B121

非干渉性中性子散乱による蛋白質動力学の時間スケール依存性

○中川 洋¹、上久保 裕生¹、筑紫 格²、金谷 利治³、J.C.Smith⁴、片岡 幹雄¹ (¹奈良先端大・物質創成、²千葉工大、³京大・化研、⁴ハイデルベルグ大)

タンパク質の天然構造は、熱揺らぎによっていくつかの構造状態をとる。低温ではエネルギーランドスケープ上のローカルミニマムでの振動的な運動が支配的であるが、温度が上昇するにつれエネルギー障壁を超えるような運動が生じ、動力学転移が観測される。本研究では非干渉性中性子弾性散乱測定を行い、Staphylococcal nucleaseの野生型と、その変性状態にあるC末端を欠損させたフラグメントの動力学構造を比較した。試料にはそれぞれ凍結乾燥した脱水和試料と、それを重水によって水和させた粉末試料を用いた。非干渉性中性子弾性散乱測定のQ依存性からは、タンパク質を構成する水素原子の平均自乗変位を求めることができる。実験にはエネルギー分解能が $1\mu\text{eV}\sim 1\text{meV}$ まで1桁ずつ異なる4つの分光器を用いて、10Kから300Kまでの様々な温度で非干渉性中性子弾性散乱測定を行った。これらのエネルギー分解能の違いは、4ns～4psまで1桁ずつ異なる時間スケールにおける、みかけの平均自乗変位が評価されることを意味する。脱水和、水和に関わらず野生型とフラグメントは共に、観測する時間スケールが長くなるほどみかけの平均自乗変位は大きくなった。いずれの試料も約150Kで動力学転移が観測され、この転移現象は400psより遅い運動で顕著に観測されることが分かった。150Kの動力学転移温度以上で、40psと400psでみる平均自乗変位の差は野生型よりフラグメントの方が大きくなることが観測された。このことはフラグメントの方が、この時間スケールの中でエネルギー障壁を超える確率が高くなると解釈することができ、エネルギー障壁の高さがフラグメントの方が低くなると言える。この結果は、タンパク質は天然構造に折り畳むことで動力学構造が変化することを示している。

H.Nakagawa, H.Hironari, I.Tsukushi, T.Kanaya, J.C.Smith and M.Kataoka : Timescale dependent protein dynamics studied by incoherent neutron scattering

B123

FRETによるGroEL内部での基質タンパク質の運動解析

○上野 太郎¹、田口 英樹^{2,3}、多田 限 尚史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、³科技団・さがけ21)

[目的] シャペロン GroEL は、大腸菌内でタンパク質の折れたたみを助ける代表的な分子シャペロンである。1分子蛍光イメージング法を用いた我々の研究により、GroELによる基質タンパク質の折れたたみ反応機構は、大きく分けて2つの律速過程から構成されていることが分かった。さらに、基質タンパク質としてGFPを用いたところ、最初の律速過程ではGFPの折れたたみが阻害されており、2番目の律速過程で折れたたみ始めることが明らかになった。基質タンパク質の折れたたみがどのようにして制御されているのかを明らかにするため、蛍光エネルギー移動 (FRET) を用いて GroEL 空洞内での基質タンパク質の位置の解析を試みた。

[方法と結果] GFP を蛍光色素 Cy3 で標識した。また、GroEL, GroES, ATP 依存的に折れたたみという理由からよく研究されているリンゴ酸脱水素酵素 (MDH) を新たに基質タンパク質として選び、蛍光色素 BodipyFL で標識した。一方、遺伝子工学を用いて GroEL の縁部分にシステインを導入し (E315C)、蛍光色素 IC5 を結合させた。アクセプター IC5 とのフェルスター距離は、BodipyFL が 4.9nm、Cy3 が 4.7nm であり、GroEL 内部で運動する基質タンパク質をモニターするのに都合がよい。解析の結果、MDH、GFP とも GroES 結合後～0.5 秒で内部空洞の底部分に落としこまれ、～3 秒かけて底部分から離れた後、～5 秒かけて GroES と共に GroEL の外部に放出されることが分かった。以上から、最初の律速過程では GroEL の底部分に基質タンパク質がとどまることで折れたたみが阻害されており、その後 GroEL の底から解放されて折れたたみが始まることが示唆された。また、GroEL 内部での基質タンパク質の位置の変化は、その種類によらないことが示された。

T. Ueno, H. Taguchi, H. Tadakuma, M. Yoshida and T. Funatsu : Analysis of the motion of substrate protein in the GroEL cavity using FRET technique

B122

大規模構造変化におけるモード結合

○伊藤 一仁^{1,2}、笹井 理生¹ (¹ 名大院・情報科学、² 科技団・ACT-JST)

フォールディング、アロステリック変形など蛋白質の大規模な構造変化を記述するために、エネルギーランドスケープ描像が有効であることが認識されつつある。これは、構造変化を表す少数の変数を軸とした自由エネルギー曲面上の確率的運動として、蛋白質のダイナミクスを表す方法である。一方、分子動力学計算を基盤とした蛋白質ダイナミクスの表現法として、ノーマルモードによる表現が有用である。本研究では、Go-like 相互作用に基づいたモデルを検討し、エネルギーランドスケープ上の大規模構造変化をノーマルモード描像で表現することを試みる。強い非線形性のため、集団運動に対応する遅いモードと安定性に関わる速いモードはミックスして、モード間の組み替えが起こるが、大規模構造変化はこうした自由エネルギー曲面上のモード結合様式の変化として捉えることができる。上のモデルを蛋白質フォールディングの過程と光受容タンパクである Photoactive Yellow Protein の光サイクルにおける構造変化に適用した結果について報告する。

K.Itoh, M.Sasai : Mode Coupling in Large Scale Conformational Change

B124

大腸菌 ClpB の蛋白質修復機能における立体構造の揺らぎの役割

○谷 泰史、田中 直毅 (京工繊大・繊維)

【目的】大腸菌由来分子シャペロン ClpB(HSP100) は分子シャペロン DnaK システムと協同して凝集蛋白質を天然構造へと修復する。ClpB は4つのドメインを有しており、N-ドメインとC-ドメインが基質認識に関与すると考えられている。N-ドメインは基質の結合を ATPase ドメインに伝達し ATPase 活性を増幅するがその機構は不明である。これまで我々は分子シャペロンの基質結合ドメインを断片化した機構研究を行っており [1,2]、本研究でも同様に ClpBN-ドメインの断片 (ClpB1-147) を用いて立体構造の揺らぎと活性の相関を明らかにした。【結果】N-ドメインにおいて保存されている T7、D103、E109 をアラニンに置換すると ClpB のシャペロン活性が大幅に抑制されるが S84 をアラニンに変異すると活性を増幅することが報告されている。我々はこの変異にともなう活性変化の原因を調べるために ClpB1-147 について同じ変異体を作成してその構造、物性を調べた。変異体の二次構造は野生型と同じであったが、T7、D103、E109 の NMR スペクトルに違いが見られた。この結果は疎水コアに存在する Leu ないし Val の環境が点変異によって変化したことを示唆している。さらにシステインの化学反応を利用した実験により [3] T7、D103、E109 において立体構造のゆらぎが変化して機能に影響を及ぼしたことを示す結果について報告する。

【文献】

- [1] N. Tanaka & A. R. Fersht J. Mol. Biol. 292, 173-180 (1999).
- [2] N. Tanaka et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99, 15398-15403 (2002).
- [3] N. Tanaka, D. Mitani & S. Kunugi Biochemistry 40, 5914-5920 (2001).

Y.Tani and N.Tanaka : The role of the conformational fluctuation on the activity of E.Coli ClpB