3A1130

β 2-グリコプロテイン I のドメイン V と種々の疎水性リガンドとの相互作用

○洪 東杓¹、萩原 義久¹、加藤 久雄²、後藤 裕兄¹ (¹ 阪大・蛋白研、² 国立循環器病センター)

β 2-グリコプロテイン I (β 2-GP I) は、リン脂質膜と結合し、そのリン脂質-蛋白質複合体に対する自己抗体が生産されることによって引き起こされる抗リン脂質症候群の主な抗原になる蛋白質である。 β 2-GP I は、5 つのドメインからなる 326 残基の分子量 50kDa の血漿蛋白質であり、その立体構造も既に報告されている。しかし、 β 2-GP I とリン脂質膜との相互作用の機構については、まだ明らかになっておらず、その治療法の開発のためにも至急解明すべき重要な課題である。本研究では、リン脂質膜との相互作用の機構を明らかにするため、 β 2-GP I のリン脂質結合部位であるドメイン V に着目し、様々な疎水性リガンドとの相互作用を蛍光スペクトルの変化をもとに調べた。また、その Nick 体やドメイン IV-V などについても検討を行った。 β 2-GP I とリガンドとの相互作用を解析するにはいくつかの方法が考えられるが、最も簡便でかつ精度の高いのは、 β 2-GP I 自身、あるいはリガンドの蛍光変化を利用する方法である。本研究では、リガンドの蛍光を利用して、蛋白質との結合に伴うその変化を調べた。一定量の蛍光性リガンドに対する蛋白質の適定実験から得られる適定曲線を解析したところ、負電荷を持つ疎水性リガンドほどより β 2-GP I に強く結合することが分かった。この結果は、 β 2-GP I が負電荷のリン脂質膜と結合するという事実とも一致する結果である。得られた結合定数は、ANS が $5 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$ に対して bis-ANS はそれより 10 倍大きい $6.5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ であった。また、レチノールの場合は $8.2 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ を示した。ドメイン IV-V を用いた場合はドメイン V とほぼ同じ値を示しており、ドメイン IV は疎水性リガンドとの相互作用にあまり寄与しないことが分かった。

D.-P. Hong, Y. Hagihara, H. Kato, Y. Goto : Interactions between domain V of beta2-glycoprotein I and various hydrophobic ligands

3A1315

誘電緩和測定による免疫グロブリン IgG のちょうつがい運動と Fab-Fab 角

○林 義人、磯部 順也、新屋敷 直木、八木原 晋 (東海大物理)

IgG は Y 字型をしたたんぱく質でヒンジと呼ばれる Y の付け根の部分は非常に柔軟性に富み、それに起因するちょうつがい運動は抗原抗体複合体の形成に重要な役割を担っていると考えられている。我々は、Time Domain Reflectometry (TDR) 法を用いた誘電緩和測定を行い、IgG のちょうつがい運動のダイナミクスについて考察した。また、IgG をヒンジ部位で papain 消化を行い、2 つの Fab フラグメントと 1 つの Fc フラグメントに分離すると、ちょうつがい運動による寄与が消失することを示した。

一般に、25℃におけるたんぱく質水溶液の誘電緩和測定結果をカーブフィットすることによって、低周波側にはたんぱく質分子の回転運動による緩和過程、高周波側には自由水の再配向による緩和過程が観測される。そして、この 2 つの緩和過程の間に結合水に起因する緩和過程が 100MHz 付近に観測される。しかし、IgG 水溶液の場合はこの緩和過程は 6MHz 付近に観測され、見かけの活性化エネルギー (33kJ/mol) も結合水の値 (27kJ/mol) より有意に大きかった。また、緩和強度も結合水として予測される値より約 5 倍大きく、誘電吸収曲線の形は非常にブロードで非対称的だった。このような違いは、結合水とちょうつがい運動の緩和過程が見かけ上オーバーラップして観測されたためだと考えられる。Papain 消化によって IgG 分子をヒンジで切断してちょうつがい運動が起らないようにすると、上記のような違いは消失して通常の結合水の値を示した。

また、本研究ではちょうつがい運動の緩和過程を結合水と分離することも試みた。さらに、分離した結果をもとに、Kirkwood の相関パラメータ g から IgG 分子の Fab-Fab 角を求め、約 130° という値を得た。これは、水溶液中で自由にちょうつがい運動を行っているときの平均角が電子顕微鏡を用いて得られている静的な値と一致することを示している。

Y. Hayashi, J. Isobe, N. Shinyashiki and S. Yagihara : Hinge-bending motion of IgG and Fab-Fab angle investigated by dielectric relaxation measurements

3A1145

ヤギ α -ラクトアルブミン変異体の安定化機構

○堀井 克紀¹、斎藤 稔²、依田 隆夫^{3,4}、津本 浩平¹、松島 正明^{5,6}、桑島 邦博³、熊谷 泉¹ (¹ 東北大・院工、² 弘前大・理工、³ 東大・院理、⁴ 現分子研、⁵ 創薬研、⁶ 現山之内製薬)

蛋白質安定化因子と構造との相関について知見を得ることは、蛋白質の folding 機構について理解するのに重要である。分子進化と構造安定性の比較からヤギ α -ラクトアルブミン (α -L A) の分子内疎水性領域 (B ヘリックス) にある Thr29、Ala30、Thr33 に変異を導入し、モルテングロビュール状態の安定性を考察してきた [1]。それらの中で我々は、Thr29Ile 変異体は天然状態において野生型よりも 3kcal/mol 程度安定化していることを見出し、folding, unfolding 反応の速度論的解析を行ってきた [2]。本研究ではヤギ α -L A の Thr29 を疎水性残基 (Val, Ile) に置換した変異体の X 線結晶構造解析、分子動力学シミュレーションに基づき自由エネルギー計算を行い、分子内部の Thr29 残基の構造安定性への寄与について深い知見を得ることを目的とする。

X 線結晶構造解析を行った結果、野生型の Thr29 側鎖の O-H 基は Glu25 主鎖の C=O 基と水素結合をしており、Val,Ile の置換によりこの水素結合は切断されるが、変異体の全体構造は野生型の構造とほとんど同じであり、29 位周辺のみに局所的な構造の違いがあることが明らかになった。さらに AMBER94 力場を用いて分子動力学シミュレーションを行い、Thr $\rightarrow$ Val、Val $\rightarrow$ Ile に対する天然および変性状態の自由エネルギー変化、 $\Delta G(N)$ 、 $\Delta G(D)$ をそれぞれ計算した。その結果、シミュレーションは変異体の構造を良く再現することができ、変性の自由エネルギー差 $\Delta \Delta G(N \rightarrow D)$ は実験値と良い一致を示した。本年度では、これらの自由エネルギー成分分析を行った結果について詳しく報告する。

1. Uchiyama *et.al.*, *Protein Eng.*, **11**, 1153 (1995).

2. Yoda *et.al.*, in submitted.

K.Horii, M.Saito, T.Yoda, K.Tsumoto, M.Matsushima, K.Kuwajima, I.Kumagai : Stabilization mechanism of goat alpha-lactalbumin mutants

3A1330

アボミオグロビン (N, MG, U) 水溶液のマイクロ波誘電分光解析

○亀井 敬、鈴木 誠 (東北大・院工・金属工学)

水中におけるアボミオグロビンの構造を明らかにする上で、誘電分光測定は貴重な情報を提供する。ミオグロビン (Sigma, horse muscle) を 2 ブタノン処理によってヘムを除き純水中で十分透析処理した Native apomyoglobin (apoMb, N 状態) と、HCl 酸性で pH 4 に設定した MG 状態の溶液、および pH2.5 の U 状態の溶液についてそれぞれマイクロ波誘電分光測定を行った。本測定では、透析外液に polyethyleneglycol (Mw20000) 水溶液を用いて透明状態を保ったまま濃縮し 0 ~ 30 mg/ml の濃度範囲で測定を行った。これにより単分散状態から分子集合状態に移る濃度を見積もった。また N 状態から MG 状態にまた MG から U 状態に移ることで誘電スペクトル上に特徴的な 1GHz 以下の緩和の増大が見られた。これは部分 unfold した鎖の運動性によるものと考えられる。さらに Wagner の mixture 理論 (この理論は球状溶質に対して有効であるが、MG 状態も広がりをもった球状溶質と見なせば適用が可能と考えられる。) を適用して水和量を見積もった。

T.Kamei and M.Suzuki : Microwave dielectric spectroscopy on apomyoglobin (N, MG, U) solutions