2A1430

X線小角散乱による圧力効果の研究—II—
タンパク質複合体アポフェリチンの圧縮率直接計測
 藤澤 哲郎¹、西川 幸宏¹、○猪子 洋二² (¹ 理研播磨・構造生物化学、² 阪大院・基礎工・生物工)

放射光 X 線溶液散乱を用いてタンパク質構造に対する圧力効果研究の一貫としてタンパク質複合体であるアポフェリチンを用いた。アポフェリチンは分子量 19800 の分子が 21 個正 12 面体状に並んで厚み 35 Å、半径 51 Å の球殻構造を形成している。

下図は 500Mpa まで昇圧した時の散乱曲線の変化である。散乱曲線が横軸にシフトして、相似形であることからアポフェリチンが乖離をおこさずに半径のみが縮んでいることがわかる。圧縮率を計算したところ 5000 気圧で約 2% 減少した。これは小さいタンパク質と比較してかなり小さい値となった。

T. Fujisawa, Y. Nishikawa and Y. Inoko : SAXS study on pressure effects -II- The direct measurement of the compressibility of protein complex, apoferritin

2A1500

中性子非干渉性弾性散乱による Staphylococcal nuclease のガラス転移の研究

○中川 洋¹、上久保 裕生²、筑紫 格³、金谷 利治⁴、片岡 幹雄¹ (¹ 奈良先端大・物質創成、² 高工研・物構研、³ 千葉工大、⁴ 京大化研)

蛋白質の天然構造の揺らぎには、1つの構造状態近傍の調和的な振動運動と、異なる構造状態間の遷移によって生じる非調和的な運動がある。これらの複雑な運動は、蛋白質の構造状態や周囲の溶媒環境による影響を受けていると考えられる。従って構造状態や溶媒環境によって異なる蛋白質動力学を調べることは、蛋白質の動的な現象である折り畳みや機能発現のメカニズムを解明するために必要である。本研究では Staphylococcal Nuclease (SNase) の野生型と折り畳まれていない変異体の各々について、水和試料と脱水試料を用いて、2つの異なるエネルギー分解能の中性子非干渉性弾性散乱実験を様々な温度で行った。そして SNase が折り畳まれかつ水和し、機能発現可能な状態になることで現れる蛋白質動力学の特徴を解明することを目的とした。まず野生型の SNase について、脱水和状態では 1 μ eV と 1 m eV の分解能の測定で調和的な運動が蛋白質内で支配的であることが示された。水和試料では、2つのエネルギー分解能で共に約 150 K で平均自乗変位に小さな転移 (ガラス転移) が見られ、1 μ eV のエネルギー分解能の測定で約 250 K ではさらに大きなガラス転移が観測された。これらの転移は、調和的な運動に加えて非調和的な運動が現れてきたことに由来すると考えられる。また折り畳まれていない変異体の SNase について、1 μ eV 分解能で同様の実験を行ったところ、水和試料では野生型と同様のガラス転移が見られ、脱水和試料では調和的な運動のみでガラス転移は見られなかった。従って、約 250 K 以上の非調和な運動は折り畳まれることで獲得されるものではなく、水和することでポリペプチドが獲得する運動であることが示された。

H.Hiroshi, H.Kamikubo, I.Tikusi, T.Kanaya, M.Kataoka : Glass transition of Staphylococcal nuclease studied by incoherent elastic neutron scattering

2A1445

X線小角散乱による圧力効果の研究 —III—
カルモデュリン Ca²⁺ 結合構造変化の圧力による模倣

○藤澤 哲郎¹、西川 幸宏¹、能野 秀典² (¹ 理研播磨・構造生物化学、² 札幌医大・化学)

カルモデュリンは 148 残基の dumbbell 型の構造をしている。Ca²⁺ 結合タンパク質である。結晶構造や高分解能 NMR の仕事より Ca²⁺ 結合により疎水性残基が表面にで標的タンパク質と相互作用を行うと考えられている。圧力を加えると溶液中のタンパク質をより低いエントロピー状態すなわち、非極性残基が水と結合し、結果として

系全体が体積が縮む方向に進む。Ca²⁺ フリーの牛脳より精製されたカルモデュリン 1.5mg/ml, 0.4ml を温度 15℃ で加圧した。その結果、加圧する事により Ca²⁺ 結合時と近い回転半径 (Rg) が得られ、2000 気圧以上ではより大きな構造となった。しかし、圧力を戻しても I(0) は変化しないことから会合せず分子が変形したと考えられる。

T.Fujisawa, Y.Nishikawa and H.Yoshino : The mimicry of Ca²⁺ induced structural change of calmodulin by hydrostatic pressure

2A1530

分子表面上での疎水性残基から親水性残基への置換がヒトリゾチームの立体構造・安定性・水和構造に及ぼす影響

○松橋 順¹、高野 和文¹、山縣 ゆり子²、油谷 克英¹ (¹ 阪大・蛋白研、² 阪大院・薬)

近年蛋白質を取り囲んでいる水和水が蛋白質のダイナミクスに大きな影響を及ぼすことが明らかにされてきたものの、蛋白質と水との相互作用に関しては不明確な点が多い。分子表面残基は水と直接相互作用しているため、分子表面での置換が、蛋白質の安定性、構造、さらには水和構造などに及ぼす影響を系統的に調べることは、水和の役割を明らかにする上で重要である。

本研究では、ヒトリゾチームの分子表面残基 Val 2 (β -sheet)、Val 74 (loop)、Val 110 (α -helix) を一連の親水性残基 (Asp, Asn, Ser, Tyr, Arg) に置換した変異型を作製し、熱測定 (DSC) で安定性変化を、X 線結晶構造解析で水和構造との相互作用を観察した。得られた結果は、変異型の安定性は置換する残基ではなく、置換する部位に大きく依存する傾向を示した。例えば Val $\rightarrow$ Asp, Asn の置換による変性のギブスエネルギー変化 ($\Delta \Delta G$) は、分子表面に rigid な水和構造がある Val 2 ではそれぞれ -6.0、-5.6 kJ/mol と不安定化し、弱い水和構造がある Val 74 では -1.8、-1.4 kJ/mol とやや不安定化、分子表面から離れて水和構造が存在する Val 110 では 0.7、0.3 kJ/mol とほとんど変化しなかった。また、分子表面に導入されたほとんどの親水性残基は、水分子や、他の残基と新たに水素結合を形成していた。発表では、これらの水和構造の変化と蛋白質の安定性変化との関連についても議論する。

J.Funahashi, K.Takano, Y.Yamagata and K.Yutani : Effect of non-polar to polar substitutions at protein surface on the structure, stability and hydration structure of human lysozyme