2A1330

エタノールによるニワトリ卵白リゾチームのアミロイド形成：X線小角散乱法による研究

米澤 康滋¹、田中 晋平²、久保田 智巳²、若林 克三³、油谷 克英⁴、○藤原 悟⁵ (¹筑波技短大、²工大院・生命研、³阪大院・基礎工、⁴阪大・蛋白研、⁵原研・先端基礎研究センター)

アルツハイマー病、プリオン病等アミロイドーシスでは、蛋白質がアミロイドと呼ばれる不溶性繊維状の沈殿を形成し、組織に沈着するという特徴を持っている。アミロイド形成機構を明らかにすることは、このようなアミロイド疾患の治療、予防を考えるうえで重要である。郷田らはニワトリ卵白リゾチーム (HEWL) が高エタノール濃度溶液中でアミロイド状の沈殿を形成することを見いだした[1]。HEWLは試験管内において条件を人為的に制御できるアミロイド形成のモデル蛋白質となりうる。我々は、HEWLにおけるアミロイド形成機構を明らかにする目的で、X線溶液散乱実験を行った。0-90%の種々のエタノール濃度において、蛋白質濃度2-10 mg/mlの溶液を調製し、そのそれぞれについてX線溶液散乱曲線の測定を行った。測定は、KEK・PFビームライン BL-15Aを用いて行った。得られた散乱曲線はギニエプロット及び断面のギニエプロットにより解析した。その結果、エタノール濃度60%以下においてはHEWLは単量体として存在することが示された。また、エタノール濃度70%以上においては、HEWLは、エタノール濃度および蛋白質濃度の関数として、球状の粒子凝集体、フィラメント状の凝集体、それがさらに会合したものとして存在することが示された。このことは、HEWLにおけるアミロイド形成は、球状粒子から繊維状構造体であるプロトフィラメントの形成、そしてプロトフィラメントの会合によるアミロイドの形成という2段階の過程により起こることを示唆している。[1] Goda et al. *Protein Science* (2000) 9, 369.

Y.Yonezawa, S.Tanaka, T.Kubota, K.Wakabayashi, K.Yutani, and S.Fujiwara : Ethanol-induced amyloid formation of hen egg-white lysozyme: a small-angle X-ray scattering study

2A1400

X線小角散乱を用いたシャペロニン GroES の Gdn-HCl 変性と熱変性の比較

○日暮 卓志¹、柊 弓絃²、市村 薫³、溝端 知宏¹、永井 純¹、河田 康志¹ (¹鳥取大・工・生物、²京大・化研、³獨協医科大・医・生化)

シャペロニン GroES は、蛋白質のフォールディングを補助することで知られている分子シャペロンの一つである。GroES は 10 kDa の単量体が7つ会合してリング状の立体構造を形成している。GroES は Gdn-HCl 変性状態そして熱変性状態から、可逆的に再生することが知られている。我々は GroES の Gdn-HCl 変性と熱変性に関する立体構造的な知見を得るため X 線小角散乱測定 (SAXS) を試みた。

(1) Gdn-HCl 変性: GroES 溶液を様々な Gdn-HCl 存在下で変性させ、SAXS 測定した。Rg および J(0)/C の変化から、Gdn-HCl 濃度が 1.1 M で変性と解離が同時に起きることが判明した。2.5 M Gdn-HCl 存在下で完全に変性させた状態の GroES の Rg は 34 Å であった。

(2) 熱変性: 0.5 M Gdn-HCl を含む GroES 溶液を 40°C から 70°C まで 2°C おきに測定した。この条件下では 60°C 付近が変性の中点で、65°C 以上で GroES は完全に変性した。Rg を求めると、Native では 32 Å となり、熱変性状態では 27 Å であった。これらより、熱変性状態は Gdn-HCl 変性に比べコンパクトな変性状態であることが判明した。また、SAXS 測定で用いた GroES 濃度範囲では GroES 7 量体の解離と変性はほぼ同時に起きていることもわかった。

(3) 変性の可逆性: Gdn-HCl 変性状態および熱変性状態から再生させた GroES の立体構造情報を調べた。その結果、Rg および Kratky plot のプロファイルは Native のものと良く一致した。このことから 7 量体である GroES は Gdn-HCl 変性および熱変性状態から立体構造的にほぼ完全に再生することが明らかになった。

T. Higurashi, Y. Hiragi, K. Ichimura, T. Mizobata, J. Nagai, and Y. Kawata : Structural Comparison of Gdn-HCl Denaturation and Heat Denaturation of Chaperonin GroES monitored by Small-Angle X-ray Scattering

2A1345

シャペロニン GroES の溶液 X 線散乱プロファイルの解析

○関 安孝¹、日暮 卓志²、市村 薫³、柊 弓絃⁴、河田 康志²、城所 俊一¹、曾田 邦嗣¹ (¹長岡技科大・生物系、²鳥取大・工・生物、³獨協医科大・医・生化学、⁴京大・化研)

分子シャペロンである GroEL, GroES は 14 量体, 7 量体の蛋白質であるが、両者が複合体を形成することで他の蛋白質の折れ畳みを助ける機能を発現する。複合体を形成する際に、大きな構造変化をすることが確認されているが、現在のところ構造情報が断片的でその詳細は解明されていない。また多量体であるこれらの蛋白質が、変性に伴ってどのように構造変化して単量体への解離が起こるかは非常に興味深い。一方溶液 X 線散乱 (SXS) 法は、分子の大きさ (平均自乗半径: R_{eq}) や形状などの大局構造の情報を与える優れた測定方法である。我々はこれまで、比較的小さな蛋白質の天然 (N) 状態及び非天然 (D) 状態の構造情報を抽出するため、分子モデリング法と SXS シミュレーション法の開発およびこれを用いた解析を行ってきた。これにより多様な構造の集団からなる D 状態について、より多くの情報を抽出することに成功した。本研究の目的は、この手法を GroEL, GroES に適用し、各々の N 構造の揺らぎと変性に伴う構造変化、及び単量体への解離を調べることである。

GroEL の Gdn-HCl の添加による構造変化と解離を調べた結果、 R_{eq} と前方散乱強度の変化は、ほぼ同じ変性中点をもって協同的に変化する事がわかった。これは 14 量体の解離と構造変化がほぼ同時に起きていることを示している。また N 状態の GroEL について、GroES 結合状態の GroEL の構造と GroEL 単独の構造について、それぞれの結晶構造からの SXS プロファイルを求めた。その結果両者は有意に異なり、SXS 法が蛋白質の構造変化の検出に有効であることが確認された。年會では、GroES の N 状態、Gdn-HCl 変性状態の構造について、実測と分子モデリングとの比較を中心に発表する。また、変性の中間体としての折り畳まれた単量体の有無についても議論したい。

Y.Seki, T.Higurashi, K.Ichimura, Y.Hiragi, Y.Kawata, S.Kidokoro and K.Soda : Analysis of the Solution X-ray Scattering Profile of Chaperonin GroES

2A1415

X 線小角散乱による圧力効果の研究ーIー 高圧セルの開発と Cytochrome-C への応用

○西川 幸宏¹、藤澤 哲郎¹、守時 正人² (¹理研播磨・構造生物化学、²湊川鉄工所)

SPRING-8・理研 Beamline-I (BL45XU) での X 線小角散乱 (SAXS) 測定のための高圧容器装置を開発した[1]。20 倍の増圧器を内蔵することで、従来の加藤・藤澤[2]により使用されていた容器より小型になり、必要な試料の体積は 400 μ l である。試料室内で、5000 bar までの静水圧を印加することが可能である。Cytochrome-C を用いた蛋白質溶液散乱測定を行った。用いた濃度は、5.0、2.5、1.0 mg/ml で、露光時間は 5 mg/ml で 1.2 秒、1.0 mg/ml で 1.5 秒であった。1 mg/ml の低濃度で 5000 bar での溶液散乱を観測することが可能であった。また、濃度外挿による解析も可能であり、常圧での溶液散乱とほとんど変わらない条件での測定が可能である。Guinier プロットにより解析を行い、Rg は 5000 bar で 2.6% だけ小さいという結果を得た。

[1] Y. Nishikawa, T. Fujisawa and M. Moritoki, *Nucl. Inst. and Meth. in Phys. Res. A*, in preparation.

[2] M. Kato and T. Fujisawa, *J. Synchrotron Rad.* 5, 1282 (1998).

Y. Nishikawa, T. Fujisawa and M. Moritoki : SAXS study on pressure effects - I -; Development of High-pressure Cell and Application for Cytochrome-C solution