1A1345

蜘蛛の糸の赤外直線二色性と水分子吸着によるコンホメーション変化

○宮澤 光博¹、片山 詔久² (¹ 農水省・蚕糸昆虫研、² 北里大・理)

蜘蛛の糸は代表的な繊維蛋白質の1つで、合成高分子に匹敵する弾力性や強靱性を有している。ゲノム研究の進展と共に、球状蛋白質の立体構造が網羅的に解明されるなか、巨大な分子量を有する繊維蛋白質の高次構造や特性の解明も無視できない課題と思われる。本研究は種属が異なる蜘蛛の糸(牽引糸)を対象に取り上げ、FT-IR法を用いて弾力性等、力学的性質を解明することを目的としている。測定は1回反射型 micro-ATR装置と偏光子を組み合わせて行った。クサグモ(*A. limbata*)の糸のアミド吸収帯は顕著な二色性を示し、繊維軸に対するアミド基の配向が大きいことが示された。アミドI吸収帯は1630 cm⁻¹にピークを有し、カーブフィッティング処理によりシート構造が40%程度繊維の中に含まれると推測された。同じ試料に水分子を吸着させると吸収ピークが1620 cm⁻¹にシフトし、同時にシート構造が大幅に増加することが示された。吸着していた水分子が除去されても、コンホメーションが可逆的に変化する様子は見られなかった。一方、ジョロウグモ(*N. clabata*)の糸は1620 cm⁻¹に吸収ピークを示し、シート構造は60%程度と見積もられた。水分子を吸着させてもアミドI吸収帯に変化は見られないが、アミドIIおよびIII吸収帯に含まれるバンドの中で相対強度の変化が観察された。このスペクトル変化は、水分子の存在によって可逆的に変化した。これまで蜘蛛の糸は熱力学的なメカニズムによって弾力性が発現すると考えられているが、本研究では水分子との相互作用も、蜘蛛の糸のコンホメーションや力学的性質に大きく関わると考えられた。

M. Miyazawa and N. Katayama : Linear Dichroism Infrared Spectroscopic Study on Protein Structure of Spider's Thread

1A1415

時間分解ホールバーニング分光法で見る Horseradish Peroxidaseの構造揺らぎ

○柴田 稔(レーザー総研、さががけ21)

多くの蛋白質分子の立体構造が明らかにされ、様々な観測手段の飛躍的な進歩もあり、蛋白質機能の分子論的な解明が進みつつある。そのような中で、蛋白質の立体構造が柔軟であることの重要性が徐々にではあるが強く認識されてきた。蛋白質構造の柔軟さ、揺らぎを明らかにするためにこれまで計算機実験を含め様々な研究手段が用いられてきたが、ナノ秒からミリ秒領域の比較的遅い蛋白質揺らぎのダイナミクスを研究する方法論は、理論、実験ともに未だ確立されたものがあまりない。しかしこのようなナノからミリ秒の時間領域の蛋白質ダイナミクスを明らかにする事は、X線構造解析等で得られる立体構造の詳細と、実際に生体内でミリ秒の時間スケールで発現している蛋白質機能との間のギャップを埋めるために、必要不可欠である。特に時間領域での観測は非常に重要であるが、その重要さに反してこれまでそのような観測の例はほとんどなかった。これまで私はレーザー分光法を使ってナノ秒からミリ秒の比較的遅い蛋白質の構造揺らぎのダイナミクスの時間領域観測を行ってきた。用いてきたのは時間分解ホールバーニング(TRTHB)分光という手法であり、この方法を様々な色素蛋白質に適用してその構造ダイナミクスを明らかにしてきた。その測定原理の詳細は、過去の生物物理学会予稿集や参考文献[Biochemistry, (1999) 38, 1789-1810]等を参照して頂きたい。今回私は、ヘムを含む酵素蛋白質をターゲットにしてTRTHB法を適用し、その構造揺らぎのダイナミクス測定を試みた。試料に過酸化水素分解酵素である、Horseradish Peroxidaseの亜鉛置換体(ZnHRP)を用いた。HRPの基質の一つであるBenzohydroxamic acid(BHA)を結合した場合と、基質フリーの場合のZnHRPの構造揺らぎダイナミクスを比較する。

Y. Shibata : Conformational fluctuation of horseradish Peroxidase observed by time-resolved hole-burning spectroscopy

1A1400

リガンド解離直後におけるミオグロビンのタンパク質構造ダイナミクス

○水谷 泰久¹、北川 楨三² (¹ 分子研、² 統合バイオサイエンスセンター)

タンパク質はそのエネルギーポテンシャル面に多くのローカルミニマムを持ち、それに対応する conformational substates (cs) の間で熱的に絶えず揺らいでいる。タンパク質中で起こる化学反応を理解する上で、このような媒質としてのタンパク質の動きは極めて重要である。ミオグロビンのヘムに結合した一酸化炭素(CO)はヘムの光励起によって解離することが知られている。この光解離反応はサブピコ秒で起こるため、タンパク質の速い構造変化を調べるための良いスタートトリガーになる。また、5配位還元形ミオグロビンの共鳴ラマンスペクトルでは220 cm⁻¹付近に鉄-ヒスチジン伸縮振動($\nu(\text{Fe-His})$)バンドが観測されるが、これはヘムまわりのタンパク質構造変化を反映する有効なマーカーバンドである。そこでわれわれはCO光解離後1ナノ秒までのピコ秒時間分解共鳴ラマンスペクトルを測定し、 $\nu(\text{Fe-His})$ バンドの時間変化に着目して光解離後のタンパク質の構造ダイナミクスを調べた。その結果をまとめると以下ようになる。

- (1) $\nu(\text{Fe-His})$ 振動数は、約100ピコ秒の時定数で2 cm⁻¹低波数シフトし、平衡状態の値へと近づいていった。高粘性の溶媒中では低波数シフトの速度は遅くなり、またタンパク部分のないヘムのモデル化合物では低波数シフトは観測されなかった。したがって、この低波数シフトは光解離後のタンパク質構造の緩和に対応するものと解釈できる。
- (2) $\nu(\text{Fe-His})$ バンドのバンド幅は、10-20ピコ秒の時定数で1 cm⁻¹程度の広がりを示した。われわれはいまのところこれを、光解離後にできたcs間の非平衡な分布が緩和していく過程に対応しているのではないかと考えている。

Y. Mizutani and T. Kitagawa : Protein dynamics of myoglobin right after ligand dissociation

1A1430

時間分割蛍光法によるトリプシンインヒビターの変性過程の解析 II

○平田 孝治¹、加藤 吾朗¹、西本 悦子²、山下 昭二¹ (¹ 九大院・農、² 久留米大・医)

Bovine Pancrease Trypsin Inhibitor (BPTI)を始めとするトリプシンインヒビター群は、一段階F-U転換を示す典型的な蛋白質として知られている。ニガウリ種子より精製されるBitter Gourd Trypsin Inhibitor (BGTI)はさらにS-S結合をもたないことから、さらに単純なF-Uを示す事が期待された。にも関わらず、この間、蛍光特性の解析から、BGTIが2段階の過程を経て変性することを示してきた。今回、これらに加えて、蛍光減衰成分のスペクトル即ちFluorescence Decay Associated Spectrum (FDAS)および時間分割蛍光異方性を解析しBGTIの示す変性中間体の状態を明らかにした。BGTIの蛍光の減衰は3個の指数関数の和で与えられるが、F状態にあるBGTIのFDASは τ_1 , τ_1 , τ_3 。全ての蛍光減衰成分が342 nmに、4M以上のグアニジン塩酸の存在下で観察されるU状態では逆に352nmに極大を与え、中間状態では約1.5ナノ秒の τ_2 、成分は352nmにシフトすることを示した。これらの結果は、9位、54位の2つのTrp残基の1つの近傍は部分的にアンフォールドされ他方は依然としてF状態にあること示す。BGTIの蛍光異方性の減衰はTrp残基の内部運動、蛋白質全体の回転運動にそれぞれ対応する約60ピコ秒、2.8ナノ秒の回転相関時間成分の和により記述された。それぞれの成分の振幅で与えられるTrp残基の運動自由度は中間状態で約15%ほど増加した。この時、蛋白質全体の回転相関時間にほとんど変化は認められなかった。又、U状態においては410ナノ秒にも及ぶ非常に長い相関時間とベプチド鎖の揺動運動に対応する成分が観測され、Trp残基の運動自由度も90%にも達した。これらはFDAS、CDの結果とも一致する。当日は、BGTIの巻き戻しの過程についても併せて報告する。

K. Hirata, G. Kato, E. Nishimoto, and S. Yamashita : Time-resolved Fluorescence Studies on the Unfolding Process of Bitter Gourd Trypsin Inhibitor.