B181

酸滴定熱量測定法による蛋白質の熱力学的安定性の評価

○中村 成芳、城所 俊一（長岡技科大・生物系）

蛋白質の構造、安定性研究において蛋白質の構造変化を調べる分光測定とともに、蛋白質の熱力学的安定性を直接測定できる熱測定は重要な手法となっている。蛋白質の熱変性における熱力学的安定性は示差走査型熱量計（DSC）を用いて精密に評価されている。本研究は蛋白質の酸変性における熱力学的安定性を評価するために等温滴定型熱量計（ITC）を用いた酸滴定熱量測定法という新しい手法を提案する。この手法では、ITCを使い蛋白質溶液にHCl溶液を滴定し、その時の熱を測定する。また酸滴定によるpH変化をpHメーターで測定する。酸滴定における熱とpHを組み合わせて、別に測定した酸の希釈熱を補正することで、蛋白質分子エンタルピーのpH依存性が評価できる。このエンタルピー関数を2状態転移モデルで解析することにより、酸転移に伴うエンタルピー変化、水素イオン結合数変化、転移中点pHが評価できるとともに、様々な温度で測定を行いvan't Hoffエンタルピーを評価する。実際に、濃度0.5mg/mlのウシ肝臓由来リボヌクレアーゼAの20mM NaCl溶液と50 mM ~ 500 mM HCl 20mM NaCl溶液を使用して酸滴定熱量測定法で求めた熱力学パラメータは、円二色性（CD）スペクトルによる立体構造のpH変化の測定結果、およびpH一定の下で行った示差走査熱量測定（DSC）結果と一致した。また酸滴定熱測定法により求めた前述の2種類のエンタルピー変化は実験誤差内で一致し、リボヌクレアーゼAは酸変性において2状態転移を示すことが確かめられた。また転移に伴うエンタルピーのpH依存性を評価し、酸滴定熱測定法によって構造転移に伴う熱容量変化を評価した。

Shigeyoshi Nakamura, Shun-ichi Kidokoro : Isothermal acid-titration calorimetry for evaluating the thermodynamic stability of protein

B183

有機溶媒中でのプロテアーゼ／糖類複合体の触媒活性

○渡部 覚、長谷川 幹展、木瀬 秀夫、小林 正美（筑波大・物質工学系）

酵素は生体内での反応を触媒するため、従来水系で用いられてきたが、近年有機溶媒中においても触媒活性を発現することがわかった。酵素を有機溶媒中で使用すると、水系の逆反応である合成反応に利用でき、また水に難溶な基質を反応に用いることができる。これらの性質は、人工甘味料や医薬品の合成への応用が期待され、盛んに研究が行われている。しかし、酵素は一般に有機溶媒中で触媒活性が非常に低く、変性し失活してしまう。そこで本研究では、有機溶媒中での酵素の活性を保持するために、酵素と水素結合能力のある糖類を共凍結乾燥して複合体を形成し、触媒活性と安定性を向上させることを目的とし研究した。

酵素2.5 mgと糖50 mgを純水20 mlに溶かし、液体窒素で凍結した後、48時間凍結乾燥した。得られた酵素/糖複合体に3%含水アセトン10 mlを加え、5分間インキュベートした後、基質としてN-アセチル-L-チロシンエチルエステル26.9 mg、メタノール1 mlを加え反応を開始した。反応生成物はHPLCを用いて定量し、エステル交換反応と加水分解反応の初速度、収率を算出し、活性を評価した。

様々な種類の糖を用いた実験では、糖の種類によって大きく活性が異なり、活性を上昇させたものもあれば、逆に低下させたものもあった。これは糖分子の大きさの違いや、水に対する溶解度の違いと考えられる。Hp-β-CyDと可溶性デンプンでは大幅な活性の向上が見られたため、さらに温度依存性を調べた。酵素単体では活性が低いが、糖と複合体を形成することにより活性が向上した。糖は広い温度範囲に渡って酵素の失活を防いでいることがわかった。また、複合体は至適温度が10℃低くなった。これは温度が高くなるにつれ、糖が酵素から外れ、複合体が崩れてしまうためだと考えられる。

S.Watanabe, M.Hasegawa, H.Kise, M.Kobayashi : The catalytic activity of protease/sugars complex in organic media.

B182

フェレドキシン-NADP⁺還元酵素の尿素変性○田村 幸介¹、前田 正洋¹、星野 大¹、池上 貴久¹、山崎 俊夫²、長谷 俊治¹、後藤 祐児¹（¹阪大・蛋白研、²理研・ゲノム科学総合研究センター）

<序論>フェレドキシン-NADP⁺還元酵素（FNR）は光化学系Iにおいてフェレドキシンを介したNADP⁺の光還元反応を触媒する。本酵素は314残基のフラビン蛋白質でFAD結合ドメインとNADP⁺結合ドメインからなり、天然状態では両ドメイン間にFADを結合している。本研究ではFNRの尿素変性過程における構造安定性を種々の物理化学的手法を用いて解析した。

<実験・結果>はじめに様々な濃度の尿素存在下におけるCDスペクトルを測定し変性曲線を解析した。25℃および40℃において得られた変性曲線を比較した結果、40℃における変性中点は25℃のものより低濃度側へシフトし、安定性が低下していることが示された。さらにNMRを用いて残基レベルの解析を行った。尿素非存在下における重水素交換反応の解析では、交換から強く保護されている残基が確認された。これらの残基は強固な水素結合を形成しているものと考えられる（図）。また重水素化尿素を用いて40℃で連続的にスペクトルを測定し、その経時変化を追跡した。その結果、低濃度の尿素存在下においては重水素交換速度が速くなっており、尿素によりFNRの天然状態の揺らぎが大きくなったと考えられる。

K.Tamura, M.Maeda, M.Hoshino, T.Ikegami, T.Yamazaki, T.Hase and Y.Goto : Urea unfolding of ferredoxin-NADP⁺ reductase

B184

Developments in ProTherm: Thermodynamic Database for Proteins and Mutants

○Bava Abdulla¹、Gromiha Michael²、上平 初穂³、北島 浩司¹、皿井 明倫¹（¹九工大・情報工学、²生命情報科学セ、³産総研）

Thermodynamic database for proteins and mutants (ProTherm) is a collection of about 13,700 numerical data for several thermodynamic parameters, such as, unfolding Gibbs free energy change, enthalpy change, heat capacity change, transition temperature and activity, which are important for understanding the mechanism of protein stability. It also includes information about experimental methods and conditions, reversibility of folding, details about the surrounding residues in space for all mutants, sequence, structural, functional and literature information. ProTherm is cross-linked with major databases such as PIR, SWISS-PROT, PDB, Protein Mutant Database, Enzyme, BRENDA and PUBMED. Recent update includes the followings: In order to check homologous structures, homologous PDB entries were linked from ProTherm. A new column was added for related entries, which help users to find all the data from the same article easily. T_m data and dG/ddG/dH data were separated and their extrapolated temperatures were given as T in another column. So far, we have placed all the temperatures at T_m field without distinguishing T from T_m for thermal denaturation experiments. This has been causing confusions. The separation will clarify the problem. Molecular weight and amino-acid length were added and the former was included in search option as well. ProTherm is freely available at <http://www.rtc.riken.go.jp/jouhou/protherm/protherm.htm>

K. A. Bava, M. Gromiha, H. Uedaira, K. Kitajima and A. Sarai : Developments in Protherm: Thermodynamic Database for Proteins and Mutants