3A1030

化学修飾した β -ラクトグロブリンとシャペロニン GroEL との相互作用

○坂井 和子¹、山崎 領¹、星野 大¹、河田 康志²、後藤 祐児¹ (¹ 阪大・蛋白研、² 鳥取大・工)

シャペロニン GroEL は基質蛋白質の中間体と相互作用し、その立体構造形成を促進する蛋白質として知られている。今回、ウシ β -ラクトグロブリン (β lg) 及び C 末端に 6 残基の His 残基を結合させた変異体である His6- β LG を基質として用いて GroEL による再生反応の分子機構を研究した。 β lg の構造の内部に埋もれている SH 基を化学的に修飾すると、立体構造が不安定化し GroEL と相互作用する。そこで、蛍光色素 tetramethylrhodamine-5-maleimide (TMR) や、可逆的な解離の可能な SH 試薬である 5,5-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) で β lg を修飾し、GroEL との相互作用を観測した。TMR で修飾した β lg (TMR- β lg) の構造は、円二色性スペクトル測定から Intact に比べてかなり緩んだ構造をしている。DTNB で修飾した β lg (TNB- β lg) は、pH7.5 では Intact に比べて若干緩んだ構造をしているが、pH6.5 及び酸性条件下ではかなり Intact に近い構造をとることが分かった。ゲル濾過 HPLC から、TMR- β lg 及び TNB- β lg の再生中間体は GroEL と相互作用して複合体を形成し、さらに ATP を加えると複合体は解離した。これらの β lg の Trp の蛍光強度は、水中では Intact に比べて大きく消光され、GroEL と結合すると逆に大きくなる。これは、GroEL と結合することで、Trp 残基が疎水的な環境下におかれていることを示している。さらに、Ni-NTA Agarose を用いて GroEL と His6- β LG 複合体の固定化を試みたところ、Ni-NTA Agarose に固定化した His6- β LG に対して GroEL は結合せず、GroEL と His6- β LG 複合体もまた Ni-NTA Agarose には結合しなかった。これは GroEL、His6- β LG と Ni-NTA Agarose の三重複合体が、立体障害によって形成されにくいことを示唆している。

K.Sakai, R.Yamasaki, H.Hoshino, Y.Kawata and Y.Goto : Interaction of labeled beta-Lactoglobulin with chaperonin GroEL

3A1100

β ラクトグロブリンの低温変性状態の解析

○加藤 秀典、星野 大、後藤 祐児 (阪大・蛋白研)

【目的】 低温変性は、熱変性と並び球状タンパク質に一般的にみられる現象である。同変性状態はウシ β ラクトグロブリン (bLG) において容易に観察され、古くから調べられている。しかしながら、その構造的特徴はわかっていない。そこで本研究では、4 M 尿素中、0℃ における低温変性状態を円偏光二色性 (CD)、X 線溶液散乱、核磁気共鳴 (NMR) を用いて詳細に解析した。

【結果と考察】 はじめに、4 M 尿素中で CD の温度変化測定を行ったところ、近紫外部と遠紫外部の転移曲線が一致せず、低温変性の途中に中間体が存在することが示唆された。またスペクトルから、bLG は 4 M 尿素中、0℃ において三次構造は完全に失われているが二次構造は幾分か残った中間的な構造をとることがわかった。次に X 線溶液散乱を測定し分子のサイズや形状を調べたところ、低温変性状態は天然状態より 5 Å ほど膨らんでいるものの、8 M 尿素中に比べると非常にコンパクトであることが明らかになった。さらに低温変性状態を残基レベルで解析するために、NMR による重水素交換実験を 4 M 尿素中、0℃ で行った。比較のため、同様の重水素交換実験を 8 M 尿素中、0℃ でも行った。その結果、4 M 尿素中では、100 以上という高いプロテクションファクターをもつ残基が G、H の 2 本の β ストランドに局在していることがわかった。一方、8 M 尿素中ではこのように強く保護される残基は観測されなかった。G、H の二本のストランドはジスルフィド結合 (C106 - C119) でつながれており、高いプロテクションファクターがみられた残基はすべてこの近くに位置していた。このことから bLG の安定性において、このジスルフィド結合が大きな役割を果たしていることが示唆された。一方、尿素変性状態は、低温変性状態で残存している部分的な構造が失われた、より高度な変性状態であると考えられる。

H.Katou, M.Hoshino and Y.Goto : Structural characterization of the cold-denatured state of beta-lactoglobulin

3A1045

β ラクトグロブリンのフォールディング中間体

○桑田 一夫¹、後藤 祐児²、星野 大²、Roder Heinrich³ (¹ 岐阜大・医学部・生理、² 阪大・蛋白研・溶液、³ フォックス・チェイス・癌センター)

β ラクトグロブリンは、短距離相互作用と長距離相互作用にミスマッチを有する。即ち、局所的にはヘリックスの多い蛋白だが、全体としてフォールディングしてみると、 β シートの多い、 β バレル構造となる。このような蛋白質では、フォールディングの途中で、局所的相互作用が優勢となり、一時的にヘリックスの多い中間体を形成する。即ち、中間体が天然構造と異なるフォールドを有する、非ヒエラルキー的なフォールディングを行う傾向がある。実際、 β ラクトグロブリンは、フルディングの途中で、ヘリックスの多い中間体を経由することが知られている。ところがこの中間体は、ストップフローの不感時間内 (数ミリ秒以下) で生ずるため、その生成過程を観測することが難しかった。我々は、連続フロー法を用いた、蛍光観測及びパルスラベル法により、中間体の生成過程及びその構造を明らかにした。連続フロー法では、140 マイクロ秒でヘリックスが形成される事が分かった。さらに超高速パルスラベル法により、この部位が N 端の β A 領域に存在することが分かった。このヘリックスが β シートに完全に置き換わる ($\alpha \rightarrow \beta$ 転移) には大変時間がかかる (数十分)。これは、N 端と C 端のストランドが安定なシートを形成するのに長い探索時間を要するためと考えられる。従って、中間的なヘリックスは、この間に起きるかもしれない、アミロイドや多量体形成を防止するのに役立っていると予想される。

K.Kuwata, Y.Goto, M.Hoshino, H.Roder : Folding intermediate of beta-lactoglobulin

3A1115

SH 基滴定反応による β ラクトグロブリンの構造と安定性の解析

○中岡 (廣田) 奈美、後藤 祐児 (阪大・蛋白研)

<序>さまざまな溶媒中における蛋白質の構造や安定性を調べることは、蛋白質の折り畳み問題を解く上で重要な課題である。 β ラクトグロブリン (BLG) は 2 つの SS 結合と 1 つの遊離の SH 基をもつ。この SH 基は蛋白質の内部に埋もれており、水中における SH 基修飾試薬 5,5-dithiobis(2-benzoic acid) (DTNB) との反応性は低い。本研究ではアルコールを中心に、さまざまな溶媒における BLG の SH 基滴定を行い、各溶媒の安定化・不安定化作用を探った。

<実験方法・結果> 25℃、pH8.0 において、さまざまな種類の溶媒存在下において DTNB による SH 基滴定反応を 412nm の吸収から測定した。SH 基滴定の結果を蛍光、ストップフローで測定した変性速度と比較した。DTNB よりも分子量の小さい SH 基滴定試薬である 4,4-dithiodipyridine (DTP) も同様な測定に用いた。その結果、アルコールや糖の種類や濃度によって滴定反応が変化した。BLG に対して α ヘリックスを形成させやすいアルコールほど滴定反応を促進することがわかった。DTP は DTNB と同様の傾向を示した。また、BLG の巻き戻り (あるいは変性) 反応途中に DTNB を加えることにより、BLG の巻き戻り (あるいは変性) 反応の進行を検出した。変性反応では中間体は検出されなかったが、巻き戻り反応途中においては中間体の形成することが示された。

<考察> DTNB との反応性は各溶媒中における β ラクトグロブリンの構造と安定性によって変化するところから、蛋白質の構造形成をこの方法を用いて解析することが可能である。

Nami Hirota-Nakaoka and Yuji Goto : Stability and conformation of beta-lactoglobulin detected by SH titration