3P029

サブミリ秒 X 線小角散乱測定を用いたアポミオグロビンの折れ畳み過程の研究

○鶴澤 尊規¹、秋山 修志¹、木村 哲就¹、高橋 聡^{1,2}、石森 浩一郎¹、森島 績¹、西川 幸宏³、藤沢 哲郎³ (¹京大院・工、²PREST、³理研・播磨研究所 (SPRING-8))

蛋白質の折れ畳み過程の解明には、二次構造や三次構造の形成過程を詳細に調べる必要がある。これらのうち、三次構造形成過程の解明には、分子サイズ(慣性半径)を調べることが良い手がかりとなる。本研究では、折れ畳み過程が詳細に研究されているアポミオグロビン(apoMb)を取り上げ、折れ畳み初期過程での慣性半径(R_g)の時間変化を測定した。apoMbは変性状態(U)からモルテングロビュール状態(MG)を経て天然状態(N)へ折れ畳むことが知られている。しかし、折れ畳み初期に起こる MG 形成過程はストロプトフロー測定装置の不感時間内に完了するために、 R_g が収縮する過程は未だ観測されていない。そこで、高速液体混合装置を X 線小角散乱法と組み合わせ、 R_g の変化を 300ms の時間分解能で追跡した。測定は、輝度の高い X 線源である SPRING-8 の BL45XU にて行った。apoMb を pH2.2 の U から pH5.6 にジャンプさせ (27℃)、N に折れ畳むまでの R_g の変化を測定した。得られた結果は R_g が 2 つの相で収縮することを示した。最初の相は折れ畳み開始後 300ms の約 26 Å から 4ms 後の約 23 Å までの間に観測され、速度定数は $\sim 2500\text{s}^{-1}$ であった。次の相は折れ畳み開始 10ms 後の約 23 Å から、速度定数 $\sim 10\text{s}^{-1}$ で約 20.4 Å に変化した。観測された 2 つの相を指数関数でフィットし時間ゼロおよび無限大に外挿すると、それぞれ U(29 Å)、N(20 Å) となり、平衡状態の U(28.3 Å)、N(19.1 Å) とほぼ一致する。以上の結果は R_g で観察する限り apoMb の折れ畳み過程には MG 中間体しか関わらないことを示している。過去の研究から、静的な MG の R_g は約 23 Å で、N 末端と C 末端が接触していることが知られている。そのため、本実験の結果は N 末端と C 末端の接触が折れ畳み開始直後から 4ms の時間内に起こり、その他の部分の凝縮がそれ以降(規定枠オーバー)

T.Uzawa, S.Akiyama, T.Kimura, S.Takahashi, K.Ishimori, I.Morishima, Y.Nishikawa, T.Fujisawa : Apomyoglobin folding studied by submillisecond small-angle X-ray scattering

3P031

リゾチーム 2SS 体:2SS[6-127,30-115] の Long-range NOE マップの作成と HD 交換反応速度の測定

○内 弘世¹、坂本 恵子¹、野田 康夫¹、橘 秀樹²、瀬川 新一¹ (¹ 関学大・理、² 神戸大・理)

蛋白質の巻き戻り過程の中間体として、2 本の SS 結合を欠損したリゾチーム変異体、すなわち、 α ドメイン内に 2 本の SS 結合を有する 2SS[6-127,30-115] 変異体を研究してきた。昨年は、主鎖プロトンのピークの帰属が主であったが、その後さらに側鎖プロトンの帰属をできる限り行い、アミノ酸配列上遠く離れた残基間のプロトンの NOE 交差ピークを探し出した。これを 2 次元の距離マップ状にプロットしたものを作成した(Long-range NOE マップ)。このマップを 4SS 体のものと比較し、さらに、HD 交換反応により各残基の時定数 τ 、保護因子(Protection Factor:PF)を求めた結果から、2SS[6-127,30-115] の構造に対して以下のような特徴を見出した。 β 1 鎖(41-46)と β 2 鎖(50-54)は正しく逆平行 β シートを形成するが、 β 2 鎖と β 3 鎖(57-61)の間にはシート構造が消失している。これは、 β 3 鎖が不規則構造になったことを示唆している。ループ領域(62-79)はほぼ完全に隣接残基間 NOE を失ってしまう。しかしながら、残基 55 と 56 の側鎖は、F38,N39,W28,A32 といった B ヘリックスの C 末端側残基と NOE 接触を持つことが明瞭に示された。 β シートの基底部に当たる残基 55,56 が B,C-ヘリックスにはさまれた部位にしっかり結合している事を明確に示している。残基 55,56 の HD 交換の時定数 τ はかなり遅い部類に属し、構造上保護されていることと一致する。また、C ヘリックスの片側に並ぶ、I88,V92,K96,V99 などの側鎖は、A-B ヘリックス接合部の残基と Long-range NOE を保持している。これらの側鎖間相互作用が C ヘリックスを正しく配置させて、 α ドメイン形成を完成させていることがわかった。ただし、HD 交換の時定数 τ は、完全なヘリックス状態にあるものに比べかなり速いので、ヘリックス構造はかなり乱れていると考えられる。

H.Miyauchi,K.Sakamoto,Y.Noda,H.Tachibana and S.Segawa : Long-range NOE map and rates of HD exchange reaction in the 2SS-variant of hen lysozyme:2SS[6-127,30-115]

3P030

リゾチームの分子内架橋:SS3(Cys64-Cys80)とSS4(Cys76-Cys94)の相違— β シート構造保持における役割の違い

○平井 健一¹、谷阪 喜昭¹、北村 吉章¹、飯村 哲史¹、野田 康夫¹、橘 秀樹²、瀬川 新一¹ (¹ 関学大・理、² 神戸大・理)

我々は蛋白質のフォールディング中間体の立体構造のモデルとして SS 結合を欠損させたリゾチーム変異体を作製し研究してきた。リゾチームの SS 結合を 1 本欠損させたリゾチーム 3SS 体の C64A/C80A (SS3 欠損体)と C76A/C94A(SS4 欠損体)について Long-range NOE マップを作成して詳細に構造の相違を比較したところ、 β シートを安定化しているこの 2 つの SS 結合の間で大きな違いがあることが明らかになってきた。よって今回は HSQC スペクトルを用いて重水素交換反応を測定し、この 2 つの欠損体の相違について研究した。SS3 欠損体ではピークの帰属が出来ない残基が Loop 領域に集中しており、 β ドメイン内の残基 57-残基 82 領域の Long-range NOE 相関もほとんど消失していた。重水素交換反応は β シートから Loop 領域にかけて水素結合網が消失するという結果を与えている。このことから SS3 の欠損により Loop 領域で構造が大きく揺らぎ、 β シート構造全体の不安定化を引き起こすと考えられる。一方、SS4 欠損体においては Loop 領域の後半部分で Long-range NOE 接触が失われているが、 β シート内での NOE 接触が明瞭に現れており SS3 欠損体と比較しても大きく異なっている。さらに重水素交換反応でも β シートから Loop 領域前半にかけて安定な構造を保っていることがはっきり示された。これらの結果より SS4 の欠損は欠損部位である Loop 領域後半部分は構造が変化しているものの、SS3 欠損体とは異なり、 β ドメインは天然構造に近く強く折りたたまれた構造をしていると考えられる。この事実と SS4 欠損体のフォールディング反応速度が他の 3SS 体に比べて著しく遅いという実験結果には強い相関があると考えている。

K.Hirai,Y.Tanisaka,Y.Kitamura,S.Iimura,Y.Noda,H.Tachibana and S.Segawa : Difference in stabilizing the β -sheet structure in Lysozyme between SS3(Cys64-Cys80) and SS4(Cys76-Cys94)

3P032

SS 結合のないリゾチーム変異体(0 SS 体)の NMR による構造解析

○小田 尚樹¹、平井 健一¹、野田 康夫¹、橘 秀樹²、瀬川 新一¹ (¹ 関学大・理、² 神戸大・理)

ニワトリ卵白リゾチームには、4 本のジスルフィド結合(SS 結合)が存在する。これまで我々は SS 結合再生中間体の構造を調べるために順次 SS 結合を欠損させたリゾチーム変異体を作製し研究を行ってきた。今回は巻き戻り開始状態にあたる、1 本も SS 結合の存在しない 0SS 体(天然リゾチームの C6、C30、C64、C76、C80、C94、C115、C127 をそれぞれ、S6、A30、A64、A76、A80、A94、A115、A127、に置換したもの。)について解析を行った。ランダムコイルに近い状態にあるタンパク質の弱い残留構造についての情報を得るために 15N でラベルした 0 SS 変異体を作製し、水溶液中で 15N-1H-HSQC スペクトルを観測したところ、NH プロトンの化学シフト値が 7.5-8.5 に密集したランダムコイル状態特有のスペクトルが得られた。1H-15N 交差ピークは明瞭に単離したものがおよそ 70 個程度観測される。しかし、ピーク帰属を行うために、3 次元の NOESY-HSQC スペクトルを測定したが隣接残基間 NOE は観測されるものの容易にピーク帰属はできなかった。そこで、完全還元カルボキシメチル化されたリゾチームに対して 8M Urea 中で測定されたピークの帰属結果(Harald Schwalbe,1997,Biochemistry 36,8977-8991)と比較検討するために我々も 8M Urea 中で 0 SS 変異体のスペクトルを測定した。3 次元の NOESY-HSQC も良好な測定結果が得られ前述の完全還元リゾチームと類似のスペクトルが得られた。現在、ピークの帰属を行っている。15N-1H-HSQC スペクトルにおける NH プロトンの共鳴周波数は 0 M Urea 中で中心が約 8.3ppm にあったのが 8M Urea 中では 0.3ppm ほど高磁場側にシフトするものの、ピーク全体の分布は大きく変わらないので、0 M Urea 中でのピークの帰属も成功すると期待して変性剤濃度を順次減らしながら測定を行っている。

N.Oda,K.Hirai,Y.noda,H.Tachibana and S.Segawa : A NMR study on a lysozyme variant without disulfide bridges.