1A1445

テラヘルツ電磁波を用いた遠赤外吸収分光によるタンパク質の低振動モードの追跡

○山本 見司¹、富永 圭介^{1,2}、笹川 拓明²、田村 厚夫^{1,2}、村上 英利³、大竹 秀幸³、猿倉 信彦³ (¹神戸大・理、²神戸大・自然科学、³分子研)

タンパク質立体構造内の揺らぎのうち、ドメイン間およびサブユニット界面間の運動に密接に関係する揺らぎが存在し、機能発現や情報伝達などの重要な働きを担っている。この揺らぎは、タンパク質に存在する多くの運動自由度のうち、少数の集団的な低振動モードにより特徴づけられることが知られている。従って、タンパク質における低振動モードの追跡は、立体構造だけではなく、機能発現に対しても新しい知見を与えるものと期待される。この点に着目し、本研究ではテラヘルツ電磁波を用いた遠赤外吸収によるタンパク質の集団的低振動モードの追跡を行った。

遠赤外吸収スペクトルの測定は、サブピコ秒のテラヘルツ電磁波と偏光フーリエ干渉分光器、および検出器としてボロメーターを用いて行った。テラヘルツ電磁波は、フェムト秒チタンサファイアレーザーの800 nmの超短パルス光を、磁場の印加した半導体表面に集光して照射することにより発生させた。測定試料には、天然状態、変性状態、モルテン・グロビュール状態の凍結乾燥させたウマ心筋チクロムcを、厚さ数百マイクロメートルに圧縮生成したペレットを用いた。観測された遠赤外吸収スペクトルを右図に示す。ウマ心筋チクロムcの遠赤外吸収は、50 cm⁻¹より低波数領域では構造に依存せず、振動数の増加に伴って増加することが分かった。また、この波数領域での吸収スペクトルには構造に依存した顕著な差が観測されなかった。

図 ウマ心筋チクロムcの遠赤外吸収スペクトル

K. Yamamoto, K. Tominaga, H. Sasakawa, A. Tamura, H. Murakami, H. Ohtake and N. Sarukura : Far infrared absorption spectra of low-frequency modes of proteins measured by THz radiation

1A1515

NMR 分光法によるリゾチーム 2SS 体: 2SS[6-127,30-115], 2SS[64-80,76-94] の構造解析

○宮内 弘世¹、松永 真由美¹、野田 康夫¹、橘 秀樹²、瀬川 新一¹ (¹関学大・理、²神戸大・理)

蛋白質の折りたたみ反応の中間体として、SS結合を欠損したリゾチーム変異体の研究を行ってきた。今回は、2本のSS結合を欠損したリゾチーム変異体、すなわち、 α ドメイン内に2本のSS結合を有する2SS[6-127,30-115]と、 β ドメイン内に2本のSS結合を有する2SS[64-80,76-94]である。CDスペクトルの測定から、2SS[6-127,30-115]には明瞭な立体構造が存在し、一方2SS[64-80,76-94]では秩序構造が失われていることが報告されてきた。今回、我々は15Nでラベルした上記2種類のリゾチーム変異体を作製し、そのHSQCスペクトル、また3次元のNOESY-HSQC、TOCSY-HSQCスペクトルを観測した。その結果、2SS[6-127,30-115]のHSQCスペクトルは、天然型4SS体リゾチーム (metLYZ) のものと非常に良く似ていることが分かった。一方2SS[64-80,76-94]に対しては交差ピークの数も少なく、NHプロトンの化学シフト値が7.5~8.5に集中したランダムコイル特有のスペクトルが観測された。これらの結果は、CDスペクトルによる観測結果と同様、 α ドメインの2本のSS結合がリゾチームの立体構造を保持する為に不可欠であることを示している。ピークの帰属は現在進行中であるが、 β ドメイン内の数残基の交差ピークがHSQCスペクトル上から消失している。しかし一方では、 β ドメイン内の多数の残基が天然4SS型リゾチームと同様の位置に明瞭な交差ピークを示しており、興味深い実験結果である。立体構造上のどの部分が融解しているか、残基レベルの分解能で明らかにする予定である。一方2SS[64-80,76-94]の構造に関しては、ランダムコイル領域から分離した50個程度の交差ピークの帰属を試みる。

H.Miyauchi, M.Matunaga, Y.Noda, H.Tachibana and S.Segawa : A structural study of 2SS variants of hen lysozyme : 2SS[6-127,30-115], 2SS[64-80,76-94] by NMR spectroscopy

1A1500

紫外共鳴ラマン分光法を用いたサブミリ秒時間領域におけるアポミオグロビンのフォールディング反応の追跡

○春田 奈美¹、北川 禎三^{1,2} (¹総研大・数物科・機能分子科学、²分子研)

244 nm 励起の紫外共鳴ラマン分光法は、Trp 残基や Tyr 残基等の芳香族アミノ酸残基の構造、及び周囲環境に敏感に反映するので、蛋白質の構造変化を追跡するのに強力な手法である。そこで我々は、アポミオグロビンのフォールディング反応を Trp 残基由来のバンドの変化で追跡し、中間体の構造に関する情報を得た。それを定常状態酸変性過程のスペクトルのものと比較しながら議論する。連続フロー型高速混合装置を用いることで時間分解能を上げ、本研究では反応開始後300マイクロ秒からのスペクトルを得ることに成功した。Trp 側鎖の二面角と相関して波数変化を示す W3 のバンドは、天然状態では1560 cm⁻¹に中心波数を持つのにに対し、pH 2.5以下の酸変性状態の波数は1553 cm⁻¹であった。これはポリペプチド鎖がランダム構造であるために、Trp 残基の側鎖の構造も自由に回転しているものと推測される。この W3 のバンドはリフォールディング反応開始後、300マイクロ秒ですでに始状態の1553 cm⁻¹から1558 cm⁻¹への波数シフトを示した。この W3 のバンドの波数は、酸変性過程で観測された中間体の波数に近く、中間体で Trp 残基がある構造をとっている可能性を示唆するものである。アポミオグロビンは、変性過程においてもフォールディング過程においても A.G.H-ヘリックスが疎水性コアを形成しているといわれているが、Trp14はちょうど A-ヘリックス上にあり天然状態では側鎖が G.H-ヘリックスと相互作用している。この W3 バンドの波数シフトは疎水性コアの形成を直接検出しているものと考えられる。一方、W7 バンドのダブルレット比は疎水性環境及び極性環境に敏感に反映する。Trp 残基の周囲環境は1ミリ秒までに、徐々に Trp 残基の周囲環境は疎水性環境が高まっていることが分った。

N.Haruta and T. Kitagawa : The submillisecond folding process of apomyoglobin probed by UV resonance Raman spectroscopy

1A1530

NMR 分光法によるリゾチーム 3SS 体: C64A/C80A、C30A/C115A の構造解析

○谷阪 喜昭¹、平井 健一¹、横田 篤²、野田 康夫¹、橘 秀樹³、瀬川 新一¹ (¹関学大・理、²大工技研、³神戸大・理)

ニワトリ卵白リゾチームには、4本のジスルフィド結合 (SS結合) が存在する。我々はSS結合再生中間体の構造を調べるために、SS結合をそれぞれ1本ずつ欠損した変異体リゾチーム (3SS体) を作製し研究を行ってきた。今回注目したのは、C64-C80結合 (SS3; β ドメイン内に架かる) である。SS3欠損体は、 β ドメイン構造の不安定化が予測される興味ある3SS体であったが、NMRスペクトル上の帰属可能なピークの数他は他の3SS体と比べて著しく少なく、ほとんどアサイメントが進んでいなかった。そこで今回、15NラベルしたSS3欠損変異体を用いる事により、TOCSY-HSQC、NOESY-HSQCスペクトルを測定し詳細なアサイメントを試みた。そして現在、104残基のピークのアサイメントに成功している。交差ピークが消失ないしは不明の残基が β シートに集中しているため、SS3欠損の影響が β シート全体に広がっている事が推測される。また、SS2結合欠損体 (C30-C115をSS2と呼ぶ) のHSQCスペクトル上で重水素交換反応を観測した。BヘリックスとDヘリックス境界面領域の水素結合網が消失している事実を見出した。以上の結果について報告する。

Y.Tanisaka, K.hirai, A.Yokota, Y.Noda, H.Tachibana and S.Segawa : Structure analysis of 3SS variants of hen lysozyme : C64A/C80A, C30A/C115A by means of NMR spectroscopy