3SMB3

シャペロニンはいかにして変性タンパク質を *cis* 空洞内に閉じこめるのか？

○元島 史尋、吉田 賢右（東工大・資源研）

大腸菌シャペロニン GroELは変性タンパク質を結合し、ATP と GroES の結合を伴って変性タンパク質を GroEL/ES からなる *cis* 空洞内に閉じこめ (*cis* complex 形成)、変性タンパク質の折れ畳みを行う。X線結晶構造と変異体の解析から、GroES と変性タンパク質は GroEL の同じ疎水部位に結合すると考えられている。このことから、GroES の結合は変性タンパク質によって阻害されると予想されるが、実際には GroES の結合は速やかであり、変性タンパク質による阻害は観察されなかった。シャペロニンはどのような仕組みで *cis* complex を形成するのだろうか？

様々な変性タンパク質についてその *cis* complex 形成を調べたところ、GroEL への結合が強い変性タンパク質ほど *cis* complex を形成しやすいことがわかった。このことから、*cis* complex を形成するためには、変性タンパク質の結合部位が GroES に奪われると同時に、変性タンパク質が GroEL の別の部位に結合する必要があると予想された。実際に GroEL にはもう一つの疎水部位が存在しており、これがその候補に挙げられた。この疎水部位を親水性残基に置換した変異体は、予想したように、*cis* complex の形成が少なかった。また、GroES の結合速度は野生型と同様に速やかであり、変異の影響はほとんどなかった。これらの結果から、*cis* complex の形成には変性タンパク質が GroEL 上にあるもう一つの疎水部位に結合することが必須であると示唆された。

F.Motojima and M.Yoshida : How does chaperonin sequester a unfolded protein into *cis* cage?

3A0900

折りたたみ構造状態にあるリゾチームの HD 交換反応に対する変性剤：GuHCl、TFE の影響

○東田 欣也、小田 尚樹、宮内 弘世、瀬川 新一（関学大・院理・物理）

塩酸グアニジン（GuHCl）やトリフロロエタノール（TFE）は蛋白質の立体構造の安定性を低下させる変性剤としてよく知られている。塩酸グアニジン濃度が増加するにつれて蛋白質の unfolding rate はほぼ直線的に増加する。それに伴って、折りたたみ構造状態にある蛋白質の立体構造の揺らぎはどのように変化するのだろうかということが研究目標である。昨年の年会で pH8.0、4.0M GuHCl 存在下でのリゾチームのアミドプロトンの HD 交換反応の実験結果を発表した。リゾチーム立体構造の固い核部分は EX1 反応機構によって HD 交換する。一方、表面に近い比較的可動な構造の部分は Local Unfolding によって水素交換し、EX2 反応機構に従うことを報告した。今回、GuHCl を含まない以外は全く同じ条件下で HD 交換反応を測定した結果、表面近傍にあって Local Unfolding によって水素交換する約 30 残基は、Asn 59、Arg 61 を除いて、HD 交換反応の保護因子 (Protection Factor) が 4.0M GuHCl 存在下でもほとんど変化しないことが分かった。一方、変性剤としては性質の顕著に異なる TFE の影響を調べた。立体構造が崩壊する構造転移中点領域で比較すると、TFE は GuHCl に比べてリゾチームの Unfolding rate を顕著に増大する。約 95 % のリゾチームが折りたたまれていた H8.0、30%TFE 存在下の条件で HD 交換反応を行った結果、ほぼすべての残基が 50 – 100 s の時間範囲で水素交換することが分かった。保護因子は、約 5000 程度の値になるが、Unfolding 反応の平衡定数の逆数は高々 20 程度であるため、U 状態にある蛋白質のアミドプロトンに強い保護因子が働いている。現在さらに TFE の濃度を変化させて現在実験を行っている。

K.Toda, N.Oda, H.Miyauchi, S.Segawa : Effects of denaturants: GuHCl and TFE on the exchange behavior of amido hydrogens in lysozyme

3SMB4

シャペロニン機能の 1 分子イメージング

田口 英樹¹、上野 太郎²、多田 隈 尚史²、吉田 賢右¹、○船津 高志²（¹ 東工大・資源研、² 早大・理工・物理）

シャペロニン GroEL は ATP 存在下で補助因子である GroES と結合・解離を繰り返してタンパク質の折れ畳みを助ける。しかし、GroES の結合・解離、ATP 加水分解サイクルと、タンパク質の折れ畳みの進行がどのように共役しているかについては不明な点が多い。この問題を明らかにするために、我々は 1 分子イメージング技術を用いてシャペロニン機能を 1 分子レベルで解析した。まず、蛍光色素 IC5 で標識した GroEL をガラス基盤に固定し、基質タンパク質と ATP 存在下で、Cy3 標識した GroES 分子が結合・解離する 1 分子ダイナミクスをエバネッセント蛍光顕微鏡で観察した。その結果、GroES は結合した後、直ちに解離し始めるのではなく、時定数 3 秒と 5 秒の 2 段階反応を経て解離することがわかった。続いて、シャペロニン 1 分子の内部で Green Fluorescent Protein (GFP) 1 分子が折れ畳む様子を次の方法でイメージングした。GroEL と酸変性させた GFP の複合体をガラス基盤に固定し、GroES と CagedATP 存在下で紫外線照射して ATP 加水分解サイクルを開始させた。その結果、GroES 結合後 3 秒経過してから GroEL の位置に GFP の蛍光が現れはじめた。ATP 加水分解速度が非常に遅い GroEL (D398A) 変異体でも、通常の GroEL の場合と同様の速度で GFP の蛍光が出現したので、GFP の折れ畳みが ATP の加水分解に関係なく起きていることが示唆された。以上の結果から、新たに見つかった反応中間体は基質タンパク質と GroES が同時に GroEL に結合している状態であり、これは基質タンパク質を確実に GroEL の内側に落とし込むのに重要な役割を担っていると考えられる。また、シャペロニン分子の内部で 1 分子のタンパク質の折れ畳みを解析する技術は、一般のタンパク質に応用できる可能性を秘めている。この方法が新たなブレイクスルーをもたらすことを期待している。

H.Taguchi, T. Ueno, H. Tadakuma, M. Yoshida and T. Funatsu : Single-molecule imaging of chaperonin function

3A0915

イヌミルクリゾチームの折り畳み中間体およびモルテングロビュール状態の重水素交換反応による解析

○小橋川 敬博^{1,2}、水口 峰之¹、出村 誠¹、小柴 琢己¹、津田 栄²、新田 勝利¹（¹ 北大・院・理、² 北工研）

リゾチームの変性機構は一般に 2 状態モデルで表されるが、イヌリゾチーム (CML) とウマゾチームの場合は 3 状態変性し、その変性過程において中間体である Molten Globule 状態 (MG) が蓄積する。MG 状態はタンパク質の構造形成の初期に観測される巻き戻り中間体に類似していると考えられているが、その詳細は不明である。最近、MG 状態の CML は比較的安定に構造形成していることが明らかにされた。本研究では、CML について MG 状態と折り畳み中間体の相違について重水素交換と NMR を組み合わせた手法を用いて検討した。

CML の MG 状態における重水素交換反応のパターンを折り畳み中間体のものと比較した。ヘリックス単位で見た溶媒露出性のパターンは両者でほとんど同じであり、A.B-ヘリックスが最も露出性が低く、これらに D.C-ヘリックスの露出性が低かった。また、ヘリックスの界面領域は重水素交換反応に対して強い耐性を示していた。アミノ酸残基ごとに見ていくと、MG 状態では保護されているものの折り畳み中間体では保護されていない残基や、逆に折り畳み中間体では保護されているが MG 状態では保護されていない残基が見出された。これらの結果は協同的な相互作用が折り畳みの初期の段階にすでに形成され、折り畳み中間体と MG 状態が構造的に類似したものであることを示唆している。発表では残基レベルでの相違をもとにして MG 状態の蛋白質の折り畳み過程における意味を考察する予定である。

Y.Kobashigawa, M.Mizuguchi, M.Demura, T.Koshiba, S.Tsuda, K.Nitta : Hydrogen exchange study of folding intermediate and molten globule state of canine milk lysozyme