B173

好熱菌と常温菌由来 cytochrome *c* の酸化状態と還元状態の熱安定性の解析

○大島 淳¹、内山 進²、吉田 卓也¹、大久保 忠恭¹、三本木 至宏³、照井 教文⁴、山本 泰彦⁴、小林 祐次¹ (¹ 阪大院・薬、² 阪大院・工、³ 広大院・生物、⁴ 筑波大・化学)

(目的) cytochrome *c* は多くの生物で保存されており、様々な面から研究されてきた。horse cytochrome *c* のグアニジン変性から、酸化還元電位に対応して cytochrome *c* の還元状態は酸化状態に比べ安定化されていることが報告されている。我々は超高度好熱菌 *Hydrogenobacter thermophilus* 由来 cytochrome *c*-552 (以下 HTc-552) の立体構造を参考にする事で常温菌 *Pseudomonas aeruginosa* 由来 cytochrome *c*-551 (PAc-551) の熱安定性をわずか5残基の変異導入により大きく上昇させることにも成功した。今回我々は PAc-551 と HTc-552 それぞれの酸化・還元状態での熱安定性を測定することにより、酸化・還元状態での熱安定性の差を明らかにし、構造と安定性の関係を解明することを目的としている。(実験) HTc-552 は中性条件では酸化・還元どちらの状態においても 100℃を越えても天然状態を維持しているため、従来の CD 測定では変性曲線を得ることは不可能であった。そこで我々は耐圧型 CD セルを開発し、pH7.0 での PAc-551 と HTc-552 についてそれぞれの酸化状態、還元状態の熱安定性を測定した。(結果) 222nm のモル楕円率の温度依存性より得た変性曲線から PAc-551、HTc-552 とともに酸化状態より還元状態の方が高い安定性を持つことがわかり、酸化状態に対する還元状態の熱安定性の上昇は HTc-552 より PAc-551 の方が大きくなっていた。また、還元状態での PAc-551 と HTc-552 の熱安定性の差は酸化状態での熱安定性の差よりも小さくなっていることがわかった。本年会では PAc-551 と HTc-552 の酸化状態、還元状態での安定性の差異と立体構造との関連について報告する。

A.Ohshima, S.Uchiyama, T.Yoshida, T.Ohkubo, Y.Sanbongi, N.Terui, Y.Yamamoto, Y.Kobayashi : Thermostability of cytochrome *c* from thermophilic and mesophilic bacteria in oxidized and reduced states

B175

超好熱菌由来 Ribonuclease HII の安定性の解析

○向山 厚¹、高野 和文¹、春木 満²、森川 正章¹、金谷 茂則¹ (¹ 阪大院工・物質生命、² 日大工・物質化学工)

高温条件下で生育する超好熱菌由来の蛋白質は一般に中温菌由来の蛋白質に比べて、熱に安定であることが知られている。しかし、安定性が高すぎる故の実験的な難点などもあり、超好熱菌由来蛋白質の安定化機構に関する研究は不足しており、その全貌解明には至っていない。そこで本研究では、超好熱菌由来蛋白質の安定性や変性過程といった物理化学的性質を解析することで、これらの蛋白質が有する安定化機構を解明することを目的とした。研究対象として *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 株由来リボヌクレアーゼ HII(Tk-RNase HII) を用いた。Tk-RNase HII は分子量約 26kDa の単量体蛋白質でその立体構造が決定されており、可逆的に変性することがわかっている。変性剤変性による平衡実験の結果、50℃での変性のギブスエネルギー変化 (ΔG) の値は 46.3 kJ/mol (pH=9.0) であった。これは、大腸菌由来 RNase HI に比べ Tk-RNase HII が 50℃においてかなり安定であることを示している。一方、25℃で同様の測定を試みたが、1ヶ月経過した後でも、変性および還元反応が完全に一致しなかったために ΔG の値を求めることができなかった。これは変性反応、還元反応またはその両方が非常に遅いために生じた現象であり、Tk-RNase HII は平衡論的に安定化しているだけでなく、速度論的にも安定化しているということが示唆された。そこで、変性の速度実験を行ったところ (25℃)、変性速度、還元速度ともに Ec-RNase HI に比べて非常に遅いということが実証され、速度論的にも安定化していることが明らかになった。現在、様々な温度における変性速度実験を行い、エンタルピー項、エントロピー項も含めた詳細な変性の熱力学的解析を進めている。

A.Mukaiyama, K.Takano, M.Haruki, M.Morikawa, S.Kanaya : Stability of Ribonuclease HII from Hyperthermophile, *Thermococcus kodakaraensis*

B174

高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 由来 cold-shock protein 相同タンパク質の高度安定化機構

○宮下 賀善、林一岩崎 容子、城所 俊一 (長岡技科大 生物系)

好熱菌タンパク質の高度安定化機構を明らかにすることは、タンパク質の立体構造構築の原理を知る上で重要であり、cold-shock protein (Csp) はこの目的に最も適したタンパク質の一つである。本研究では、高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 由来の Csp 相同タンパク質 (*Tth* Csp) の pH 3-7 の熱安定性を精密に評価し、既に報告されている常温菌 *Escherichia coli* CspA (*Ec* Csp) および超好熱菌 *Thermotoga maritima* Csp (*Tm* Csp) の結果と比較した。*Tth* Csp は、His タグを付加した融合タンパク質として大腸菌内で大量発現させ、Ni アフィニティーカラム精製とプロテアーゼによるタグの切り離し行なって単一の標品を得た。高感度示差走査熱量計 VP-DSC を使い、pH 3-7 の条件下で熱安定性を調べた結果、*Tth* Csp は可逆的な二状態熱転移を示すことがわかった。pH 3-5 では、変性温度 T_m におけるエンタルピー変化 $\Delta H(T_m)$ は一次式で近似できることがわかった。この T_m 依存性 (3.2 kJ K⁻¹mol⁻¹) は、*Ec* Csp の値 (3.2 kJ K⁻¹mol⁻¹) と一致し、*Tm* Csp の値 (4.9 kJ K⁻¹mol⁻¹) より有意に小さい。また、熱転移中点温度は、pH 5 で 81.6℃であり、同じ pH での *Ec* Csp (47.7℃) に比べて高く、この安定化はほとんどエンタルピーの寄与であることがわかった。さらに、 T_m Csp は同じ pH で *Tth* Csp より高い転移中点温度 (94.1℃) を持つが、 ΔH は *Tth* Csp の値の方が大きく、エンタルピー的には *Tth* Csp の方が *Tm* Csp よりも安定であると言える。この結果は、好熱菌タンパク質の高度安定化の熱力学的機構が、種によって大きく異なっていることを明確に示している。

Kazuyoshi Miyashita, Yoko Hayashi-Iwasaki, Shun-ichi Kidokoro : The high stabilization mechanism of cold-shock protein homolog from an extreme thermophile, *Thermus thermophilus* HB8

B176

全てのアミノ基をアシル化したリゾチーム立体構造の安定性に対する逆疎水性効果の精密評価

○松橋 佳也、宮口 季晴、城所 俊一 (長岡技科大・生物系)

天然状態で分子表面にある疎水基は、変性状態において他の疎水基と接して部分的に脱水和することにより、変性状態を熱力学的に安定化し、その結果、相対的に天然状態を不安定化すると考えられており、この効果は逆疎水効果と呼ばれている。この効果が実際にどの程度タンパク質の不安定化に寄与するかについては、まだ不明な点が多く、多くの研究が行われている。以前我々は様々な疎水性基を化学修飾により導入したウマ cytochrome *c* 及びニワトリ卵白 lysozyme の蛋白質の安定性に対する逆疎水効果を、それぞれ分光学的手法、熱測定法によって確認した。しかし、これらの試料には、それぞれ、修飾部位が単一ではない、修飾数が不均一であるなどの問題があり、逆疎水効果をより精密に議論するには改良が必要であった。今回、ニワトリ卵白 lysozyme の全アミノ基を完全にアシル化した後、余分にアシル化された水酸基を脱アシル化する方法を用いて、リジンと N 末のアミノ基の 7 か所のみが完全にアセチル化された、単一の化学修飾蛋白質を得ることに成功した。アセチル化蛋白質の吸光・蛍光・円二色性 (CD) のスペクトルは未修飾蛋白質のそれと同じであり、化学修飾による立体構造の変化はないことを確認した。酸性条件下において、この化学修飾 lysozyme を高感度示差走査熱量計 VP-DSC により測定したところ、van 't Hoff エンタルピーは熱測定エンタルピーに一致し、これは全ての lysozyme 分子が同一の安定性で協同的な二状態熱転移起こすことを示している。発表では、アセチル基、プロピオニル基、ブチリル基等の疎水性の異なる修飾基をアミノ基に導入した単一のアシル化 lysozyme について、逆疎水効果による安定化の寄与をより精密に測定した結果を報告し議論する。

Yoshiya Matsuhashi, Kiharu Miyaguchi, Shun-ichi Kidokoro : Precise evaluation of reverse hydrophobic effect on the stability of completely amino-acylated lysozyme