3P021

高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 由来コールドショックタンパク質ホモログの安定性および構造形成過程

○林一岩崎 容子^{1,2}、城所 俊一¹、Lydia, M. Gregoret² (¹ 長岡技術科大・生物系、²Dept. Chem. & Biochem., UCSC)

【背景と目的】コールドショックタンパク質 (Cold Shock Protein, 以下 Csp) は、バクテリアが至適生育温度より低い温度にさらされたときに発現が増加することから発見された一連のタンパク質である。一本鎖の核酸と結合することなどから、mRNA に結合することでその高次構造形成を防ぎ、RNA シャペロンとして働いていると推定されている。66-70 アミノ酸残基程度からなる単量体で、大腸菌 CspA、枯草菌 CspB などの立体構造が明らかとなっており、それによると逆平行 β シートからなる β バレル構造をとっている。特にフォールディングが速いことが知られており、 β 構造形成のモデルタンパク質として用いられている。一方、「好熱菌一匹プロジェクト」のゲノム配列情報により、高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 株のゲノム中に Csp のホモログが発見された。そこで本研究では、この好熱菌 Csp ホモログを材料とし、好熱菌タンパク質のフォールディングおよびリガンド結合におけるダイナミクスを調べることを目的とした。【方法】ゲノム配列情報を用いて、好熱菌 Csp ホモログ遺伝子を PCR 法でクローニングした。大腸菌を用いた大量発現系を構築し、変性剤存在下で精製した。熱安定性を CD および DSC により調べた。さらに、変性剤 GuHCl を用い、フォールディング過程をストップフロー装置により測定した。【結果と考察】好熱菌 Csp の中性付近での熱変性中点温度は、約 85℃、変性の自由エネルギー変化は、約 25kJ/mol であった。また、フォールディング速度は変性剤濃度依存性が比較的大きいが、アンフォールディング速度にはあまり大きな濃度依存性が見られなかった。この結果は、常温菌由来 Csp の性質とほぼ同じであり、フォールディング機構が類似していることを示唆していた。

Y. Hayashi-Iwasaki, S. Kidokoro, L.M. Gregoret : Stability and folding of a cold shock protein homolog from an extreme thermophile, *Thermus thermophilus* HB8

3P023

イヌミルクリゾチームおよびヒト α -ラクトアルブミンのフォールディングの中間状態における体積挙動

○渡部 正博、小橋川 敬博、山本 宏子、小柴 琢己、出村 誠、新田 勝利 (北大・院理・生物科学)

一般にリゾチームの変性機構は 2 状態モデルで表現されるが、イヌミルクリゾチーム (CML) とその相同タンパク質であるヒト α -ラクトアルブミン (HLA) の場合は 3 状態モデルで表され、変性過程において安定な中間 (I) 状態をとる。しかしながら、その 2 つのタンパク質の I 状態の挙動は大きく異なり、示差走査熱量測定 (DSC) において CML の I 状態は協同的な熱転移が観測されるが、HLA においては観測されない。これまで、I 状態の挙動を観測するために熱、pH、グアニジン塩酸塩などの変性剤が用いられているが、圧力を利用した例は少ない。しかしながら、圧力を利用することにより、タンパク質の体積挙動に関する情報を得ることが出来る。一般に、タンパク質は高圧にさらされると体積が減少するが、そのメカニズムは主に疎水性水和によって説明されている。また、疎水性残基の水和に関する情報は、これまで DSC により算出された ΔC_p が利用されてきた。ゆえに、 ΔC_p と ΔV の何らかの相関があることが予想される。ゆえに、全く挙動の異なる MG 状態の体積挙動に関して調べることによって、それに対する答えが得られることが期待される。また、これらの知見は、タンパク質のフォールディング、ダイナミクスなどを理解する上で重要な要素となり得る。そこで、本研究では、CML と HLA の I 状態をモデルとし、疎水性残基の水和と体積挙動を理解するために、変性における圧力の効果を比較・検討した。得られる熱力学的パラメータによる考察は、当日発表する。

M.Watanabe, Y.Kobashigawa, H.Yamamoto, T.Koshiba, M.Demura and K.Nitta : Volumetric behavior of the folding intermediate state of canine milk lysozyme and human alpha-lactalbumin

3P022

リアルタイム NMR 法によるアポプラストシアニンのフォールディング研究

○水口 峰之^{1,2}、Kroon Gerard J.¹、Dyson H. Jane¹、Wright Peter E.¹ (¹The Scripps Research Institute、² 富山医薬大・薬)

プラストシアニンは 99 残基からなる銅結合タンパク質であり主に 2 つの β -シートからなる。以前に行われた研究により、アポプラストシアニンのフォールディング反応は、Val15-Pro16 のペプチド結合が非天然型トランスである中間体が蓄積するため非常に遅いことが知られている [1]。我々は、アポプラストシアニンのフォールディング反応をリアルタイム NMR 法によって研究した。pH6.0、10℃の条件下で 2 次元 ¹⁵N-¹H HSQC スペクトル及び 3 次元 ¹⁵N HSQC-NOESY-¹H HSQC スペクトルを連続して測定することにより変性状態から天然状態へのフォールディング過程を調べた。アポプラストシアニンは、フォールディング反応開始直後に揺らぎの大きい中間状態へと構造が変化し、その後ゆっくりと天然構造へフォールディングした。フォールディング反応を ¹⁵N-¹H HSQC で直接観測することにより残基レベルでフォールディング反応を追跡することができた。また、NOE 強度の時間変化を追跡することによって主鎖アミドプロトン同士が距離的に近づいていく過程について調べた。12 組の近距離 NOE、9 組の遠距離 NOE の時間変化について調べることによって、アポプラストシアニン構造中のループ内近距離相互作用や β -ストランド間の遠距離相互作用が形成していく様子を調べることができた。

[1] Koide, S., Dyson, H.J. & Wright, P.E. (1993). Characterization of a folding intermediate of apoplastocyanin trapped by proline isomerization. *Biochemistry*, **32**, 12299-12310.

Minayuki Mizuguchi, Gerard J. Kroon, H. Jane Dyson and Peter E. Wright : Folding of apoplastocyanin monitored by real-time NMR spectroscopy

3P024

α -ラクトアルブミンのフォールディングの遷移状態解析

○新井 宗仁¹、依田 隆夫^{1,2}、佐伯 喜美子¹、桑島 邦博¹ (¹ 東大・院理・物理、² 分子研・理論系)

蛋白質のフォールディング反応における律速段階は、モルテン・グロビュール中間体 (MG) が天然状態 (N) へと構造形成していくプロセスであり、この過程において側鎖の密なパッキングが形成される。この過程で起きている現象を理解するためには、アミノ酸置換を導入した変異体のフォールディング速度過程を測定し ϕ 値解析を行って、MG $\rightarrow$ N の反応の遷移状態の構造を特徴づけることが必要である。 α -ラクトアルブミンはフォールディング機構について最もよく調べられている蛋白質の一つであり、天然状態において 2 つの芳香族クラスター (AC1, AC2) が存在する。そこで、AC1 と AC2 内の側鎖のパッキングが遷移状態で形成されているかどうかを調べるために、AC1 内に変異を導入した変異体 (V27I, W118F) と AC2 内に変異を導入した変異体 (A92G, I95V) を作成した。まず、平衡条件下におけるアンフォールディング転移を円二色性 (CD) スペクトルで測定し、2 状態転移を仮定して解析した。その結果、これらの変異体はすべて、野生型よりも -0.4 ~ -1.6 kcal/mol 程度不安定化していることがわかった。次に、V27I, W118F, I95V の巻き戻りとアンフォールディング反応の速度過程をストップフロー CD 法で測定したところ、AC1 内に変異のある V27I と W118F では、巻き戻り速度は野生型とほぼ同じであるが、アンフォールディング速度が速くなっていた。このことは遷移状態においてこれらの側鎖のパッキングは形成されていないことを示している。また、AC2 内に変異のある I95V については中程度の ϕ 値が得られ、遷移状態において I95 の側鎖は一部分、パッキングを形成していることが示唆された。年会では、A92G の速度論的解析の結果についても報告する予定である。

謝辞：実験を手伝ってくださった川瀬宏治氏、石井寛高氏、野沢知則氏に感謝の意を表したい。

M,Arai, T.Yoda, K.Sacki and K.Kuwajima : The transition-state analysis of folding of alpha-lactalbumin