1A1600

シトクロム c の折れたたみ過程における二次構造形成：低温ストップフロー測定

○西郷 敏、柴山 修哉、山本 栄治（自治医大・物理）

分子量が1万を越える、単一ドメインからなる多くのタンパク質の折れたたみ反応の初期に、通常のストップフロー（S F）法の不感時間以内に終わる速い相がある。この相は、タンパク質が変性状態Uから折りたたまれた状態Fへ変化する途中に、コンパクトな中間状態Icを形成する過程に対応している。近年、この初期過程を調べるために、さまざまな高速測定法が開発され、研究が進展している。

我々は、凍結防止剤NaClやLiClなどの共存下、 -35°C までの低温でS F法を実現し、これによりウマ・シトクロム c の折りたたみ反応を測定した。分子のコンパクト化を反映する Trp 59 の蛍光強度をプローブとして反応を観測すると、 $U \rightarrow Ic$ 過程が非指数関数的、 $Ic \rightarrow F$ 過程が指数関的な時間変化をする相として観測されることは、既に報告した。今回、円二色性をプローブとする低温S F装置を開発し、上記の反応を観測した。

$4-5\text{ M}$ の LiCl 共存下、 $\text{pH } 6.5$ 、 -35°C で、グアニジン塩酸によりU状態にしたシトクロム c をS F装置により急速希釈して折れたたみ反応を開始させた。His 残基の誤った配位により、反応が遅延することを防ぐため、 0.1 M のイミダゾールを共存させ、 230 nm の円二色性で反応を追跡した。 $U \rightarrow Ic$ および $Ic \rightarrow F$ 過程の時間経過は、蛍光強度で測定した場合と同様であった。しかし、平衡移動曲線のF状態およびU状態のベースラインの直線性を仮定して見積もると、ヘリックス構造の量は、 $U \rightarrow Ic$ 過程ではF状態の量の約10%しか出ていないことが分かった。また、同様な実験を、 5°C 、中性塩が共存しない条件で行うと、 $U \rightarrow Ic$ 過程で生成するヘリックス構造の量は約30%であった。生成されるヘリックス構造の量の溶媒条件に対する依存性や他の研究者による測定結果との関連についても述べる。

S.Saigo, N.Shibayama and E.Yanamoto : Secondary-structure formation during the refolding of cytochrome c: A low-temperature stopped-flow study

1A1630

二つの蛋白質フォールドンの融合による蛋白質巻き戻り機構の変換

○稲葉 謙次¹、Fersht Alan²（¹京大・ウイルス研、²英国MRC）

蛋白質の普遍的な巻き戻り機構を解明することは、現在の蛋白質科学の大きなテーマの一つである。これまでの数多くの蛋白質に関する巻き戻り機構の研究の結果、蛋白質の大きさ、Nucleation Siteの数が巻き戻り機構を制御する大きな要因であると考えられる。つまり、アミノ酸数が約100以下の蛋白質の多くは、U状態とN状態の二状態転移を示すのに対し、アミノ酸数が100以上の大きな蛋白質は、巻き戻り反応中において中間状態を示すことがよく見られる。本研究では、このような蛋白質巻き戻り機構の制御因子に関するより深い知見を得るために、以下の実験系を考案した。二状態転移を示すことが示されている64のアミノ酸からなる蛋白質CI2のループ領域にもう一つのCI2分子を挿入した融合蛋白質(Double-CI2)を遺伝子工学的に作製し、その構造及び巻き戻り機構を天然型CI2と比較検討した。蛍光、CD、NMRを用いた構造解析の結果、挿入したドメイン・されたドメイン共に天然型CI2に類似した三次構造を保持していることが判明したが、弱いNMRシグナルが余分に1セット観測されたことから、Double-CI2についてマイナーな天然構造が存在するものと推測される。ストップフロー蛍光法による巻き戻り反応の速度論的解析においても、これら二つの天然構造に由来したrefolding, unfoldingの成分が観測された。興味深いことに、Double-CI2の巻き戻り速度の対数と変性剤濃度のプロット(Chevron plot)をとって見たところ、天然型CI2とは異なり、低変性剤濃度において顕著な直線関係からのずれが観測された。この結果は、天然型CI2の巻き戻り機構が二状態転移で記述されるのに対し、Double-CI2は巻き戻り反応中に中間状態をとっていることを示唆している。以上の結果は、蛋白質の巻き戻り機構が蛋白質の大きさ、Nucleation Siteの数によって制御されているという考えを支持するものである。

K.Inaba, A.R.Fersht : Conversion of two-state to multi-state folding kinetics on fusion of two protein foldons

1A1615

蛋白質の折れたたみ機構と折れたたみ速度との相関

○伊倉 貞吉^{1,2}、Alan R. Fersht¹（¹Centre for Protein Engineering、²東大・院理・物理）

バルナーゼの細胞内インヒビターであるバルスターは、2つのパラレルな経路を通して折れたたまれる。両経路の違いは、Tyr 47-Phe 48のペプチド結合が折れたたみ過程においてシス状態にあるか、あるいはトランス状態にあるかという点である。しかし、昨年の年会で報告したように、トランス経路ではシス経路に比べ、バルスターは約10倍も速く折れたたまれることから、両経路での折れたたみ機構が全く異なっていることが予想された。本研究では、バルスター分子全体を網羅するように34個所でアミノ酸残基に変異を導入してΦ値解析を行うことにより、両経路におけるバルスターの折れたたみ機構をアミノ酸残基レベルの解像度で解析した。両経路上の折れたたみ機構における顕著な違いは、折れたたみ初期段階に見られた。トランス経路ではほとんどの残基でΦ値が1または0であり、また、折れたたみの進行に伴い天然様の相互作用が逐次形成されて行く様子が観測された。一方、シス経路では多くのΦ値が1と0の中間に分布し、折れたたみの進行に伴って弱い相互作用が広範囲にまで広がる様子が観測された。前者はリプレッサーの場合のような逐次的な折れたたみ過程に、後者はCI-2の場合のような核-凝縮機構による折れたたみ過程に、それぞれ対応していると考えられる。また、トランス経路ではシス経路に比べ折れたたみ速度が著しく速いことは、リプレッサーが速く折れたたまれるのに対しCI-2の折れたたみ速度が比較的遅いこととよく対応している。バルスターの折れたたみ反応の解析をもとに、タンパク質の折れたたみ機構と折れたたみ速度との関係について議論する。

T.Ikura and A.R.Fersht : Correlation between folding-mechanism and folding-rate in protein folding

1A1645

イヌ・ミルク・リゾチームの精製とフォールディング機構の研究

○中尾 正治¹、新井 宗仁¹、小柴 琢己²、新田 勝利²、桑島 邦博¹（¹東大・院理・物理、²北大・院理・生物科学）

Ca^{2+} 結合タンパク質であるイヌ・ミルク・リゾチーム(CLZ)は、平衡条件下において安定なモルテン・グロビュール(MG)状態を形成する。このMG状態は、 α -ラクトアルブミンや他のリゾチームと比較してより安定であり、分子内部に秩序化した構造を持っていることが明らかになっている【1】。CLZが巻き戻り反応において、平衡条件の場合と同様に安定かつ構造を持ったMG状態を中間体として蓄積するかどうか、また、その中間体が巻き戻り反応のどの段階で形成されるのかを調べることは非常に興味深い。さらに、ここで得られた結果を、構造上同一ファミリーとして分類されるタンパク質の巻き戻り反応と比較することによって、タンパク質のフォールディング機構を解明する上での有益な知見を得ることが期待される。そこでCLZの巻き戻り過程を調べるために、大腸菌による発現系を用いてCLZの大量発現を行い、精製した。CLZのインクルージョンボディを可溶化した後、酸化型及び還元型チオレドキシンを用いて正しいジスルフィド結合を形成させながら巻き戻しを行った【2】。その後20mMの Ca^{2+} イオン存在下でイオン交換を行い、さらに逆相HPLCで分取することにより、精製されたCLZを得た。本発表では蛍光やCDをプローブとして、平衡条件下におけるCLZのアンフォールディング転移、及び巻き戻り反応とアンフォールディング反応を測定した結果を報告する予定である。さらに、他のリゾチームや α -ラクトアルブミンの結果と比較して考察したい。

【1】Koshiha et al.(2000) *Biochemistry*, **39**, 3248-3257

【2】Koshiha et al.(1999) *Protein Engng.*, **12**, 429-435

M.Nakao, M.Arai, T.Koshiha, K.Nitta and K.Kuwajima : Purification and folding study of canine milk lysozyme