1L1615

チロシンの蛍光強度変化を指標とした GroEL の構造変化検出

○細野 和彦¹、上野 太郎¹、田口 英樹²、元島 史尋²、座古 保¹、吉田 賢右²、船津 高志¹ (¹ 早大・理工・物理、² 東工大・資源研)

シャペロニン GroEL は、ATP を加水分解しながらコシャペロニン GroES と結合・解離を繰り返すことによってタンパク質の立体構造形成 (Folding) を介助している。本研究室は、これまでに一分子蛍光イメージング法を用いることで、シャペロニン反応サイクルが約 3 秒と約 5 秒の 2 つの律速過程から成ることを明らかにした。この反応サイクルの GroEL の構造変化をリアルタイムに検出するために、蛍光分光光度計を用いて GroEL に存在する蛍光性アミノ酸チロシンの発する蛍光強度の時間変化を測定した (ex.290nm, em.305nm)。変性タンパク質非存在下において GroEL・GroES に ATP を添加したところ、直後に蛍光強度の上昇 (～0.5 秒)、続いて蛍光強度の下降 (～3 秒) がみられ、その後、定常相に落ち着いた。一方、ATP の加水分解が非常に遅い GroEL 改変体 (D398A) を用いて同様の実験を行ったところ、ATP 添加直後に蛍光強度の上昇 (～0.5 秒) があつた後、定常相に落ち着いた。この結果より、蛍光強度下降のフェーズに移るには ATP の加水分解が必要であることがわかる。

次に、検出されたシグナルが、GroEL に存在するチロシンのうち、どのチロシンによるものなのかを特定するために、各々のチロシン部位に変異を入れた GroEL 改変体を用いて同様の実験を行った結果、506 番目のチロシンが蛍光強度変化の主な原因であることがわかった。

今後は、変性タンパク質存在下において GroEL の構造変化の速度がどう変わるか、またその構造変化が、シャペロニン反応サイクルにおいてどのような役割を果たしているのかを追求していきたいと考えている。

K. Hosono, T. Ueno, H. Taguchi, H. Motojima, T. Zako, M. Yoshida, T. Funatsu : Conformational Change of GroEL Studied by Tyrosine Fluorescence

1L1645

[NiFe] ヒドロゲナーゼの構造化学のおよび分光学的研究

○緒方 英明¹、廣田 俊²、八木 達彦³、安岡 則武⁴、樋口 芳樹⁵ (¹ 京大院・理、² 名大・理、³ 静岡大、⁴ 理研播磨、⁵ 姫路工大・理)

ヒドロゲナーゼは水素を可逆的に分解・合成する金属酵素であり、様々な細菌でエネルギー代謝系を円滑に進める上で重要な役割を担っている。ヒドロゲナーゼは活性部位の構造により、[non-metal], [FeFe], [NiFe], [NiFeSe] の 4 種に分類されており、D.vulgaris Miyazaki F のヒドロゲナーゼは、分子量約 91kDa のヘテロダイマーであり [NiFe] 型の活性部位を持っている。酸化型 [NiFe] ヒドロゲナーゼの活性部位の Ni 原子には 4 つのシステイン残基のイオウ原子が配位し、それらのうち、2 つは Fe 原子にも配位しており、ブリッジを形成している。また Fe 原子には非アミノ酸由来の 4 つの配位子があり、そのうち 3 本は SO₄, CO, CN 分子と同定されている。一酸化炭素 (CO) はヒドロゲナーゼの競争阻害剤であることが知られている。本研究では、D.vulgaris Miyazaki の [NiFe] ヒドロゲナーゼの一酸化炭素結合型の X 線構造解析およびラマン分光を行った。その結果、構造解析に用いたすべての結晶において、外部から付加した一酸化炭素は Ni-Fe 活性部位の Ni 原子に配位しており、また、一酸化炭素結合型とその解離型から Ni 原子周辺の電子密度に明らかな差異があることを見いだした。CO 結合型の構造のうち一つに CO と S γ (Cys546) の間に新たな電子密度が見つかった。これは活性部位の反応中間状態を捕らえたものと考えられる。Ni 原子と S γ (Cys546) の周辺に見つかった新たな構造変化は、水素の初期吸着段階において、これら 2 つの原子が重要な役割を担っていることを示唆している。

H.Ogata, S.Hirota, T.Yagi, N.Yasuoka, Y.Higuchi : The structural and spectroscopic chemistry on [NiFe]hydrogenase

1L1630

Precise Evaluation of Cellulase Activity by Isothermal Titration Calorimetry

○Nurul Karim、城所 俊一 (長岡技科大・生物)

Heat is the characteristic of all chemical reactions and isothermal titration calorimetry provides one of the possibilities to detect the catalytic reaction heat with high sensitivity and reproducibility[1]. Cellulase, a polymer of β -1,4-linked glucose residues, is the major polysaccharide component of plant cell walls and most abundant biopolymer. In this paper, isothermal titration calorimetric (ITC) method was applied to evaluate the cellulase activity. An endocellulase produces two major products: cellobiose and cellotriose when the oligosaccharide, cellohexaose is hydrolyzed. This hydrolysis heat was successfully detected by isothermal titration calorimetry and time course of enzymatic reaction was monitored continuously by this method. Cellohexaose was first hydrolyzed to cellobiose and cellotetraose and this hydrolysis was very quick to be observed by ITC, followed by very slow hydrolysis of cellotetraose. The kinetic parameters, K_M and V_{max} , obtained from calorimetric observables clearly indicated that the enzyme catalyzed reaction was well approximated by a simple Michaelis-Menten equation. The calorimetric analysis was combined with the high performance liquid chromatography (HPLC) to observe the hydrolysis pathway and was considered as an effective and precise way to evaluate the activity of cellulases against oligosaccharides.

Reference

[1] S.Kidokoro, *Netsu Sokutei* **28**, 74-82 (2001)

N. Karim and S. Kidokoro : Precise Evaluation of Cellulase Activity by Isothermal Titration Calorimetry

1L1700

高いカタラーゼ活性を有する西洋ワサビペルオキシダーゼの作製とそのカタラーゼ活性上昇機構の解明

○広瀬 修市¹、当舎 武彦¹、島田 秀夫²、高橋 聡¹、石森 浩一郎¹、森島 績¹ (¹ 京大院・工、² 慶応大・医)

ペルオキシターゼとカタラーゼはいずれも H₂O₂ と反応して中間体 Compound I を生成するが、前者は芳香族化合物の酸化反応を触媒する一方、後者は H₂O₂ を O₂ と H₂O に分解する。これらの活性はそれぞれの酵素に特徴的であると考えられてきたが、これらの活性を併せ持つカタラーゼーペルオキシダーゼが細菌類に存在し、ヘム遠位側 Trp が 2 つの活性を制御すると示唆されている。さらに、この Trp は西洋ワサビペルオキシターゼ (HRP) では Phe41 に、カタラーゼでは Asn147、カタラーゼ活性と HOCl 活性を示すミエロペルオキシダーゼでは Gln95 に対応することから、この位置の残基は高酸化状態の中間体の反応性を制御する際に重要だと考えられる。そこで本研究では、HRP の Phe41 を Trp(F41W), Asn(F41N), Gln(F41Q) に置換した変異体を作製することで、HRP におけるカタラーゼ活性の上昇を試み、H₂O₂ を利用する 2 つの活性の制御機構を検討した。ペルオキシダーゼにカタラーゼ活性を付与できれば、ヘム酵素による酸化反応の人工的な制御の指針となり、その応用も期待される。休止状態の変異体はいずれも 5 配位高スピン構造の野生型 HRP とは異なる 6 配位高スピン構造をとり、Compound I の生成速度やペルオキシダーゼ活性の低下を示した。しかし、酸素電極測定の結果、F41W による O₂ 発生速度は野生型 HRP の約 2 倍、F41N 及び F41Q は約 3 倍に上昇した。したがってヘム遠位側にある Trp, Asn, Gln 側鎖の中性 NH₂ (NH) 基によって Compound I と H₂O₂ との相互作用が促進され、カタラーゼ活性が高まったと考えられた。さらにこれらの変異体における CO 体の共鳴 Raman 測定より、ヘム遠位側 His と配位した CO との水素結合が弱まる pH 領域と、カタラーゼ活性が高い pH 領域とが一致することを見出した。つまり、Compound I のヘムポケット内に侵入した H₂O₂ とヘム遠位側 His との水素結合がカタラーゼ活性と相関があると考えられた。

S.Hirose, T.Tosha, H.Shimada, S.Takahashi, K.Ishimori and I.Morishima : Design of Horseradish Peroxidases with the Enhanced Catalase Activity and their Mechanism of Enhancing the Catalase Activity