3P045

急速混合法によるヒト・カルシトニンの線維化初期過程の速度論

○富澤 忠¹、野坂 篤子²、城所 俊一¹、曾田 邦嗣¹ (¹長岡技術・生物系、²新潟経営大学)

ヒト・カルシトニン (hCT) は、32 アミノ酸残基からなるペプチド・ホルモンで、分子内に 1 個のジスルフィド結合を持つ。解離性アミノ酸残基として Asp, His, Lys があり、C 末端はアミド化されている。hCT は、中性 pH、高ペプチド濃度で、分子間 β -シート構造をもつ線維状の会合体を形成することが知られている。我々は、pH 7.0、低濃度 hCT (5.7 μ M) 水溶液に、六弗化イソプロパノール (HFIP) を加えて 10 % (v/v) にすると、線維状の会合体が形成されることを見出した。そこで、この HFIP 誘起による hCT の線維化機構を調べるために、ストップ・フロー装置と自製の手動試料溶液均一混合器を用いて、CD スペクトルの時間変化を測定した。pH 7.0、25 $^{\circ}$ C、マニユアル混合法で、HFIP 濃度を 0 から 10 % (v/v) にジャンプさせたときの遠紫外 CD スペクトルの時間変化から、混合後 10 s 以内に、混合前のランダム・コイル構造から α -ヘリックス構造への転移が起こり、その後 2 hr 以内に会合・線維化が進行することが分かった。また、会合速度の蛋白濃度依存性を調べるために、2.9, 5.8, 8.7, 72.5, 145 μ M の 5 種類の hCT 濃度について、CD スペクトルの時間変化を測定した。222 nm での CD 値の時間変化を単一指数関数解析して会合の速度定数を求め、hCT 濃度に対して両対数プロットして直線フィットを行うと、その勾配は 1.8 ± 0.2 (相関係数 0.99) であった。以上の結果から、(1) 他の場合と同様に、hCT でも、HFIP の添加は α -ヘリックス構造の形成を促進する効果を示す、(2) hCT の分子間会合は、 α -ヘリックス構造の形成を経由して起こる、(3) 会合の初期過程は、2 分子反応で進行する。

T. Tomizawa, A. Nosaka, S. Kidokoro and K. Soda : Kinetics of the Initial Fibrillation Process of Human Calcitonin by Rapid Mixing Methods

3P047

トリフルオロアルコール中におけるアミノ酸配列とヘリックス形成の協同性

○清水 昭夫、鬼塚 正義、久岡 暁史、亀田 充恵、亀谷 系一、今野 珠美、池口 雅道、須貝 新太郎 (創価大・工・生物工)

トリフルオロエタノール (TFE) はヘリックス形成溶媒として広く用いられている。しかし、ヘリックス形成領域とアミノ酸配列の関係に関しては未知の部分が多い。我々はこれまでモルモット、ヒト、ウシ、ヤギの α -ラクトアルブミンの B-ヘリックス部分を含む 22-34 番目の 14 残基ペプチド (B14GP、B14H、B14B、B14G) を用いてアミノ酸組成とヘリックス形成の協同性の関係を円二色性スペクトル (CD) で調べた結果、B14GP、B14H はヘリックス形成の協同性が高いのに対し、B14B、B14G では協同性が非常に低い事を報告している。また、B14H と B14G のアミノ酸配列は 31 番以降全く同じこと、NMR の結果 B14GP、B14H はほぼ全領域でヘリックスを形成しているのに対し B14B、B14G は 31 番付近で止まっていることから 30 番目のアミノ酸残基がヘリックスストップシグナルとして働く可能性がある事を示唆している。本研究ではさらに B14G の 30 番目を系統的に変えた A30I、A30M について TFE 中におけるヘリックスへの転移を CD を用いて調べた。その結果、30 番目を Ala から Ile、Met に置換すると B14GP、B14H (30 番目はそれぞれ Ile、Met) と同様に転移の協同性が高くなる事が明らかとなった。従って、B14G ペプチドに関しては 30 番目のアミノ酸をヘリックス形成能が高い Ala よりもむしろ疎水性度が高い Ile や Met にしたほうが TFE 中でヘリックス形成の協同性が高くなる、つまり 30 番目のアミノ酸の疎水性が高いことが協同性の高さに関係している事が示唆された。

A. Shimizu, M. Onizuka, A. Hisaoka, M. Kameda, K. Kameya, T. Konno, M. Ikeguchi, S. Sugai : The correlation between amino acid sequence and cooperativity of helix formation in trifluoroethanol

3P046

barnase フラグメントによる集積構造形成に対する各残基の効果

○佐伯 政俊^{1,2}、小中原 猛雄¹、本田 真也²、森井 尚之² (¹東京理大院・理工・工業化学、²産総研・分子細胞・蛋白質構造形成)

barnase の M1 フラグメント (24 残基) は、pH 7.5 で溶解後経時的に集合体を形成し、これに伴い特定の二次構造 (以下 s 構造と命名) をとることが知られている。本研究では、プリオンなどとも関連するこのような繊維状 集合体形成の一般的機構の解明を目指して、この M1 フラグメントの各種変異体による s 構造形成を調べた。

野生型 (WT): A Q V I N T F D G V A D Y L Q T Y H K L P D N Y は荷電性アミノ酸として 3 個の Asp、1 個の Lys を有している。D8N、D12N、D22N 及び類似の変異を末端に加えた C 端アミド体については、WT が pH 7.5 で s 構造形成するのに対して、アルカリ性側の pH 8.5 と 10.0 で s 形成が見られた。また、V3A、I4A、V10A、L14A、L20A について L14A、L20A 以外では s 構造形成が見られないため、N 端寄りの疎水性部の s 構造への関与が考えられる。アミノ酸側鎖の微妙な s 構造形成の関与を探るため、性質の近いアミノ酸への変異体 (V3Nva、N5Q、V10Nva、D12E、Y13F、Y17F、D22E、N23Q) (Nva は norvaline) について検討したところ、CD 強度に違いはあるものの同じ溶解条件 (pH 7.5) で s 構造を形成した。すなわち側鎖の微細な構造の違いは s 構造にそれほど影響しないように思われる。s 構造に関係する残基構造を特定するため、各 1 残基を L アミノ酸から D アミノ酸へ置換した一連の変異体を合成した。Q15q (小文字は D アミノ酸を示す)、T16t、H18h、D22d、N23n などで s 構造形成が見られたが、N 端側領域での L-D 変異体では見られず、N 端側領域の s 構造への寄与が大きいことが予想される。また一部の L-D 変異体 (A11a、K19k) では β -シート構造が形成された。さらに他種の変異体についての実験結果についても報告する。

M. Saiki, T. Konakahara, S. Honda and H. Morii : Effect of Each Amino Acid Residue on The Formation of Assembly by Fragment of Barnase

3P048

フィブリノーゲン水溶液の溶存状態への低温効果

○彼谷 美千子、山田 明子、外山 吉治、窪田 健二、坂西 明郎 (群馬・工)

フィブリノーゲンは血液凝固や赤血球集合の主要因子であり、血液のレオロジー的性質を大きく左右する血漿タンパク質の一つである。一方、血漿中のフィブリノーゲンは低温で析出するなどその溶存状態は温度に対して極めて敏感である。さらに我々は血液を低温に曝すと血液粘度や赤血球集合が著しく増大することを見出した。従って、低温で観察されたこれら特異な現象とフィブリノーゲンの溶存状態の温度変化との間には密接な関係があると考えられる。本研究ではフィブリノーゲン水溶液の濁度および粘度の測定から溶存状態への温度変化を調べるとともに、動的光散乱測定によりその分子挙動を追跡した。試料はフィブリノーゲンをリン酸緩衝液に 0.6 g/dl で溶解した。粘度は、回転粘度計を用いズリ速度 11.25 s^{-1} で測定し、濁度は波長 540 nm の透過光強度より測定した。温度制御はプログラム恒温槽にて昇降温速度 0.1 $^{\circ}$ C/min で行った。動的光散乱の測定は He-Ne レーザーを光源とし、散乱角 30 度において試料を 4.6 $^{\circ}$ C にクエンチした後の散乱光強度と自己相関関数を経時的に記録した。10 $^{\circ}$ C 以下の低温になるとゲル化が観測され、溶液粘度および濁度は急激に増大し、再び温度を上げると可逆でヒステリシスを示した。次に水素結合阻害剤としてこの水溶液に尿素を加えると、0.6 M 以上の濃度でこれらの現象は見られなくなった。一方、動的光散乱の測定ではクエンチ直後、一つであった緩和は時間が経過すると、緩和時間の大きな領域に新たに複数出現し、散乱光強度も増大した。以上の結果からフィブリノーゲンは低温で分子集合し、さらにこれらの集合体は分子間水素結合により熱可逆性のゲルを形成することが示唆された。

M. Kaya, A. Yamada, Y. Toyama, K. Kubota, A. Sakanishi : Effect of low temperature on dissolving state of fibrinogen