1C1145

進化の模倣による格子模型における配列の構成

○高原 哲士 (杏林大・医・物理)

目的：多くの遺伝子配列は構造に関して縮退しており、特定の規則性を持った安定な構造が進化の過程で選択されていると考えられる。そこで特定の構造をネイティブ構造として持つフォールドしやすい配列を作るというのが狙いである。格子模型では配列が与えられるとコンパクトな配位を全て調べることができるので、配列空間の探索が容易である。方法：遺伝的アルゴリズムを用い、適応度にターゲット構造との類似度を用いて、配列を形成する。

S. Takahara : Constructing sequences for lattice model by simulating evolution

1C1330

2 次構造からみたリボヌクレアーゼ A の圧力-温度相図

川上 泰広、○加藤 稔、谷口 吉弘（立命館大・理工）

蛋白質の構造安定性を議論する上で、変性-未変性に関する p-T 相図はその出発点となる。しかしながら、相図を得るには、高圧力下での測定が必要となり、その実験的な困難さから、これまで得られた相図は非常に限られている。さらに、それらのほとんどが UV あるいは蛍光分光法による local な残基をプローブとした手法によるものであった。本研究では、赤外吸収スペクトルから得られる 2 次構造情報に基づいた変性相図を決定する。今回我々は、構造安定性のモデル蛋白質としてよく取り上げられてきたリボヌクレアーゼ A を対象とした。

蛋白質の 2 次構造の観測方法としては、CD および赤外分光法がよく知られているが、前者は高圧下での窓材の偏光解消度の変化のため測定が困難である。我々は、温度可変型ダイヤモンド・アンビル・セル (DAC) を用いて、温度 (約-10～80 C) 圧力 (<約 1000 MPa) の範囲で、アミド I バンドを測定した。差スペクトル法を用いて、ベータシートに帰属されるピークの強度変化を求めた。これより各温度・圧力での変性・未変性の存在割合を見積もり、相図を決定した。

リボヌクレアーゼ A は、すでに UV 法および His 残基をプローブとした ¹H NMR 測定による相図の報告があるが、これらと比較して今回得られた相図は、前者のいずれの相図よりも未変性領域が広がった。このことは、2 次構造が 3 次構造より安定であることを示している。さらに、熱変性と圧力変性でのスペクトルの形状は異なっており、それらの変性状態が、2 次構造レベルで異なっていることが示唆された。

Y. Kawakami, M. Kato, and Y. Taniguchi : Pressure-temperature phase diagram of ribonuclease A

1C1315

モジュールを欠失させたミニバルナーゼの構造安定性と二状態フォールディング

○高橋 健一¹、野口 俊之²、北條 裕信³、大久保 忠基⁴、郷 通子¹ (¹ 名大・院理、² 佐賀医大・医、³ 東海大・工、⁴ 阪大・薬)

蛋白質の構造単位の一つであるモジュールは、平均 15 残基長のコンパクトなポリペプチド・セグメントである。モジュールはまた遺伝子の分断構造と相関を示し、蛋白質の進化の単位であったことが示唆されている。蛋白質の構造形成に何かモジュールが関わっているのだろうか？枯草菌由来の RNase であるバルナーゼ (110 残基) は六つのモジュールから構成される。その中でもっとも独立しているモジュール M2 に対応する 26 残基を欠失させたミニバルナーゼを化学合成し、構造に与えるモジュール欠失の影響を調べた。化学合成の際疎水性コア周辺の 10 残基に ¹⁵N 標識のアミノ酸を導入し、NMR による HSQC スペクトルを測定した。標識した部位のシグナルの位置が天然のバルナーゼのものとよく一致したことから、ミニバルナーゼはバルナーゼと同様の疎水性コアを形成することがわかった。またそのフォールド状態と同時に、HSQC スペクトルにはアンフォールド状態のシグナルも弱く出現したが、それら二状態以外は検出されなかったことから、ミニバルナーゼにおいても二状態遷移の特徴が保たれていることがわかった。フォールド状態の安定性に関しては、酸・熱変性実験の結果、バルナーゼに比べミニバルナーゼの安定性は落ちていることがわかった。以上まとめると、モジュール M2 の欠失が、バルナーゼの安定性に関しては影響を与えなかった。一方、ほぼモジュール M1 に対応する N 末端 22 残基を欠失させたバルナーゼに、弱い活性が残っていることが報告されている。これらの実験結果から、蛋白質の構築に際してモジュールをほぼ独立に扱えることが示唆され、また蛋白質の進化もその原理を利用していたことが示唆される。(文献：K.Takahashi *et al.*, Protein Engineering 12(8), 673-680, 1999)

K.Takahashi, T.Noguti, H.Hojo, T.Ohkubo and M.Go : Conformational stability and two-state folding of a module-deleted mini-barnase

1C1345

プリオン蛋白とβラクトグロブリンの高圧NMR測定

桑田 一夫¹、李 華²、後藤 祐児³、赤坂 一之²、○James Thomas⁴ (¹ 岐阜大・医学部・生理、² 神戸大院・自然科学、³ 阪大・蛋白質研、⁴ UCSF)

ウシβラクトグロブリンは、時に、ミルクアレルギーを引き起こし、新生児突然死症候群 (SIDS) の原因となりうる。またβバレル構造を有し、構造形成途中でα→β転移を行う。一方、プリオン蛋白は、α→β転移を行い、プリオン病の発症に関係する。プリオン病では「ウシ」の「肉」を「摂取」することが、また、ミルクアレルギーでは「ウシ」の「ミルク」を「摂取」することが原因であり、時相は異なるが、ともに「α→β転移」が関係するという点で、両者はどこか関連しているように思われる。正常のプリオン蛋白は、N端はランダムに近い構造を取っているが、C端は3本のヘリックスからなる。高圧下 (2500 気圧) では、ヘリックスは壊れるものの、N端のランダムに近い構造の中でも特に、疎水性のコアを形成している部分は保たれていた。ここでのHSQCスペクトルは、プリオン蛋白で見られるモノマーβ型に近かった。低温・高圧下では更に疎水性コアも破壊されたが、この反応自体は可逆的で、アミロイドを形成する傾向は見られなかった。このように、正常のプリオン蛋白は、高圧負荷に対しても可逆的である。然し、ヘリックス部分と疎水性コア部分で、明らかな安定性の違いが認められた。一方、βラクトグロブリンは1500～2000 気圧で可逆的な高圧変性を示した。またバレルの裏側 (FGHシート、疎水性コアを形成) と表側 (BCDEシート) で、明らかに安定性の違いが認められた。プリオン蛋白とβラクトグロブリンにおけるいわゆる遅い揺らぎ (体積揺らぎ、スローダイナミクス) は、疎水性コアとそれ以外の部分で乖離しており、この乖離が蛋白の持つ生物活性或いは病原性と深く関連していると考えられる。

K.Kuwata,L.Hua,Y.Goto,K.Akasaka,T.L.James : High Pressure NMR measurement of prion and beta-lactoglobulin