1A1030

硫黄を含まないジヒドロ葉酸還元酵素変異体の性質

○榎 互介、高橋 尚、巖倉 正寛（工技院・生命工研）

タンパク質を構成するアミノ酸の中で、メチオニンとシステインは硫黄原子を含んでいる。これらの含硫アミノ酸は、非含硫アミノ酸よりも容易に酸化される。従って、酵素の耐酸化特性を向上するためには、メチオニンとシステインとを含まない変異体を作成することは有効な手段である。しかし、変異導入の際に野生型程度またはそれ以上の酵素活性を保持するのは容易ではない。

以前の研究に於いて、我々は野生型酵素改良の為のデザイン手法として QAW 法 (Quasi-additive Adaptive-walking with mutant database 法) を考案し、野生型ジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR) の約 10 倍の酵素活性を持つメチオニン及びシステインを含まない変異酵素を作成している [1]。

得られた変異体 DHFR の耐酸化特性を調べるために、この変異体に過酸化水素処理を施し、質量数、酵素活性を処理前と比較した。質量数、酵素活性共に処理前と比べて変化が見られず、実際に酸化を受けていないことが分かった。一方、野生型酵素は同じ処理の後に酵素活性が処理前の 60% であった。結果として、このメチオニンとシステインを含まない変異体の酵素活性と耐酸化性の両方が向上したことが確認された。この結果は、一次構造から含硫アミノ酸をうまく除けば、耐酸化特性のみならず酵素活性をも向上させることが出来る事を示している。

[1] 巖倉正寛, 山子知織, 小澤雅司, 榎 互介 日本農芸化学会 2000 年度大会

K. Maki, H. Takahashi and M. Iwakura : Characterization of a sulfur-free mutant of dihydrofolate reductase

1A1100

ヒト β 2-ミクログロブリンのメタノール資化酵母を用いた大量発現系の構築

○大橋 祐美子¹、萩原 義久¹、星野 大¹、山口 格²、長谷川 一浩²、内木 宏延²、後藤 祐児¹ (¹ 阪大・蛋白研、² 福井医大・第二病理)

β 2-ミクログロブリン (β 2-m) は、高等脊椎動物の細胞膜表面に発現している MHC クラス I 分子の成分であり、長期血液透析患者組織に沈着するアミロイド線維の主要構成タンパク質として見い出される。しかし、どの様な分子機構により β 2-m が立体構造を変化させ、アミロイド線維を形成するのかはほとんど明らかにされていない。我々は、多次元 NMR、及び部位特異的アミノ酸置換法を用いて、上記分子機構をタンパク質の原子、アミノ酸レベルで明らかにする事を計画した。今回、メタノール資化酵母 *Pichia pastoris* を用いて、 β 2-m の大量発現系の構築を試みた。*P. pastoris* を用いた発現系は一般に発現効率が高く、分泌シグナルを導入することにより菌体外にタンパク質を分泌することができるため、精製が容易であると期待された。まず、プラスミド pPIC9 にヒト β 2-m 遺伝子を導入し、相同的組換えにより、 β 2-m を発現する *P. pastoris* 株を作製した。この株を用いてジャーファーマンターによる高密度培養を行い、タンパク質を発現させた。培養上清を DEAE セファロース、及びハイドロキシアパタイトカラムを用いて精製したところ、1L あたり 50mg のタンパク質が得られた。精製タンパク質の質量分析、円二色性スペクトル、2 次元 NMR スペクトルを測定した結果、目的とする β 2-m の得られていることが確認された。さらに、上記 β 2-m を患者組織より抽出したアミロイド線維と 37℃ で反応させたところ、天然ヒト β 2-m の場合と同様、電顕観察によりアミロイド線維の伸長を認め、チオフラビン T を用いた分光蛍光定量法により蛍光量の増加を認めた。伸長反応の至適 pH は、天然ヒト β 2-m と同じ pH 2.5-3.0 付近に認められた。

Y. Ohhashi, Y. Hagihara, M. Hosino, I. Yamaguchi, K. Hasegawa, H. Naiki, Y. Goto : Expression of human beta2-microglobulin by *Pichia pastoris*.

1A1045

化学修飾タンパク質の立体構造安定性と逆疎水効果

○小平 響子、富澤 忠、城所 俊一、曾田 邦嗣（長岡技科大・生物）

近年、蛋白質分子表面の非極性残基は、変性状態で凝集することによって変性状態を安定化し、タンパク質立体構造の安定性を相対的に低下させるという逆疎水効果があることが報告されている。我々は、化学修飾によりタンパク質表面に様々な種類の疎水基を導入し、その安定性を比較することで、タンパク質立体構造安定性へのこの寄与を調べた。ウマ・チトクロム c のタンパク質表面にある 19 個のリジン側鎖アミノ基に 5 種類の酸無水物を反応させ、化学修飾タンパク質（アセチル化、プロピオニル化、ブチリル化、ベンゾイル化）を作成した。等電点電気泳動法などにより、修飾度が 5 のものを分離・精製した。これらの化学修飾蛋白質の円二色性スペクトル (CD) や吸収スペクトルは天然蛋白質と一致しており、立体構造に大きな変化は起きていないと判断された。これらのタンパク質の、尿素及びグアニジン塩酸に対する立体構造変化を CD を用いて観測し、化学修飾の種類による立体構造安定性の違いを比較検討した。pH3.2、15℃ では、2 状態転移を仮定して評価した水中での変性に伴うギブス自由エネルギー変化の大きさは、（未修飾）> プロピオニル化 > ブチリル化 > ベンゾイル化 > アセチル化の順であり、最も修飾基の疎水性が小さいと考えられるアセチル化が最も不安定化の程度が大きく、導入した基の疎水性から予想される逆疎水性効果では水中のギブス自由エネルギー変化は説明できないことがわかった。また、変性中点の変性剤濃度、変性に伴うギブス自由エネルギー変化の変性剤濃度依存性（いわゆる m 値）に関しても疎水性との相関はみられなかった。これらの結果から、化学修飾に伴う立体構造安定性の変化について、実験的に見積もられた逆疎水効果の寄与の上限について議論する。

K.Kodaira, T.Tomizawa, S.Kidokoro and K.Soda : Inverse hydrophobic effect on the stability of chemically modified protein molecule

1A1115

28 残基ポリペプチドの構造と安定性

○安藤 格士¹、目黒 俊幸¹、山登 一郎¹、阿部 寛志²、中西 洋志² (¹ 東理大・基礎工・生物工、² 工技院・生命研)

タンパク質の多種多様な機能はその立体構造に依存しており、その構造はアミノ酸配列により決定づけられている。したがって、タンパク質立体構造の構築原理を解明することは、日々増大するゲノムデータを有効に利用するには必要不可欠である。しかし、個々のアミノ酸残基がタンパク質の安定性にどのように寄与しているかを定量的に評価することはまだ困難である。本研究では、Mayo らが *de novo* 合成し β 3 α 構造を持つとされる 28 残基の小ペプチドをモデル材料とし、各種変異体の熱安定性について実験的な測定と計算機シミュレーションによる定量的評価を行い、各アミノ酸の構造形成に対する寄与を見積もることを目的とした。

まずモデルペプチドの大量調製法を確立した。大腸菌において封入体を形成するタンパク質と融合させ発現させることにより、1 L 培養当たり約 20 mg のペプチドを精製することができた。また、¹⁵N の安定同位体ラベルされたペプチドは 1 L 培養当たり約 5 mg 精製することができた。次に、NMR によりこのペプチドの立体構造解析を行った。これまでのところ、報告されているものとはほぼ同様の構造が得られている。また HSQC スペクトルを測定した結果、構造多形性は認められなかった。構造と安定性に対する個々のアミノ酸の寄与を調べるため 4 種類の変異体 (K8N/F21Y, I7F, K8P, T11E) を作製し、その構造的特徴を NMR により解析した。その結果、全て同様の構造を保っているが、K8N/F21Y, I7F は安定化、K8P, T11E は不安定化していた。これらの要因について考察した。今後、計算機シミュレーションによる定量的評価を行う予定である。

T.Ando, T.Meguro, I.Yamato, H.Abe, H.Nakanishi : Structure and stability of 28-mer polypeptide