2A1545

フェレドキシン-NADP⁺還元酵素の構造安定性におけるFADの役割

○前田 正洋、浜田 大三、恩田 弥生、長谷 俊治、後藤 祐児 (阪大・蛋白研)

トウモロコシ由来フェレドキシン-NADP⁺還元酵素(FNR)は、FADを非共有結合的に結合した分子量35000のフラビン蛋白質であり、光化学系Iにおいてフェレドキシンを介したNADP⁺の光還元反応を触媒する。本酵素はFAD結合ドメインとNADP⁺結合ドメインからなり、FADは両ドメイン間に存在する。FNRの立体構造形成過程とそれに伴うFADの結合には不明な点が多く、折れたため反応と構造安定性の解析が重要である。本研究では種々の物理化学的手法を用いてFNRの立体構造安定化の機構を解析した。

holoFNRの蛍光および円二色性(CD)を測定したところ、pH3.5から11においてネイティブ構造を有し、X線小角散乱法から慣性半径が22 Åの球状構造であることがわかった。また高濃度の塩酸グアニジン濃度で協同的に変性し、ネイティブ状態で消光しているFADの蛍光強度が高次構造の崩壊に伴い上昇した。このことから構造の崩壊とFADの解離が密接に関係していることが示唆された。一方、酸変性状態(pH2.5)はFADが完全に解離しているが、ネイティブ状態とは異なる残余構造を保持していると考えられた。そこで酸変性状態における塩酸グアニジンの効果を調べたところ、協同性の低い構造変化が観測され、高濃度の塩酸グアニジン濃度において完全なランダムコイル様のスペクトルを示した。またholoFNRからFADを除去したapoFNRと、FAD非結合型の組換え酵素として発現するY95A変異体を作製した。これらの遠紫外領域のCDスペクトルはholoFNRと同様であるが、凝集体を生じやすかった。このことはFADの結合が本酵素の立体構造の安定化に寄与していることを示唆している。

M.Maeda, D.Hamada, Y.Onda, T.Hase and Y.Goto : The Conformational Stability of Maize Ferredoxin-NADP⁺Reductase Associated with FAD.

2A1615

水-グリセロール系でのアミノ酸の溶媒間移行熱容量と蛋白質の構造安定性：DSCによる解析

○月向 邦彦、松島 洋輔、河本 清美 (広島大・院理)

蛋白質やアミノ酸を水中から変性剤や安定剤水溶液に移行するときの熱容量変化は、蛋白質の構造安定性に及ぼす溶媒効果を理解する上で重要な熱力学的基盤を与える。しかし、実験上の困難もあり、これらの実験データは非常に少ない。本研究では断熱型示差走査熱量計(DSC)と精密密度計を用いて、アミノ酸や蛋白質を水中からグリセロール水溶液に移行する時の熱容量変化を広い温度範囲で測定することを試み、蛋白質変性防止機構研究への応用について検討した。

水および30%グリセロール中で20種のアミノ酸、ジグリシンおよび卵白リゾチームの熱容量をMicroCal MC-2 DSCを用いて15~90℃の温度範囲で測定し、Anton Paar DMA5000により求めた部分モル容積の温度変化を補正して、両溶媒間での移行の熱容量変化 $\Delta C_{p, tr}$ を求めた。また、両溶媒中(pH 2)でのリゾチームの熱変性をDSCにより測定し、部分モル容積の温度変化を補正して、熱変性の熱容量変化 $\Delta C_{p, d}$ を見積もった。アミノ酸側鎖およびペプチド基当たりの $\Delta C_{p, tr}$ は室温で-150~450 J/mol Kにあり、ほとんどの場合、その絶対値は温度の上昇とともに減少した。疎水性側鎖は正、親水性側鎖は負の $\Delta C_{p, tr}$ を与えるものが多いが、必ずしも明確な規則性は見られず、アミノ酸のまわりの水和構造にグリセロールが複雑に関与していることが示唆された。同様にして求めたリゾチームの天然、熱変性状態の熱容量はグリセロール添加により減少しており、熱変性の $\Delta C_{p, d}$ も減少することがわかった。また、変性の自由エネルギー変化の温度依存性から、グリセロールは低温変性に対しても安定化効果があることが示された。これらの結果は、部分モル容積の補正は必要なもののDSCを用いて広い温度範囲で $\Delta C_{p, tr}$ を測定できる可能性を示しており、蛋白質の構造安定性に及ぼす溶媒効果の熱力学的解析に有用な情報を与えるものと考えられる。

K. Gekko, Y. Matsushima and K. Kawamoto : DSC analyses on heat capacity of transfer of amino acids and protein stability in water-glycerol mixture.

2A1600

蛋白質表面の変異による安定性変化の予測におけるRamachandran plot上の変異位置の重要性

○M.Michael Gromiha¹、大畠 玄久²、河野 秀俊³、上平 初穂¹、皿井 明倫¹ (¹理研・筑波研、²名城大・理工、³Dept. Chem., Univ. Pennsylvania)

In order to understand the mechanism of protein stability we have analyzed the relationship between stability changes caused by mutations and changes in 49 physico-chemical, energetic and conformational properties. For buried mutations, properties reflecting hydrophobicity are strongly correlated with stability [1]. Classification of mutations based on their location in helix, strand, turn and coil segments improved the correlation of partially buried mutations, and the coil mutations are mainly influenced by the effects of entropy [2]. For surface mutations, on the other hand, we found that in helical segments, the major contribution to stability is hydration entropy and other properties related to size or volume have significant correlation with the stability, whereas the role of hydrophobicity is minimal. We examined the reverse hydrophobic effect (i.e., more hydrophobic surface amino acids destabilize proteins) in our dataset. We observed the inverse relationship between hydrophobicity and stability only in coil mutations, and mutations in helical segments did not show this effect. The classification of coil mutations based on their locations in the Ramachandran map improved the correlation significantly, implying the relationship between stability and strain energy. Further, we observed a direct relationship between increase in solvent accessibility of the mutated residue and increase in correlation due to the inclusion of sequence/structural information.

References

1. M.M. Gromiha et al. (1999) J. Protein Chem. 18, 565-578.
2. M.M. Gromiha et al. (1999) Protein Eng. 12, 549-555.

M.M.Gromiha, M.Oobatake, H.Kono, H.Uedaira and A.Sarai : Importance of Mutant Position in Ramachandran Plot for Predicting Protein Stability upon Surface Mutations

2A1630

示差走査熱量計を用いた微生物由来チトクロームcの安定性解析

○内山 進¹、長谷川 淳²、谷本 祐子¹、森口 浩志¹、水谷 雅之³、五十嵐 泰夫³、三本木 至宏⁴、小林 祐次¹ (¹阪大・院薬、²第一製薬、³東大・院農、⁴阪大・産研)

高い熱安定性を持つ好熱性水素細菌由来のチトクロームc-552 (HT c-552)は、緑膿菌由来のチトクロームc-551 (PA c-551)とアミノ酸配列のみならず、主鎖のフォールディングが極めて近い。両者の立体構造を詳細に比較することによって、HT c-552において熱安定性に寄与し、構造上離れている3つの部位を予想することができた。今回、タンパク質の熱安定性機構をアミノ酸レベルで解明することを目的に、PA c-551の相当する3つの部位に変異を導入し、熱安定性が上昇するかどうか検討した。先ず変異型PA c-551について、pH 5.0、1.5 M グアニジン塩酸塩存在下、CDにより熱安定性を調べた。変性中点T_mの野生型のとの差(ΔT_m)は、F7A/V13M変異体で13℃、F34Y/E43Yで22℃、V78Iで9℃となり、いずれのアミノ酸置換によっても熱安定性が上昇した。また、3つの部位の変異を全て加えた5残基置換体F7A/V13M/F34Y/E43Y/V78IのΔT_mは36℃となり、82アミノ酸残基のPA c-551配列中、わずか5残基の置換によってHTc-552と同程度の熱安定性となった。次に、変異による熱安定化の要因を解明するためにDSC測定を行い、転移に伴う各熱力学量を見積もった。この際、DSCでは100℃以上でも測定が可能があるので、グアニジン塩酸塩を除いた溶媒条件で測定を行った。その結果、転移は2状態で進行し、変異による安定化は主にΔHの増加によるものであった。さらに、5残基置換体のΔGは各変異部位の足しあわせた値とほぼ同じになり、安定化に加成性が成立していた。また、HT c-552はΔHの増加に加えて、ΔC_pが小さくなることにより高い熱安定性を獲得していることが分かった。本年会では、熱測定から得られた熱力学的パラメータとPA c-551の野生型及び5残基置換体の立体構造との相関についても併せて報告する。

S. Uchiyama, J. Hasegawa, Y. Tanimoto, H. Moriguchi, M. Mizutani, Y. Igarashi, H. Sambongi and Y. Kobayashi : Stability of bacterial cytochrome c studied by differential scanning calorimetry