S2C03

β ラクトグロブリンのフォールディング：非階層的？階層的？

○後藤 祐児（阪大・蛋白研）

従来、タンパク質のフォールディング反応の研究では、天然に存在する構造が協同的あるいは段階的に形成されると考えることが多く、天然と異なる構造についてはあまり注目されなかった（階層的なフォールディング）。牛乳の主要なタンパク質成分であるウシ β ラクトグロブリンは主に β シートから構成される。ところが我々は、アルコール変性、二次構造予測、リフォールディング反応などから、このタンパク質が局所的相互作用という点からは α ヘリックスをとる傾向の強いことを明らかにした。そして、フォールディングの途中で天然とは異なる α ヘリックスを含む中間体を形成することを提案した（非階層的なフォールディング）(1)。 α ヘリックス $\rightarrow$ β シート変換は、タンパク質のフォールディングにおける局所的相互作用と非局所的相互作用の関わりを考える上で興味深いだけでなく、近年注目されるアミロイド線維形成を理解する点からも重要である。安定同位体で標識したウシ β ラクトグロブリンを発見し、異核種多次元NMRと速度論的手法を組み合わせて、残基レベルでフォールディング反応を解析した。その結果、 β ラクトグロブリンのフォールディング中間体では、N末端付近に確かに天然には存在しない β シート構造の形成されていること、しかし同時に天然構造でコアを形成する β ストランドの一部も既に形成されていることが示された。つまり、 β ラクトグロブリンのフォールディングは階層的な要素と非階層的な要素の両方を合わせもつことが明かとなった。階層のおよび非階層的な要素が混在する機構は、アミロイド線維形成反応でも起きていると予想される。1) Hamada et al. (1996) Nature Struct. Biol. 3, 868-873. 2) Kuwata et al. (2001) Nature Struct. Biol. 8, 151-155.

Y.Goto : Folding of b-lactoglobulin: nonhierarchical or hierarchic?

S2C05

$\alpha \rightarrow \beta$ 転移ペプチドの相補的認識機構に基づくアミロイド繊維形成

高橋 勇太¹、○三原 久和^{1,2}（¹東工大院・生命理工、²さがけ21）

アミロイド繊維はタンパク質のミスフォールド体が形成する繊維状の集合体である。アルツハイマー病やプリオン病などの多くの致死性疾患がタンパク質のアミロイド繊維化に由来することが明らかとなりつつある。従って、アミロイド繊維は生体分子としては望ましくない構造体であり、その繊維形成の分子機構解析が望まれている。一方、タンパク質フォールディングにおいて、遠距離の相互作用による配列-構造の二面性が指摘されている。ペプチドアミロイドの形成においても $\alpha \rightarrow \beta$ 転移など同様の現象が観測される。以前より我々は、平行二本鎖 α -ヘリックス構造を有すペプチドのN末端に疎水性基を導入することにより、均一環境下において自発的・自己触媒的に、 α -ヘリックス構造から β -シート構造へと転移し、それに伴いアミロイド繊維を形成するペプチドの設計に成功している。今回、このペプチドの4カ所の電荷性アミノ酸をGluまたはLysに置換した変異体16種を合成し、その中のアミロイド繊維形成能をもたない変異体が、異なる種類の相補的な変異体の存在下で、アミロイド繊維形成能を獲得することが分かった。すなわち、複数種（2種、3種および4種）のペプチドを相補的にアミロイド繊維へと組織化させることが可能であった。アミロイド繊維形成の分子機構解明への設計ペプチドからのアプローチを紹介する。Chem. Eur. J. 1998, 4, 2475; Bioorg. Med. Chem. 1999, 7, 177; Tetrahedron 2000, 56, 7011; Structure 2000, 8, 915; ChemBioChem 2001, 2, 75.

Y. Takahashi, H. Mihara : Complementary assembly of peptides into amyloid fibrils with conformational transition

S2C04

蛋白質フォールディングの統一的描像は可能か？

○桑島 邦博（東大・理）

格子蛋白質モデルなどを用いたフォールディングの理論的な研究の発展により、フォールディングのエネルギ地形に関する議論が深まり、エネルギー地形理論に基づく「新しい描像」がフォールディング経路を仮定した「古典的な描像」に取って代われようとしている。二状態的フォールディングを示すミニ蛋白質の多くの実験例は新しい描像を支持しており、フォールディング速度が構造のトポロジーとよい相関を示すという事実はフォールディング機構が意外と簡単な原理に基づいているという期待を生み出した。一方、 α -ラクトアルブミン、リゾチーム、ミオグロビン、リボヌクレアーゼなど従来から研究されているアミノ酸残基数100以上の通常の球状蛋白質においては、フォールディング初期にモルテン・グロビュール状の中間体が観測され、多くの実験事実によれば、これは巻戻り経路上の必須の中間体である。つまり、これらの蛋白質に対しては依然古典的描像が実験結果をうまく説明しているように思われる。本講演では、これらの事実をふまえ、蛋白質フォールディングの統一的描像とは何であるかを議論する。

K.Kuwajima : Can we take a unified view of protein folding?

S2D01

転写中のRNAポリメラーゼによるDNAの回転の直接観察

○原田 慶恵（東京都臨床研）

DNAと相互作用して働くタンパク質、たとえばDNAポリメラーゼ、RNAポリメラーゼ、ヘリカーゼなどは、機能するときDNAの上を動く。それらのタンパク質が動くとき、DNAの2重らせん構造に沿ってらせん階段を昇っていくようにくると回転しうるのである。実際、RNAポリメラーゼが転写するとDNAにスーパーコイルができることが観察されている。そこで今回、光学顕微鏡を用いてRNAポリメラーゼが働いているところを直接観察する実験系を使って、RNAポリメラーゼがDNAを転写する時の回転運動の検出を試みた。まず回転運動を観察するシステムを開発した。RNAポリメラーゼとDNAの複合体をガラス基板上に固定し、DNAの下流端にビーズを結合させた。このビーズには回転観察のための目印として小さな蛍光ビーズをつけておく。RNAポリメラーゼの転写を開始させ、ビーズの動きを蛍光顕微鏡で観察すると、ビーズは時計回りにくると回転した。時計方向の回転は、RNAポリメラーゼが右巻き2重らせんにそってDNAをたぐり寄せる時に予想される回転方向と一致する。回転速度は最高で5秒間に1回転程度であった。基質である4種類のヌクレオチドの濃度を変えて、回転速度とRNA合成速度を比較した結果、RNAポリメラーゼはDNAの2重らせんの溝を正確になぞりながら転写していることが示唆された。Y. Harada, O. Ohara, A. Takatsuki, H. Itoh, N. Shimamoto & K. Kinoshita Jr Nature, 409, 113 (2001).

Y. Harada : Direct observation of DNA rotation during transcription by RNA polymerase