B085

酸性条件下における α -ラクトアルブミン-中性リン脂質膜複合体の酵素分解

○江口 基¹、坂井 寛子¹、園山 正史¹、美宅 成樹^{1,2} (1 農工大・工・生命工、2 現 名大院・工・応用物理)

α -ラクトアルブミン (以下 α -LA) は、酸性条件下でモルテングロビュール状態と呼ばれる変性中間状態を示す水溶性タンパク質で、この時リン脂質膜 (酸性または中性リン脂質) と相互作用をすることが報告されている。 α -LA とフォスファチジルセリン (酸性リン脂質膜) との相互作用に関する研究で、酸性条件下で混合することで α -LA の一部の領域が膜内に挿入され膜融合を引き起こすことが確認され、その際に挿入されるペプチド領域も特定されている (Kim and Kim, Biochemistry, 1986)。一方、中性リン脂質の場合も、 α -LA の一部の領域が膜内に挿入されて膜破壊または膜融合を引き起こすが、この時の挿入ペプチド領域は特定されていない。さらに相互作用の性質に関しては、酸性リン脂質の場合はそれが持つ負電荷と酸性中で α -LA の持つ正電荷との間の静電相互作用が膜融合現象に重要な役割を果たしていることが分かっている (Hakskau et al., J.Mol. Biol., 2002)。これに対応して、中性リン脂質である DMPC と α -LA の相互作用についても、酸性条件下でのみ α -LA が DMPC 膜の膜破壊を引き起こすことから、静電相互作用の重要性が示唆されている (Sakai et al., Jpn. J. Appl. Phys., 2000)。これらの研究結果をふまえ、今回は α -LA - DMPC 膜系がどのようなメカニズムによって複合体を形成するかを調べるために、まず DMPC 膜に挿入されているペプチド領域の特定を目的とした。そこで本実験では、リン脂質膜に挿入された部位はタンパク質分解酵素で分解されないことを利用して、酸性条件下で α -LA と DMPC 膜とを混合して作成した複合体に酵素を添加してタンパク質を分解し、得られたペプチド断片の分子量を測定することで、膜挿入部位の特定を試みた。膜挿入部位に着目することで、 α -LA と DMPC とが複合体を形成するメカニズムについて考察したいと思う。

M.Eguchi, H.Sakai, M.Sonoyama, S.Mitaku : Protease digestion of alpha-lactalbumin - neutral phospholipid complex at low pH

B087

アルカリ性フォスファターゼ (ALP) の NaOCl 酸化-室温燐光法 (RTPP) による構造変化の測定

○甲斐 義幸¹、小寺 義男²、前田 忠計² (1 中央大学、2 北里大学 (理))

酸素ラジカルによる蛋白質の修飾は生体において重要な意味をもっている。ここでは NaOCl で人為的に ALP を酸化し、蛋白質構造変化を観測した。その結果、酸化修飾に伴い、特に蛋白表層の構造変化で興味深い知見をえた。測定は室温で Ar 気流により脱酸素した NaOCl 溶液に、短時間 (デッドタイム 30 秒) で ALP サンプルを混入、その後静置して燐光発光強度 I (0) および同寿命 τ の時間経過を測定した。また、別に SDS-PAGE および蛍光測定をおこなった。ALP はダイマー構造をもち、サブユニットあたり 3 個の Trp 残基 (1 個は内部、他の 2 個は表層近くに) がある。これら Trp 残基の蛍光スペクトルはネイティブ型であり NaOCl により蛋白質構造は変性しない。SDS-PAGE 測定でも断片化は認められない。従ってこの酸化修飾においては全体的な立体構造が保たれている。次に、内部の Trp109 からの燐光強度 I (0) および寿命 τ を混入後約 1 分から、約 2 時間半測定した。結果、初めの 5 分間程はサンプル混入に伴う一時的な構造変化が安定化する様子が観測された。その後、約 10 分以降では Trp109 の酸化修飾がおり、その様子は 2 段階にわかれる。この初めの段階 (10 分 - 40 分) では緩やかな酸化修飾で I (0) は低下する。この間、酸化剤は消光剤としても働き、その効果を除けば寿命 τ の時間的変化はない。その次ぎの段階 (40 分以降) では急激な酸化がおり I (0) の急速な低下と寿命 τ の減少がみられ、最後近づく。結論としてこの酸化実験で蛋白質の立体構造は保たれており、まず表層部の側鎖が酸化修飾をうける。ある程度、それが進んだのち次の段階で表層部の構造が不安定化し揺らぎが大になって酸化剤が急激に内部に侵入し内部の Trp 残基その他をアタックし全体の酸化修飾がすすむ。つまり、この蛋白質の酸化修飾の過程で、表層部位は最初の段階までは安定であり、内部の保護効果がある。

Y.Kai, Y.Kodera and T.Maeda : Measurement of NaOCl Oxidation of Alkaline Phosphatase by Room-temperature Phosphorescence Method

B086

GroEL アピカルドメインの動的解析: 温度感受性を利用した構造変化の役割同定

○吉見 達成¹、谷口 雅昭²、本郷 邦広^{1,2}、溝端 知宏^{1,2}、河田 康志^{1,2} (1 鳥取大院・医学系・機能再生、2 鳥取大・工・生物)

GroEL のヒンジ 1 に Trp 残基を導入した変異体 GroEL C138W は、ternary complex 形成を境界にサイクルの進行を温度によりコントロールできるという特性持つことが知られている。また、頂上ドメインに Trp 残基を導入した GroEL R231W は、蛍光ストップフロー解析を行うことで頂上ドメインの動的構造変化の観測が可能である。そこでこの 2 つの変異体の特性を同時に利用するため、GroEL R231W に対して C138W 変異と同様の効果が期待できる N-ethylmaleimide (NEM) 修飾を行った NEM-RW を作製し GroEL C138W, R231W と速度論的に比較することでドメイン間情報伝達機構の解明を試みた。その結果、頂上ドメインの構造変化を反映する NEM-RW の蛍光強度変化は、37℃では GroEL R231W と同様の 3 段階の変化 (速い順に Phase A, B, C) として観測されたが、25℃ではその内の Phase C が消失した。一方、ヒンジ 1 の構造変化を反映する GroEL C138W の蛍光強度変化は、37℃では 2 相で観測されたが、25℃ではその内の一つが消失した。この結果は、ヒンジ 1 と頂上ドメインの構造変化 (Phase C) が連動したものであり、加えてこの温度に依存して現れる動的構造変化は、ternary complex 形成から次のステップに進むために必須の構造変化であることを示唆する。また、GroEL C138W の蛍光強度変化に認められる ATP 濃度に依存した遅延時間と、NEM-RW の Phase A とに相関関係が認められたことから、頂上ドメインにこの構造変化が生じた後、ヒンジ 1 の構造変化が開始されることが分かった。発表では、我々の行った速度論的解析から考え得る GroEL のドメイン単位の連続した構造変化機構を提案する。

T.Yoshimi, M.Taniguchi, K.Hongo, T.Mizobata, Y.Kawata : Analyzing the specific role of apical domain movements using temperature sensitizing in chaperonin function

B088

亜鉛によるアミロイド β 凝集促進効果とヒスチジン残基の位置との関係

○三浦 隆史、鈴木 紀代子、竹内 英夫 (東北大院・薬)

亜鉛イオン [Zn(II)] はアルツハイマー病の原因となるアミロイド β ペプチド (A β) の凝集を強く促進することが知られている。我々は、Zn(II) による凝集の際に、アミノ末端領域に 3 個含まれる His 残基が A β の主要な金属結合部位となることをラマン分光法を利用して見出しているが、個々の His 残基の A β 凝集における役割は不明である。本研究は、Zn(II) による A β の凝集と His 残基の位置との関係を明らかにすることを目的として、各々の His を Ala に置換したペプチドを合成し、Zn(II) による A β 凝集を定量的に調べた。

ヒト A β のアミノ末端 16 残基に相当するペプチド A β 1-16、およびその 6, 13, 14 位の His をそれぞれ Ala に置換したペプチド [A β 1-16(H6A), A β 1-16(H13A), A β 1-16(H14A)] の凝集に対する Zn(II) 濃度依存性を、上清中に残ったペプチドのラマン散乱強度を測定することにより調べた。A β 1-16(H6A) の場合、Zn(II) による凝集量はペプチド中に含まれる His 残基に対する Zn(II) のモル比 (R) が 1 以下では野生型 A β 1-16 と比べてやや減少するが、R > 1 では野生型と同様にほぼ完全に凝集した。これに対して、A β 1-16(H13A) と A β 1-16(H14A) では、野生型 A β 1-16 と比較して A β 凝集量が R > 1 においても顕著に減少した。これらの結果から、13 位と 14 位の 2 個の連続する His 残基の存在が Zn(II) による凝集の主な原因になると考えられる。次に、2 個の His 残基間の距離と Zn(II) による A β 凝集効果との関係を明らかにするために、His13 と His14 の間に Ala を 1 個挿入した A β 1-16(HAH) および 2 個挿入した A β 1-16(HAAH) についても同様の実験を行なった。A β 凝集量は A β 1-16 > A β 1-16(HAH) > A β 1-16(HAAH) の順に減少し、2 個の His 残基間の距離が近い方が、Zn(II) による A β 凝集効果が強く現れることがわかった。

T. Miura, K. Suzuki and H. Takeuchi : Relationship between zinc-induced aggregation and amino acid sequence of amyloid β peptide