3M0930

赤外分光法による高分子表面へのタンパク質の吸着とそれに伴う構造変化の測定

横山 康弘、○石黒 亮、亀山 啓一、平松 宏一（岐阜大・工）

〔緒言〕医療用高分子の開発などにおいて、固体表面へのタンパク質の吸着とそれによる表面改質は考慮されなければならない問題である。吸着タンパク質層はしばしば、次に続く細胞吸着の足場となり、また更なる連鎖的なタンパク質の吸着を引き起こす可能性がある。そのような吸着タンパク質層の性質はタンパク質の種類や吸着量だけでなく、表面においてタンパク質がどのような構造変化を起こし、どのように吸着層を形成するかに依存するであろう。本研究では、全反射吸収フーリエ変換赤外分光法（ATR-FTIR）によってプリズム上に調製した高分子薄膜上に形成するタンパク質吸着層の時間分解赤外吸収スペクトルを測定した。また、得られたスペクトルの解析によってタンパク質の吸着量、吸着に伴う構造変化、および吸着速度を決定し、吸着過程を検討した。

〔実験〕高分子にはコンタクトレンズの基礎材料の一つである poly(tris(trimethylsiloxy)silylstyrene) (pTSS) を用い、ZnSe プリズム上に薄膜として調製した。タンパク質としてはニトリ卵白リゾチーム およびウシ血清アルブミンを用い、重水溶液中から pTSS 表面に吸着するタンパク質の赤外吸収スペクトルを Perkin-Elmer System2000 を用いて測定した。

〔結果〕アルブミンの吸着は吸着開始から数時間ではほぼ定常状態に達し、その吸着等温線の解析から単層吸着が推定された。また、吸着量の増加に伴う二次構造の変化が観察された。一方リゾチームでは24時間を経過しても定常状態に達しない緩やかな吸着が観察され、少なくとも二つの吸着過程（一次および二次吸着）に分離された。また、吸着等温線の解析からも多層吸着が予想された。吸着リゾチームの構造変化は全吸着量に対する二次吸着量の比に依存しており、吸着層の階層構造が示唆された。

Y. Yokoyama, R. Ishiguro, K. Kameyama, K. Hiramatsu : Infrared spectroscopy for adsorption of proteins on planar surface of polymer and their conformational changes

3M1000

過渡回折格子法で見るアポプラストシアニンの折り畳みダイナミクス

○寺嶋 正秀¹、Choi Jungkwon¹、廣田 俊²、藤本 ゆかり²、片桐 徳子²、渡辺 芳人²、高倍 昭洋³（¹京大院理、²名大院理、³名城大総研）

蛋白質のフォールディング過程を理解するためには、構造やエネルギーなどの種々の物理量を高い時間分解能と広い時間範囲で検出し、そのダイナミクスを研究する必要がある。最近我々は、エネルギー、分子体積、拡散係数といった他の手法では検出困難な物理量を広い時間範囲で時間分解計測できる過渡回折格子（TG）法の持つ特徴に着目し、蛋白質の折りたたみの研究を開始した。ここでは、このTG法を用いて、アポプラストシアニン（ApoPC）の折りたたみ過程を調べた。ApoPCの1つのアミノ酸残基を修飾することにより ApoPC の蛋白質は変性状態になり、紫外光の照射によってこの基を解離させることで、蛋白部分の折り畳みが開始できる。修飾 ApoPC を光励起した後に見られる熱グレーティング成分には、励起後すぐに立ち上がる成分と約400ナノ秒で立ち上がる成分が観測された。この400ナノ秒成分は、ApoPC から修飾基が解離する反応をあらわすものと考えられる。よって、この修飾蛋白を用いることで400ナノ秒の時間分解能で折りたたみ過程を追えることがわかった。単純な光解離反応の場合には、長い時間領域でのTG信号は、親分子と生成分子の拡散を示す2つの指数関数で表されることが期待されるが、ApoPCの場合には非常に複雑な信号が得られた。更にこの信号の形がグレーティングの波数によっても変化することが観測された。この信号は、常に4つの指数関数でよくフィットされ、この時定数の波数依存性より、蛋白質ダイナミクスと拡散現象を区別することができた。求められた拡散係数より、折りたたんだ蛋白質の拡散と変性した元の蛋白の動きが観測されたことがわかった。信号が波数によって変化する興味深い現象や、体積変化のデータを合わせて、統一的にこの折りたたみダイナミクスを議論したい。

M.Terajima, J.Choi, S.Hirota, Y.Fujimoto, N.Katagiri, Y.Watanabe, T.Takabe : Folding dynamics of apoplastocyanine studied by transient grating method

3M0945

口腔連鎖球菌由来グルコシルトランスフェラーゼの自発的フォールディング

○小松 英幸¹、児玉 孝雄²（¹九大・有機化学センター、²九州工大・情報工・生化システム）

口腔連鎖球菌（*Streptococcus sobrius*）由来グルコシルトランスフェラーゼ（GTF）はデキストランにスクロースのグルコース残基を転移し分岐を形成する菌体外酵素である。そのドメイン構造は、N末端からシグナルペプチド（38残基）、N末端ドメイン（ND）（約100残基）、触媒ドメイン（CD）（約850残基）とデキストラン結合ドメイン（DXBD）（約600残基）からなる。シグナルペプチドは菌体外への分泌に伴い切断され、GTFは成熟体となる。フォールディングは膜透過後または膜透過と共役して起こると考えられるが、その分子量が原核生物のたんぱく質としては非常に大きく（176 k Da）、複数のドメインをもつことを考えると、このGTFのフォールディングが自発的におこるのか、それとも他因子を必要とするのか興味深い。そこでGTFのフォールディングについて検討を行った。

まず、GTFのフォールディングが自発的に起こるのか検討した。フォールディングはトリプトファン蛍光と活性により確認した。その結果、GTF（終濃度100 n M）はグアニジン塩酸の希釈（4から0.08M）により、攪拌時間（30秒）以内に、高収率（96%）でフォールディングした。すなわち、GTFは自発的にフォールディングすることがわかった。

次にフォールディングに対する各ドメインの寄与を調べるために、まず各ドメインの安定性への影響を調べた。グアニジン塩酸中での安定性をトリプトファン蛍光を指標にして、GTF、N端欠損体、N端・DXBD欠損体と比較した。GTFとN端欠損体は同じ安定性（変性中点、約1.6M）を示したのに対して、N端・DXBD欠損体では安定性が減少した（変性中点、約1.0M）。これはGTFの安定性はDXBDにより増加していることを示唆している。現在、N端欠損体とDXBD欠損体のフォールディングについて検討している。

H.Komatsu and T.Kodama : Spontaneous folding of glucosyltransferase from *Streptococcus sobrius*

3M1015

光解離性修飾基を用いたプラストシアニンの折り畳み反応の研究

○藤本 ゆかり¹、廣田 俊¹、片桐 徳子¹、Choi Jungkwon²、寺嶋 正秀²、高倍 昭洋³、渡辺 芳人¹（¹名大院・理、²京大院・理、³名城大・総研）

タンパク質の折り畳み反応における構造変化は、開始初期のミリ秒以前の早い段階において最も大きい。初期の変化を検知できる手法があまり知られておらず早い段階の折り畳み過程については不明な点が多い。そこで当研究室において、光解離性基で特定のアミノ酸残基を修飾することによりタンパク質を不安定化させ、光照射による修飾基の解離により折り畳み反応を開始させてタンパク質の構造変化を追跡する新しい手法を開発した。本研究においては、緑色植物などの葉緑体中に存在しβシート構造を有する電子伝達タンパク質であるプラストシアニン（Pc）を用いて、4,5-ジメトキシ-2-ニトロベンジル基による修飾を行い、その修飾アミノ酸部位の特定および得られた修飾Pcの光解離に伴う構造変化について考察した。

修飾Pcは、マンテマ由来Pcのアポ体を精製後4,5-ジメトキシ-2-ニトロベンジル基を導入することによって得た。修飾部位の特定のため酵素消化を行い、得られた画分についてMSスペクトル（MALDI-TOF）測定を行った結果、修飾基がCys84のみに結合していることが示された。得られた修飾Pcについて、355 nmのパルス光を照射したところ、修飾基に由来する355 nmの吸収が減少すると同時に、解離して生成したニトロ化合物由来の280 nm付近の吸収が増大し、修飾基がタンパク質から解離することが確認された。またそのCDスペクトルから、修飾タンパク質が光照射により、部分アンフォールド構造からネイティブ構造に戻る事が示された。この手法と、過渡回折格子法を用いた高い時間分解能での拡散や分子体積等の測定を組み合わせることにより、折り畳み反応の初期過程の解析が可能になると考えている。

Y. Fujimoto, S. Hirota, N. Katagiri, J. Choi, M. Terajima, T. Takabe and Y. Watanabe : Folding reaction of plastocyanin studied with photocleavable modification