2D1530

マアナゴ (Conger myriaster) 体表粘液由来ガレクチンの耐熱性に関わる構造要素: サブユニット間相互作用の重要性

○小川 智久¹、石井 千広¹、小澤 智仁¹、村本 光二¹、白井 剛²、山根 隆²、神谷 久男³ (¹ 東北大・院農・資源生物科学、² 名古屋大・院工・生物機能工学、³ 北里大・水産)

マアナゴ体表粘液中には β -ガラクトシドに結合特異性をもつガレクチン2種(コンジェリンIおよびコンジェリンII)が存在する。いずれも分子量16,000のサブユニットが非共有結合したホモ2量体であるが、コンジェリンIとIIのアミノ酸配列の相同性は約47%と低く、耐熱性やpH依存性、ラクトース誘導体に対する糖鎖結合特異性の違いなど両者の分子特性が異なっている。cDNAの解析から、これらは翻訳領域で加速的に塩基置換を起こし、異なる分子特性をもつように進化してきたことを明らかにした。特に耐熱性を比較すると、コンジェリンIは50℃で80分間以上も安定であるのに対してコンジェリンIIは失活し、大きな違いがみられた。また、X線構造解析からコンジェリンIの2つのサブユニット間でN末端側ストランドの交換(ストランド＝スワップ)が起こっていたことが明らかになった。本研究ではコンジェリンの耐熱性の違いについてタンパク質工学的解析から明らかにするため、コンジェリンIとIIのN末端側およびC末端側ストランドをそれぞれ相互に置換したキメラ体6種、ストランド＝スワップに関与すると考えられた9位PheをIleへ置換した変異体および糖鎖結合部位をコンジェリンII型へ置換したコンジェリンI変異体6種を作成し、血球凝集作用を指標に耐熱性を比較した。その結果、サブユニット間相互作用部位が耐熱性に重要であることが判明した。ストランド＝スワップによる強固な相互作用が耐熱性の獲得に関与すると考えられたが、ストランド＝スワップには関係ないC末端側ストランドも重要であることが明らかになった。サブユニット相互作用領域全体が重要と考えられた。現在DSC測定も行っており、サブユニット自体の構造安定性との相関も合わせて議論する。

T.Ogawa, C.Ishii, T.Ozawa, K.Muramoto, T.Shirai, T.Yamane, H.Kamiya: Structural significance of subunit interaction for thermostability of Conger eel galectins

2D1600

ヒト血清アルブミンの酸化・還元状態の病態生理

林 知也¹、今井 一¹、河合 憲司²、根川 常夫¹、富田 美穂子¹、中村 浩二¹、桑田 一夫¹、曾我美 勝³、○患良 聖一¹ (¹ 岐阜大・医・第2生理、² 大垣市民病院・眼科、³ 岐阜大)

血清アルブミン分子には、N末端から34番目に非常に反応性に富むSH基(Cys-34)が一個存在し、このSH基がいかなる物質とも結合していないフリーの状態のときのアルブミンを還元型アルブミンと呼び、一方このSH基が血中の含硫アミノ酸(シスチン、ホモシスチン、酸化型グルタチオンなど)と分子間共有結合をしたときのアルブミンを酸化型アルブミンと呼んでいる。正常人では約75%が還元型、約25%が酸化型として存在している。両アルブミンは特殊なカラムを用いたHPLCによって分離・観測することができる。われわれはこのHPLCシステムを用いてこれまでに各種疾患の患者血清を多数分析した結果、両アルブミンの割合の動態が生体内での酸化還元緩衝能をよく反映していることを見いだした。そこで今回われわれは、老人性白内障患者の前房水中のアルブミンの酸化・還元状態を解析し、患者血清中のそれと比較・検討した。前房水および血清は、老人性白内障患者51名(平均年齢、73.9歳)から採取・分析した。その結果、患者血清中の還元型アルブミン分画の割合の平均は66.4%であったのに対して、前房水中のそれは3.5%と極端に減少していた。それに対応して、患者前房水中のアルブミンは圧倒的に酸化型アルブミンであった。水晶体内タンパク質のSH基の酸化が白内障の成因のひとつとして考えられている。白内障患者では、水晶体の混濁化に伴って、水晶体に直接接している前房水中のアルブミンは圧倒的に酸化型アルブミンになったものと推測される。このように、前房水中のアルブミンの酸化・還元状態の解析は、間接的ながら水晶体内の酸化・還元状態を反映する指標となり得る可能性が示唆された。

T. Hayashi, H. Imai, K. Kawai, T. Negawa, M. Tomida, K. Nakamura, K. Kuwata, M. Sogami and S. Era: Observation for the redox state of human serum albumin

2D1545

タイマー機能を有するタンパク質TIME-EA4の時間よみ調節機構

○甲斐 英則¹、谷 直紀¹、西田 英生¹、安倍 伸一郎¹、河田 康志²、磯部 稔³ (¹ 鳥取大・院連農・生物資源、² 鳥取大・院工・生物応用、³ 名古屋大・院生農・生物有機)

TIME-EA4は休眠発達期間をはかる酵素ATPaseであり、PINはその時間よみを停止させるペプチドである。これらは、胚子発育にかかわる時間制御をしていると考えられ、発生タイマー機構をTIME-EA4の構造とPINとの関係から検討した。タイマーは、TIME-EA4の立体構造中に内蔵されていると推察される。まずその一次構造を決定した。ペプチド側からは、エンドマン分解法、プロテインラダーシーケンシング、チオヒダントイン法などで決定した。また、nested PCRおよび5'-3'-RACE法を用いてTIME-EA4遺伝子を得、塩基配列も決定した。その結果、ペプチド側・遺伝子側双方からのアミノ酸配列が完全に一致した。TIME-EA4は、156アミノ酸残基から成る糖タンパク質であった、付加糖はtrimannosyl core構造をもつAsn結合型であった。ホモロジー検索、推定立体構造などの結果から、N末端側にタイマーが組み込まれていると推察された。糖鎖の結合部位は、このN末領域内に一カ所であった。TIME-EA4とPINとを混合し、MALDI-TOF-MSにかけたところ、両者の等モル複合体が検出された。IAsysを用いた実験から、その解離会合定数は約460nMと求められた。糖鎖切断酵素処理したところ、糖フリーTIME-EA4にもタイマー機能は保持されていた。しかし、PINによる時間よみ停止作用は受けなくなった。PINは、糖鎖を介してTIME-EA4と結合し、時間よみを停止させる。その解離がタイムゼロをセットする、つまりストップウォッチのボタンを押す事にあたり、時間よみが始まる。このように考察した。H.Kai et al., (1995) J. Insect Physiol., 41, 905-910. M.Isobe et al., (1995) BioMed. Chem. Lett., 5, 2851-2854.

H.Kai, N.Tani, H.Nishida, S.Abe, Y.Kawata and M.Isobe: A timer-mechanism to ensure that key reactions occur at certain times with special reference to a protein-peptide interaction

2E1315

フォボロドプシンのM中間体の光反応

○柴崎 千枝¹、大谷 弘之¹、下野 和実²、岩本 真幸²、加茂 直樹² (¹ 東工大院・生命理工、² 北大院・薬)

低温吸収分光によりPharaonis phoborhodopsin (ppR)の光サイクルにあらわれるM中間体(ppRM)は光反応することが知られた。ppRMの光反応生成物はppRに良く似た吸収スペクトルをもつ化学種(ppR')であった。本研究では常温におけるppRMの光反応を時間分解吸収分光法により調べた。その結果、ppRの光サイクルには寿命の異なる2種のppRMが存在し、それぞれが2種のppR'を光化学的に生じることを見いだした。

ppR(pH8, 0.1 M NaCl)を532 nmのパルス光で励起したところ、368 nmで観測したppRMの減衰は2成分(200 ms, 650 ms)からなり、これらをppRMfastおよびppRMslowと呼ぶことにした。短寿命ならびに長寿命の成分はそれぞれppRMから[ppRM/ppRN平衡]へ、ならびに[ppRM/ppRN平衡]からppROの緩和に帰属した。共に、長寿命なので可視定常光照射により高濃度に蓄積させることができた。これらを355 nmのパルス光により励起したところ、ppRに良く似た吸収スペクトルを示す化学種が生成した。これらは寿命を持ち(65 ms, 2500 ms)、ppRそのものではなく中間体であることがわかった。低温分光で見つかったppR'に対応すると考え、短寿命ならびに長寿命成分をppR'fastならびにppR'slowと呼ぶことにした。bRの場合、Mの光反応生成物はbRに良く似た吸収スペクトルを持つ中間体Y (yellow-light-absorbing species)を生じる。ppRMの光反応はbRのMの光反応に良く似ていることがわかった。寿命で区別できる2種のppRMおよびppR'の間の対応関係を調べるために2台のパルスレーザを同期させた測定を準備している。

C. Shibazaki, H. Ohtani, K. Shimono, M. Iwamoto, and N. Kamo: Photoreaction of the M intermediates in the photocycle of pharaonis phoborhodopsin