡技科大・生物系)

【背景】我々は、仮定した構造モデルの検定によるミオグロビンの酸変性状態の分子モデリングを行ってきた。実験から得られる局所的な構造情報 (NMR, CD など) と、大域的な構造情報 (溶液X線散乱: SXS, 部分分子体積など) を統合し、より真実に近い描像を得るには、分子モデリングによる解析・検討が不可欠である。NMR により予測される短い α -ヘリックスは存在するが、3 次的な分子内相互作用は無いとするモデルを用いて解析を行ってきたが、実測の SXS プロファイルと計算との間には食い違いが見られ、その差の成因として局所的な残存構造の存在が予想された。本研究の目的は、予想される残存構造の存在を確かめ、その詳細を明らかにすることである。

【実験】酸変性状態の構造モデルとして、3 次的な分子内相互作用を考慮しない NAO モデルと、その存在を陽に考慮した AOR モデルの2つを用いた。右図は SXS プロファイルのクラツキープロットである。平均二乗半径はほぼ同じ値 (NAO: 3.43nm, AOR: 3.30nm) であるにもかかわらず、NAO に比べ AOR の方がプロファイルの平坦部が高い値を示し、実測により近いことがわかった。これは、酸変性状態のミオグロビンが、局所的にコンパクトな構造をもつことを示唆している。年会では、この局所構造の詳細を調べるために行った解析結果を報告する。

Y. Seki, S. Kidokoro K. Soda : Tertiary Residual Structure of Myoglobin in the Acid-Unfolded State

3PA062

ブレンドハーブの還元性性質と生体への影響
○田中 雅 (KIPPO(有))

【はじめに】抗酸化物質を体内に摂取することにより酸化が防止される事は知られている。抗酸化物質は体内で滞留するが、その間、抗酸化性は低下すると予想される。そこで、抗酸化物質の酸化還元電位の経時変化を観測したので報告する。

【測定方法】試料はブレンドハーブ (KIPPO社で配合比率は研究)、ゴマ抽出物、ビタミンE、イチヨウ葉抽出物とし、各試料3gづつを水道水100ccに溶解して用いた。室温で48時間の酸化還元電位の変化をORP計 RM-12P (東亜電波工業(株) 製) を用いて体内の滞留時間を考慮し測定した。

【結果】ブレンドハーブ以外は時間経過と共に酸化する傾向にある。ブレンドハーブは測定開始直後、+165mvであったが、48時間後には-212mvと時間経過と共に還元性が大きくなるのがわかる。この事は、ブレンドハーブを溶媒に溶解すると、時間と共に電子が増加している事を示す。以上の事から、ブレンドハーブを常に体内に摂取する事で、1) ATPの合成を助け細胞を活性化する。2) 活性酸素による生体の酸化防止に寄与し、生体全体を健全化する事が示唆されたと考えられる。

図1 ブレンドハーブの抗酸化性

Miyabi TANAKA :Reductive Property of Blended Herb and Effect In The Human Body.

3PA063

DHFR の圧縮率に及ぼすリガンド結合の影響
○神山匡、月向邦彦 (広島大・理)

蛋白質の揺らぎはその機能と密接な関係にあると考えられており、構造・機能相関を理解する上で、揺らぎの実像を明らかにすることが重要である。我々はこれまで、大腸菌ジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR) の3つのフレキシブルループにおける1アミノ酸置換⁽¹⁾や温度変化⁽²⁾が部分比容 (v) と断熱圧縮率 (β) に大きく影響することを見出し、構造的揺らぎに関する本酵素の特異性を明らかにしてきた。本研究では、DHFR の酵素反応経路に存在する種々の基質や補酵素および阻害剤 (Folate, DHF, NADPH, NADP⁺, MTX) との複合体について v と β を測定し、機能発現における揺らぎの役割を調べると共に、構造の揺らぎと分子内 cavity および水和との関係について考察した。

超音波音速は sing-around pulse method (5.6 MHz)、密度は精密密度計 (Anton Paar-02C) を用いて 30°C で測定し、 v と β を求めた。Apo-DHFR の v (0.741 ml/g) と β (8.1×10^{-12} cm²/dyn) は、リガンドの結合によって $-0.018 < \Delta v < 0.013$ (ml/g)、 $-4.2 < \Delta \beta < 1.7$ (10^{-12} cm²/dyn) の範囲で有意に変化しており、機能発現において揺らぎが重要な役割を果していることが示唆される。Folate や DHF および MTX の結合が β の増加または若干の減少を引き起こすのに対して、NADPH や NADP⁺ の結合は v と β を大きく減少させていた。これらの結果は補酵素結合部位への結合が DHFR の揺らぎを大きく制限することを示している。また、これらの v と β の変化は X 線結晶構造解析のデータを用いて算出した cavity に対して正の相関を示しており、cavity が構造の揺らぎに重要な役割を果していることを表している。発表時には以上の結果の詳細な解析に加えて、THF 複合体の測定結果も併せ、構造・機能・揺らぎの相関について考察を行う予定である。

⁽¹⁾ 神山、石村、大前、月向: 第 35 回生物物理学会年会

⁽²⁾ T. Kamiyama *et al.*, Chemistry Letters 507-508 (1999)

T. Kamiyama, K. Gekko : Effects of ligand binding on the compressibility of DHFR

3PA064

蛋白質の圧縮率に及ぼすジスルフィド結合の影響
○木元昭信、神山 匡、原田 重、月向邦彦
(広島大・理)

蛋白質の構造安定性や機能発現にとってジスルフィド結合 (S-S 結合) は重要な役割を演じているが、構造のゆらぎに対してどの程度寄与しているかについてはまだ十分解明されていない。我々はこれまで断熱圧縮率が蛋白質のゆらぎに敏感に反映することを見出し、圧縮率を決定している構造因子について考察してきた¹⁾。今回は、BSA (S-S; 17 本)、Lysozyme (4 本)、RNaseA (4 本)、Ovalbumin (1 本) をモデル蛋白質として S-S 結合をカルボキシアミドメチル化 (RCAM 化) し、それらの構造変化を円偏光二色性スペクトル及び蛍光スペクトルを用いて調べると共に、断熱圧縮率の測定を通してゆらぎにおける S-S 結合の役割について考察した。

断熱圧縮率の測定は、超音波音速を sing-around pulse method (5.6 MHz) で、密度を精密密度計 (Anton Paar 02C) を用いて 25°C で行った。RCAM 化による S-S 結合の切断により蛋白質の二次、三次構造は崩壊し断熱圧縮率は大きく減少した。また、天然状態の蛋白質では単位質量当たりの S-S 結合の数が増加するにつれ断熱圧縮率は小さくなる傾向を示した。これらの結果は、S-S 結合が構造のゆらぎを抑制しており、その切断によりゆらぎが増大し構造の崩壊をもたらすことを示している。また、S-S 結合で架橋されたポリペプチド鎖ループ内のアミノ酸残基の割合が大きいほど RCAM 化蛋白質の断熱圧縮率は減少した。このことは、S-S 結合が一次構造上で離れた位置にあるほど蛋白質の構造形成に有効に作用していることを示唆している。発表時には β -lactoglobulin (2 本) 及び各蛋白質の酸性条件下での測定結果を加え、ゆらぎに及ぼす S-S 結合の影響についてより詳細な解析結果を報告する予定である。

¹⁾ 月向: 蛋白質・核酸・酵素 41, 2025-2092 (1996)

A. Kimoto, T. Kamiyama, J. Harada, K. Gekko : The effect of disulfide bonds on the compressibility of proteins.