1I0930

ソルビトール水溶液中におけるアミノ酸の熱容量と蛋白質変性防止機構

○小田原 剛、月向 邦彦（広大院・理）

ポリオールや糖による蛋白質変性防止効果は、蛋白質の選択的水和に起因することが知られているが、溶媒構造の複雑さのためその分子論的機構については不明な点が多く残されている。蛋白質の溶媒和は熱容量に敏感に反映されるため、蛋白質やアミノ酸を水中からこれらの混合溶媒中へ移行するときの熱容量変化（移相熱容量）は、構造安定性に及ぼす溶媒効果を理解する上で重要な熱力学的基盤を与える。本研究では、断熱型示差走査熱量計（MicroCal MC-2）と精密密度計（Anton Paar DMA5000）を用いて、20 種類のアミノ酸及びジグリシンの、水中とソルビトール水溶液中における絶対熱容量 C_p を 15~90℃の温度範囲で精密に測定し、移相熱容量 $\Delta C_{p,tr}$ を決定した。また、卵白リゾチームについても同様に移相熱容量を測定し、熱変性の熱力学的パラメータと比較して変性防止機構を考察した。

アミノ酸側鎖及びペプチド基の $\Delta C_{p,tr}$ は、疎水性側鎖では負、親水性側鎖とペプチド基では 0 付近の値であった。また、 $\Delta C_{p,tr}$ の温度依存性は、疎水性側鎖では温度上昇とともに絶対値が減少するという共通の傾向を示したものの、親水性側鎖とペプチド基には明確な温度依存性が見出せなかった。リゾチームの C_p は、ソルビトール添加により天然状態に比べて熱変性状態がより大きく減少するため、変性の熱容量変化はソルビトール濃度とともに減少することがわかった。また、変性自由エネルギーの温度依存性より、ソルビトールによる安定化は室温付近ではエンタルピー効果によるが、高温ではエントロピー効果によることがわかった。これらの結果は、ソルビトールが疎水基のまわりの水和に大きく関与しており、疎水性相互作用の安定化をとおして変性を防止していることを示唆している。

T. Odahara, K. Gekko : Heat capacity of amino acids and protein stabilization mechanism in sorbitol aqueous solution

1I1000

ウマ β -ラクトグロブリンの低温変性

○山田 好輝¹、矢島 丈夫¹、藤原 和夫¹、新井 宗仁^{2,3}、伊藤 和輝^{4,5}、清水 昭夫¹、木原 裕⁶、桑島 邦博²、雨宮 慶幸⁷、池口 雅道¹（¹ 創価大・工、² 東大・理、³ 産総研・分子細胞、⁴ 筑波大・物質系、⁵ SSRL, Stanford Univ., ⁶ 関西医大・物理、⁷ 東大・新領域）

ウマ β ラクトグロブリン (ELG) の熱転移を -15℃ から 85℃ の間で追跡した。pH4.0、2M Urea 存在下での CD による測定では高温変性と低温変性の二つ構造転移が観測された。低温変性状態、高温変性状態いずれの状態においても近紫外の CD 強度は失われ、三次構造の崩壊を示す一方、遠紫外部の CD スペクトルは天然構造よりも過剰なヘリックス構造の形成を示した。この二つの変性状態間で遠紫外 CD 強度は異なり、高温と低温の両変性状態が異なる状態であることを示唆された。また、ELG では以前に pH 3 以下の条件や pH4.0、3~4 M Urea 存在下において非天然の α ヘリックスを形成した状態 (A 状態) が見いだされている。低温変性状態、高温変性状態、A 状態の関係を明らかにするため、pH1.5、2M Urea 存在下での CD スペクトルの温度依存を調べた。その結果、室温以上の温度では構造転移は観測されず、pH4.0、2M urea 存在下での高温変性状態と同じ CD 強度を与えた。よって、ELG の高温変性状態は A 状態と同様の構造状態と考えられた。一方、pH1.5、2M Urea 存在下での CD スペクトルは温度の低下に伴って協同的な転移を示し、pH4.0、2M Urea 存在下で観測された低温変性状態と同じ CD 強度に至った。従って、低温変性状態は A 状態とは異なる状態であると考えられた。この結論をさらに確かなものとするため、低温変性状態と A 状態との X 線小角散乱を測定した。その結果、酸変性状態は比較コンパクトな構造であり、慣性半径も天然状態のものに近似しているが、低温変性状態は明らかに大きな慣性半径を示した。また Kratky プロットの結果も明らかに両変性状態間で構造が異なることを示した。

Y.Yamada, T.Yajima, K.Fujiwara, M.Arai, K.Ito, A.Shimizu, H.Kihara, K.Kuwajima, Y.Aneamiya, M.Ikeguchi : Cold denaturation of equine beta-lactoglobulin

1I0945

緑色蛍光蛋白質変異体 (Cycle3) の酸変性と巻き戻り

○榎 佐和子、佐伯 喜美子、桑島 邦博（東大・院理・理学系）

発光オワンクラゲ由来の緑色蛍光蛋白質 (GFP) は、 β バレル型の構造の内側に、天然状態で緑色の蛍光を発する発色団を持ち、遺伝子の発現マーカーや他の蛋白質の標識として広く応用されている。また、天然状態形成のよい指標になることから、分子シャペロンなどが標的蛋白質の形成や変性などにどのような影響を与えるかなどを調べるにも使われている。

GFP の発色団の形成については、多くの研究がなされているが、その天然状態への巻き戻りの機構はまだよくわかっていない。野生型の GFP は凝集しやすいため、変異体である Cycle3 (F99S,M153T,V163A) (野生型の GFP と比較してその性質は大きく変わらないが、凝集しにくく、天然状態への巻き戻り効率が高い。) を使って pH 依存的な安定性、可逆性、pH 変性状態からの巻き戻りの速度過程を調べた。

発色団の蛍光と、2 次構造含量を測定できる遠紫外円二色性 (CD) をプローブとして、pH 依存的転移曲線を測定したところ、pH6.5 くらいから変性し始め、pH 4 くらいで完全に酸変性した。pH 2 変性条件下より、pH ジャンプにより巻き戻して転移曲線を測ったところ、完全に可逆性はみられないものの、天然状態 (pH7.5) へ戻す時には、90% 程度の効率で巻き戻ることがわかった。また、変性状態 (pH2) から天然状態 (pH7.5) への巻き戻りの速度過程を発色団の蛍光で測定したところ、少なくとも 4 つの速度相 ($k_1=2 \text{ s}^{-1}$ (遅延相)、 $k_2=0.2 \text{ s}^{-1}$, $k_3=0.03 \text{ s}^{-1}$, $k_4=0.005 \text{ s}^{-1}$) が見えた。また、遠紫外円二色性 (CD) では、少なくとも 3 つの速度相が見えた。

これらの情報を総合して、2 次構造変化を含めた GFP 変異体 Cycle3 のフォールディング機構を明らかにしたいと考えている。

S.Enoki, K.Saeki, K.Kuwajima : Acid denaturation and refolding of a mutant (Cycle3) of Green Fluorescent Protein

1I1015

変性剤存在下における大腸菌外膜蛋白質 OmpA の立体構造の温度変化

○亀山 啓一、石黒 亮、平松 宏一（岐阜大・工・生命工学）

脂質や界面活性剤などの両親媒性分子の存在下で立体構造を形成する膜蛋白質の折れ畳みを理解するためには、その立体構造の安定性に影響を及ぼす物理化学的因子を明らかにすることが必要である。我々は、生体膜内在性蛋白質の一つである大腸菌 OmpA を対象として、様々な条件下における、この膜蛋白質の立体構造の変化の検討を行っている。本研究では、非イオン性界面活性剤 β -オクタシルグルコシド存在下で可溶化した OmpA の、塩酸グアニジンの添加による変性挙動を検討し、さらに、この変性剤存在下での温度変化に伴う立体構造の変化を検討した。

〔実験〕OmpA は、大腸菌外膜より、陰イオン性界面活性剤ドデシル硫酸ナトリウムを用いて可溶化し、各種クロマトグラフィーにより単離を行った後、サイズ排除クロマトグラフィーにより所定濃度のオクタシルグルコシドを含む 50mM ナトリウム-リン酸緩衝液 (pH6.9) で平衡化した。この蛋白質溶液に所定濃度の塩酸グアニジンを添加し、近紫外領域ならびに遠紫外領域の円偏光二色性スペクトルにより OmpA の構造変化を追跡した。

〔結果と考察〕40℃~60℃における尿素変性では、OmpA は一つの間変状態を経る三状態間の構造変化を示すが、温度 25℃におけるグアニジン変性においては、見かけ上二状態転移に近い挙動を示した。これは、OmpA に対して予測されている立体構造の N 末端ドメインと C 末端ドメインが異なる安定性をもつことを示唆する。低濃度のグアニジン存在下における構造の温度変化を検討したところ、N 末端ドメインについては、通常の高濃度の熱変性に加えて低温側でも立体構造が失われるいわゆる低温変性が観測された。これらの結果から、膜内在性の N 末端ドメインと C 末端ドメインの熱安定性を考察する。

K.Kameyama, R.Ishiguro and K.Hiramatsu : Conformational change of E.coli outer membrane protein OmpA with temperature in the presence of denaturants