B133

タンパク質フォールディングにおけるシャペロニンの閉じ込め効果と強制アンフォールディング：分子動力学シミュレーション

○高城 史子¹、高田 彰二^{1,2} (¹ 科技団さがき、² 神戸大・理・化学)

シャペロニン GroEL/ES は、その内部の空間に変性したタンパク質を取り込み、タンパク質の構造形成を促進させることが知られている。GroEL/ES については、X 線による構造や、基質タンパク質、ATP との結合サイクル等詳細に調べられている。しかし、基質タンパク質の構造形成を助ける機構については、ミスフォールドした基質と結合して凝集を防ぐ、いわゆる "Anfinsen cage モデル" や、ATP や GroES との結合時の GroEL の構造変化によって基質を "ほどく" とする "iterative annealing モデル" などが提案されているが、未だ解明されていない。これまでに我々は、シャペロニンを模したケージ内でのタンパク質の構造形成について分子動力学シミュレーションを用いて研究を行ってきた。その結果、前回の発表では、Go-model を用いたフォールディングシミュレーションにより、タンパク質とケージの相互作用が非特異的な斥力のみであっても、すなわちシャペロニンの "閉じ込め" 効果のみで、フォールディング転移温度の上昇や、フォールディング速度の変化がみられることを示した。今回は、より現実の系に近付けるためタンパク質内の疎水性相互作用を導入した。このようにタンパク質がミスフォールド状態を取り得る場合の閉じ込めがタンパク質フォールディングに及ぼす影響を調べる。さらに GroEL による基質タンパク質の強制アンフォールディングのシミュレーション結果についても発表する。

F. Takagi and S. Takada : The effect on protein-folding of encapsion and forced-unfolding by chaperonin cage: Molecular dynamics simulations

B135

2SS 変異体の HD 交換反応からリゾチームの折りたたみ反応初期過程を考察する

○坂本 恵子¹、山崎 向太¹、東 やすよ¹、野田 康夫¹、橋 秀樹²、瀬川 新一¹ (¹ 関学大・理工、² 神大・理・生物)

リゾチームの S-S 結合再酸化実験は、このタンパク質が立体構造を回復する過程において、2 本の S-S 結合が回復した 2SS 体から 3SS 体が出現する段階の解析が鍵であることを示唆している。我々は、アミノ酸置換によって S-S 結合を欠損させた種々のリゾチーム変異体の平衡構造を NMR 分光法によって研究してきた。2SS 変異体になると大きく秩序構造を失うことが分かったが、C6-C127 間と C30-C115 間の S-S 結合を保持する 2SS 変異体：2SS[6-127, 30-115] では、 β ドメインの秩序構造を失うものの、 α ドメインには安定な秩序構造が見出された。一方、他種の 2SS 変異体にはこのような明瞭な立体構造は見出されない。我々は C64-C80 と C76-C94 間の 2 本の S-S 結合をもつ 2SS 変異体：2SS[64-80, 76-94] と、前述の 2SS[6-127, 30-115] 変異体に残る弱い部分秩序構造の柔らかさを測定するために主鎖 NH の HD 交換反応を用いた。NMR スペクトル測定中に HD 交換反応が進行しないようにするため、DMSO (ジメチルスルフォキシド) 溶媒中で、2 次元 HSQC スペクトルを観測した。2SS[6-127, 30-115] 変異体においては、 α ドメイン内部と、I55、L56 残基の近傍のプロテクション因子が 20-30 と大きく、交換反応が明確に阻止されていることが明らかになった。一方、 β ドメインの柔らかい部分のプロテクション因子は 1 に近く構造の揺らぎが大きい。一方、2SS[64-80, 76-94] 変異体の HD 交換反応速度は、ピーク帰属の出ていない残基 62-79 のループ部分を除いて、分子全体にわたってほぼ 0SS 変異体に近いことが明らかになった。グリセロールを 30% 共存させると、この 2SS 体の 220nm 近傍の CD スペクトルが天然リゾチームのものに近づくことが知られているので、現在この溶媒中で 2SS[64-80, 76-94] 変異体に形成される弱い部分秩序構造の解析を行っている。

K.Sakamoto, K.Yamasaki, Y.Azuma, Y.Noda, H.Tachibana, S.Segawa : HD-Exchange Reactions of 2SS-Variants of Lysozyme and Implications for the Initial Stage of Folding

B134

タンパク質の折りたたみにおける混雑効果

○根木 滋²、徳力 伸彦¹、金城 正孝⁶、卜部 格¹、四方 哲也^{1,2,3,4,5} (¹ 阪大院・応用生物工、² 阪大院・情報科学、³ 阪大院・生命機能、⁴ 東大院・総合文化、⁵ 科技団・さがき研究 21、⁶ 北大・電子研)

生命体内では、生命分子が細胞内で占める体積は全体の 20-30 % に達し、分子が混み合った状況を作り出している。このように、分子が非常に混み合うことを、molecular crowding と呼ぶ。分子どうしが非常に混み合った状態での生命分子の挙動と、生命分子を化学する際によく用いられる状態 (希薄な状態) での生命分子の挙動は同じであるだろうか? その問いに対して、近年、溶液中に多くの高分子が存在する際に、タンパク質の構造やその機能にどのような影響を与えるかについて実験および理論の面から研究が行われている。当研究室においても、尿素によって変性した RNase A が PEG による crowding 効果により、そのような構造変化をもたらすかについて研究を行ってきた。今回は、分子量の異なる PEG (200 および 20000) および Ficoll を crowding 試薬として用い、CD スペクトル、FCS を用いて、crowding 効果について検討を行った。その結果、高分子量の crowding 剤を用いたときは、変性した RNase A がコンパクトになるが、低分子量の PEG を用いたときはそのような効果が認められなかった。また、今回 PEG30% を含む水溶液の RNase A の ¹H NMR を測定した。水中と PEG30 % 中の NMR スペクトルを比較すると、後者のほうがシグナルがブロードニングするが、水中における完全変性のスペクトルとは明らかに異なることから、PEG 中においても RNase A は特定の構造を持っていることが示唆された。さらに、2.4M 尿素で変性させた RNase A に PEG 30 % を加えた溶液の NMR を測定したところ、PEG30 % のみの NMR スペクトルとほぼ一致することが明らかとなった。このことから、PEG の添加により、構造が回復していることが NMR より確認できた。

S.Negi, N.Tokuriki, M.Kinjo, I.Urabe, T.Yomo : Protein folding by the effect of macromolecular crowding

B136

ヤギ α -ラクトアルブミン α -ドメイン変異体の安定性とフォールディング反応

○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・生物機能)

α -ラクトアルブミン (α -LA) は蛋白質フォールディング機構研究のモデル蛋白質として知られているが、フォールディングの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。昨年度、 α -ドメインにある C-ヘリックスと α ドメイン- β ドメインの境界に注目して変異体を 6 種類 (I55V、W60A、I89V、I89A、K93A、L96A) 作製し、その結果について報告した。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、いずれの変異体蛋白質も野生型蛋白質より不安定化していた。フォールディング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。I55V、I89V、I89A では野生型と比べてアンフォールディング速度が速く、フォールディング速度が遅くなった。W60A、K93A、L96A は野生型よりもアンフォールディング速度は速くなったが、フォールディング速度は野生型と差が見られなかった。これらのことから C-ヘリックス上では、Ca²⁺ 付近と α ドメイン- β ドメインの境界付近は、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。今年度、新たに α -ドメインの様々な部位に変異を導入し、6 種類の変異体 (V8A、L12A、V27A、Y103F、L105A、L110A) を作製した。どの変異体も野生型と同様に大量発現して精製することができた。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、いずれの変異体蛋白質も野生型蛋白質より不安定化していた。フォールディング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 法で測定した結果に関しても報告する予定である。

K.Saeki, M.Arai and K.Kuwajima : Thermodynamic stability and kinetic folding of α -domain mutants of goat α -lactalbumin