2K1600

リボカリン型プロスタグランジンD合成酵素の変性過程における特性

○乾 隆^{1,2,3}、大久保 忠恭⁴、恵美 真以子⁵、入倉 大祐^{1,2}、早石 修¹、裏出 良博^{1,2} (¹大阪バイオ研・分子行動生物、²科技団・CREST、³三重短大・生活科学・栄養、⁴阪大・薬・高分子化、⁵愛媛大・医・薬理)

リボカリン型プロスタグランジン (PG) D 合成酵素 (L-PGDS) は、哺乳動物の中枢神経系に高発現し、PGH2 を基質として脳内で睡眠誘発を引き起こす PGD2 への異性化を触媒している。また、アミノ酸配列の相同性から L-PGDS は、リボカリン・スーパーファミリーに属し、レチノイドや甲状腺ホルモンなどの疎水性生理活性物質を高親和性 (Kd=30~100 nM) に結合し、輸送タンパク質としての性質も兼ね備えている。我々はこれまでに、遺伝子組換え型マウス L-PGDS が、低濃度変性剤 (0.5 M 塩酸グアニジン) 存在下において顕著な酵素活性の増強を示し、その増強が二次構造における部分的な構造変化により惹起されることを示した。今回は、酵素活性、CD スペクトル、トリプトファン蛍光および NMR を用いた構造変化の詳細な測定により、L-PGDS の酵素活性が β -sheet 構造の含有量と高い相関関係を示し、変性剤存在下での可逆的な L-PGDS の unfolding 過程において、活性型および不活性型の 2 種類の平衡中間体が存在することを明らかにした。また、ビリルビンや 13-cis-レチナールなどの疎水性リガンドの結合様式も変性剤非存在下での multistate 様式から、活性化状態での二状態様式に変化することを示した。さらに、ヒト脳脊髄液より精製した native ヒト L-PGDS においても、組換え型マウス L-PGDS と同様の傾向が観測された。以上の結果から、L-PGDS は β バレル蛋白質の中で、変性剤による unfolding 過程において多層的な平衡中間体を持つ初めての蛋白質であることが示された。

T. Inui, T. Ohkubo, M. Emi, D. Irikura, O. Hayaishi, Y. Urade : Characterization of Unfolding Process of Lipocalin-type Prostaglandin D Synthase

2K1630

抗原認識における IgM のアフィニティとアビディティ

○飛田 虎之介、織田 昌幸、東 隆親 (東京理大・生命研)

分泌型 IgM は分子量 900kDa の五量体で存在し、10 個の抗原結合部位をもつ。免疫応答初期に産生される IgM は個々の抗原結合部位のアフィニティは低いものの、抗原上の複数のエピトープと同時に結合することで見かけ上の親和性 (アビディティ) を高めていると考えられている。本研究では抗ニトロフェニル (NP) 抗体で同じ抗原結合部位をもつ IgG (A6) と IgM (A6-hC μ)、さらにアフィニティの低い IgM (WT1-6C) 各モノクローナル抗体と、大きさの異なるキャリアー蛋白質 (ウシ血清アルブミン: BSA 67kDa, チキン γ グロブリン: CGG 150kDa, 抗原用 IgM: Ag-IgM 900kDa) に異なる数の NP を導入した各抗原との相互作用を主に BIAcore で測定し、エピトープの密度や抗原の大きさにより IgM のもつアビディティの有効性がどのように変化するかを解析し、五量体としての存在意義の解明を目指した。

アフィニティが 10^6M^{-1} 程度の A6 では、全ての抗原に対して NP の価数が大きくなるほど、その 2 価結合能によるアビディティが強くなった。A6 と A6-hC μ のアビディティを比べた場合、いずれの抗原に対しても A6-hC μ の方が強く、その傾向はエピトープの密度が低くなるほど顕著であった。また A6-hC μ の抗原結合能はキャリアーの大きさが BSA 程度では NP の価数依存的に変化するのに対して、NP 化した Ag-IgM に対してはほぼ均一に十分な結合力 (10^9M^{-1} 以上) を示した。これらの結果は IgM が複数の抗原結合部位を少なくとも IgG より有効に活用し、900kDa 程度の大きさ以上の抗原に対しては最大限の結合能を発現していることを示唆している。また WT1-6C では有効なアビディティを示すのにより高密度のエピトープが必要であったことから、10 価結合能をもつ IgM でも個々のアフィニティでその抗原結合活性が大きく影響されることも明らかになった。

T.Tobita, M.Oda and T.Azuma : Affinity and avidity of IgM in antigen recognition

2K1615

A 型インフルエンザウイルス M1 タンパク質のリンカー領域の構造と機能

○岡田 敦司、竹内 英夫 (東北大院・薬)

A 型インフルエンザウイルスの M1 タンパク質はウイルスエンベロープの内側に存在し、ウイルス粒子の構造保持を担う膜タンパク質である。感染初期において粒子内が酸性化されると、M1 タンパク質は可溶化され、ウイルスの脱殻が起こる。本研究では、M1 タンパク質のドメイン間の Zn フィンガーに類似した配列 (C-C-H-H) を有するリンカー領域に注目した。この領域を含むペプチド (M1zf) の構造の Zn²⁺ 濃度、pH 依存性等について分光学的に解析し、感染初期に起こる M1 タンパク質の構造変化について検討した。

CD スペクトルにより、中性条件下、TFE 含量の増大に伴ない α ヘリックスの増加が観測され、高い疎水環境下では、リンカー領域も α ヘリックスを形成することがわかった。そこで、TFE 50 % 存在下における M1zf の金属結合について、吸収スペクトルにより調べた結果、TFE 非存在下に比べて親和性は低下するものの、Zn²⁺ に対して正四面体型に配位できることがわかった。また、この時、Zn²⁺ に配位することで、 α ヘリックス含量は M1zf 単独の場合に比べて半分程度に減少した。さらに、Zn²⁺ 存在下、非存在下における二次構造の pH 依存性を調べたところ、Zn²⁺ 非存在下では、中性から弱酸性で高い α ヘリックス含量を維持したままのに対し、Zn²⁺ 存在下では、中性で半分程度だった α ヘリックス含量は、pH の低下にともない Zn²⁺ 非存在下と同程度まで増加した。この構造変化は pH 5.94 で生じ、His 側鎖のプロトン化により Zn²⁺ に配位できなくなったことによると考えられる。以上のことから、感染初期において、M1 タンパク質のリンカー領域に結合した Zn²⁺ は弱酸性条件下で解離し、リンカー領域は α ヘリックスを形成すると考えられる。この構造変化が M1 タンパク質の各ドメインの相対配置を大きく変化させ、ウイルス粒子の構造の弛緩、さらにウイルスの脱殻へつながると推察される。

A.Okada and H.Takeuchi : Structure and function of the M1 linker region of influenza A virus

2K1645

ゾル・ゲル法でミオグロビン分子のコンホメーションを固定する

○柴山 修哉 (自治医大・生理・生物物理)

ゾル・ゲル法とは、流動性のあるケイ素化合物のゾルを縮合させてゲル (ガラス) に転換させる化学的なガラス作成法をいう。最近の研究から、ゾル・ゲル法でタンパク質分子をウエットなゲル (水を含む透明な多孔性ケイ酸ガラス) に封じ込めると、タンパク質のグローバルな構造変化の速度が著しく遅くなり、個々の分子のコンホメーションをゲル中に長時間固定できることが分かった。

本研究では、マッコウクジラ・ミオグロビンの脱酸素状態と一酸化炭素結合状態をウエットなゲル中に固定し、これら二つの状態中に存在するコンホメーションの違いを酸素平衡機能の観点から調べている。一酸化炭素結合状態で固定されたミオグロビンは、ほぼ均一な酸素平衡曲線を示し、その酸素親和性 (0.2 mmHg) は溶液のミオグロビンの親和性 (0.5 mmHg) より約 2 倍高かった。一方、脱酸素状態で固定されたミオグロビンの酸素平衡曲線は、顕著な二層性を示し、0.4 mmHg の成分と 14 mmHg の成分の和で記述できた。

現在、ゲル中ミオグロビンのコンホメーション変化のキネティクスを測定中であり、上述の結果と合わせて本年度ではミオグロビンのダイナミックスも含めて議論する予定である。

N.Shibayama : Sol-gel trapping of the conformations of myoglobin