3M1030

マイクロ秒分割 FTIR 分光法による一本鎖モノリンの折り畳み過程の観測

○木村 哲就¹、高橋 聡^{1,2}、今野 卓³、石森 浩一郎¹、森島 績¹（¹京大院・工、²科技団・さきがけ研究 21、³福井医大）

蛋白質の折り畳み機構の解明には主鎖の構造変化、特に折り畳み初期のサブミリ秒の時間領域における主鎖の運動に関する情報が必須である。そこで、我々は FTIR 分光法と 50 μ s 以内に溶液を混合できる高速混合装置を用い、一本鎖モノリン (SMN) の折り畳み初期過程を観察した。FTIR のアミド I' 振動は、NMR や CD では検出が困難なターンなどの揺らいだ構造の含量も定量できることから、未解明であった β -シート形成機構に関する情報を得ることが期待できる。

FTIR を用いて、天然状態 SMN の構造含量は α -ヘリックス (1652 cm^{-1}):11 %、溶媒に露出したヘリックス (1638 cm^{-1}):6 %、 β -シート (1629 cm^{-1}):42 %と見積もれた。pD 13.0 でアルカリ変性した SMN を含む溶液の pD を 7.6 へ変化させて折り畳み反応を開始し、反応開始後 150 μ s から 1.1 ms までの時間領域で時分割 FTIR スペクトルを測定した。その結果、150 μ s の時点で α -ヘリックスや β -シート含量はそれぞれ 5 %、7 %であるのに対し、溶媒に露出したヘリックス含量が 37%にも達していることがわかった。1.1 ms までの時間変化を検討すると、 α -ヘリックスと β -シート含量はそれぞれ時定数 0.4、2.3 ms で 11、23 %まで増加する一方、溶媒に露出したヘリックスは時定数 0.5 ms で 15 %まで減少した。以上の結果から、SMN の折り畳みにおいては、折り畳み初期段階に過渡的に形成される溶媒に露出したヘリックスが変化することによって、 α -ヘリックスや β -シートが形成されることが明らかとなった。

天然状態 SMN のヘリックスとシートがその境界面で働く疎水性相互作用によって安定化していることを考慮すると、折り畳み反応初期に起こる溶媒に露出したヘリックスの形成は、その後に形成される二次構造の安定化に寄与する疎水性残基の凝集を、折り畳み初期段階で効率的に行うために必要な過程であると推定できる。

T. Kimura, S. Takahashi, T. Konno, K. Ishimori and I. Morishima : Observation on the folding process of single-chain monellin studied by microsecond-resolved FTIR spectroscopy

3M1100

ヤギ α ラクトアルブミン C ヘリックス変異体の巻き戻りとアンフォールディング

○佐伯 喜美子¹、新井 宗仁^{1,2}、桑島 邦博¹（¹東大・理・物理、²産総研・分子細胞）

α -ラクトアルブミン (α -LA) は今までにフォールディングの機構が調べられてきているが、遷移状態でどこが初めに形成されるのかはまだわかっていない。 α -LA は α -ドメインと β -ドメインの 2 つのサブドメインからできている。モルテン・グロビュール状態では α -ドメインの方が β -ドメインよりもネイティブに近い構造ができている。また、 α -LA は Ca^{2+} 結合蛋白質であり、 Ca^{2+} がフォールディングに重要であることが知られている。そこで α -ドメインに属して Ca^{2+} 結合ループに隣接している α -LA の C-ヘリックス上に変異を導入した変異蛋白質を 4 種類 (I89V, I89A, K93A, L96A) 作製した。平衡条件下でのアンフォールディング転移を円二色性 (CD) スペクトルで測定したところ、4 種類の変異蛋白質はどれも野生型のものよりも不安定化していた。巻き戻り反応とアンフォールディング反応の速度過程をストップフロー CD 法で測定した。K93A と L96A は巻き戻り反応速度は野生型 α -LA と差が見られなかったが、アンフォールディング反応速度が野生型 α -LA よりも速くなっていた。I89V と I89A は野生型よりも巻き戻り反応速度が遅く、アンフォールディング反応速度が速くなっていた。これらのことからリジン 93 とロイシン 96 のまわりは遷移状態で側鎖の密なパッキングが形成されていないが、 Ca^{2+} 結合部位の近傍にあるイソロイシン 89 の周りでは遷移状態で部分的に側鎖のパッキングが形成されていることがわかった。遷移状態で α -ドメインの側鎖のパッキングはできていないが、 Ca^{2+} 結合部位の近傍の側鎖のパッキングは部分的にできていることが示唆される。

K. Saeki, M. Arai, and K. Kuwajima : Refolding and unfolding of C-helix mutants of goat α -lactalbumin

3M1045

CD および蛍光を用いたイヌミルクリゾチームのフォールディング機構の解析

○中尾 正治¹、新井 宗仁^{1,3}、小柴 琢己^{2,4}、新田 勝利²、桑島 邦博¹（¹東大院・理学系・物理、²北大院・理学・生物科学、³（現在）産総研・分子細胞、⁴（現在）カリフォルニア工科大・生物）

タンパク質のフォールディング機構を解明するためには、巻き戻りの速度過程で観測される中間体の性質を特徴づけることが重要である。カルシウム結合型リゾチームの一種であるイヌミルクリゾチーム (CLZ) は、他のカルシウム非結合型リゾチームや α -ラクトアルブミンと異なり、平衡条件の熱変性実験において、安定でより天然状態に近い構造を持った中間体を含む二段階の転移を示す。このような特異な性質を持つリゾチームについて、平衡条件下での性質やフォールディングの速度過程を調べて、相同的構造をもった他の分子における結果と比較することで、タンパク質分子のフォールディング機構を解明する上で重要な知見が得られると期待される。

そこで我々は、塩酸グアニジンを用いて、CLZ の平衡条件下でのアンフォールディング転移および巻き戻りの速度過程を、円二色性 (CD) や蛍光等の分光学的手法を用いて測定した。平衡条件下でのアンフォールディング転移を測定した結果、CLZ は三状態転移を示し、形成される中間状態はウマリゾチームやウシ α -ラクトアルブミンと比較して熱力学的にも非常に安定であることが明らかになった。ストップフロー装置により CLZ の巻き戻り反応を測定したところ、ウマリゾチームの場合とは異なり、少なくとも 2 つの中間体が形成する様子を確認できた。一つは測定装置の不感時間内に形成されるバースト・フェーズ中間体で、天然状態類似の遠紫外 CD 値とある程度の疎水コアを持つ。その後に、遠紫外 CD 値のオーバーシュートが生じて、別の中間体が形成される。この相における蛍光変化が非常に小さいことから、この二つ目の中間体は、バーストフェーズ中間体の後に二次構造の再構成によって形成されると考えられる。

M. Nakao, M. Arai, T. Koshiba, K. Nitta and K. Kuwajima : Folding Mechanism of Canine Milk Lysozyme Studied by Circular Dichroism and Fluorescence Spectroscopy

3M1115

高圧下温度ジャンプ装置によるスタフィロコッカル・ヌクレアーゼ変異体のフォールディング過程の研究

○鎌形 清人¹、中川 達央²、桑島 邦博¹（¹東大院・理・物理、²ユニソク）

蛋白質のフォールディング初期過程を解明するために、高圧下温度ジャンプ装置を開発した。目的は、高圧条件下（1000-2000 気圧）で低温変性をさせた蛋白質のフォールディング反応を測定することにある。

まず、新しく開発した高圧下温度ジャンプ装置が、高圧下でも常圧の時と同様の温度ジャンプ反応をおこせるのかを調べた。フェノールレッドの吸収の温度依存性を利用して調べた結果、温度ジャンプ幅は約 6-10 K であり、測定可能な時間域は約 100 μ s（温度上昇にかかる時間）から 1 s（温度上昇後、温度が一定に保たれている時間）であることが分かった。また、この温度ジャンプ幅や測定可能な時間域は温度や圧力に依存しないことも分かった。

低温変性をさせた蛋白質のフォールディング反応（高圧条件下）を調べるにあたって、その一例として、プロリンのないスタフィロコッカル・ヌクレアーゼ変異体のフォールディング機構を調べた。この蛋白質のフォールディング機構には、2 つの並行的な経路があり、それぞれ、中間体を經由してから天然状態が形成されることがわかっている。低温変性させたスタフィロコッカル・ヌクレアーゼのフォールディング過程（高圧条件下）の温度依存性や圧力依存性について、報告する予定である。

K.Kamagata, T.Nakagawa and K.Kuwajima : Folding mechanism of staphylococcal nuclease mutants studied by a high-pressure temperature-jump apparatus