B185

単純化されたアミノ酸配列を持つ Photoactive yellow protein の物性

○白井 久美子、山崎 洋一、上久保 裕生、今元 泰、片岡 幹雄 (奈良先端大・物質)

蛋白質は種々の相互作用により立体構造を形成している。相互作用はアミノ酸配列に規定されるが、全ての残基が等しく関与するわけではない。一アミノ酸置換を導入しても、影響の無い残基が配列中に存在することは周知の事実である。そこで、我々はアミノ酸が担う構造情報を減らした単純化蛋白質を作製することにより、構造形成に必須な相互作用部位を同定しようとしている。

単純化のモデル蛋白質として、Photoactive yellow protein(PYP)を用いた。PYP は発色団を持ち、構造形成のおおよその指標として呈色を用いることができる。単純化の基本方針は、性質の類似したアミノ酸が同じ構造情報を持つために生じる過剰性を減らすこととした。単純化の法則を変えて全長に渡って単純化を行った PYP(sPYPI, II, III) を大腸菌により発現させたところ、いずれも発現しないか、発色団再構成能を失っていた。そこで、野生型と疎水性残基を残した sPYPIII 間のキメラを作製し、部分的単純化を行った。全長を4つに分割し、その組み合わせに基づいて作製したキメラ 14 個のうち、呈色が確認されたものは 10 個であった。それらの物性から、S1(M1-D10) 領域は相互作用部位を持たず、S3(N43-G86) 領域には、光反応における M 中間体からの戻り過程に伴う構造変化に特に重要な働きをする残基が存在し、また、S2 (I11-Y42)、S4(N87-V125) 領域には、暗状態における構造や光反応を安定にする相互作用が多く存在することがわかった。このことは、相互作用部位の同定に部分的単純化という手法は有用であることを示している。

K.Shirai, Y.Yamazaki, H.Kamikubo, Y.Imamoto and M.Kataoka : Simplification of amino acid sequences of photoacitive yellow protein

B187

シャペロニン GroEL がスタフィロコッカス クレアーゼの巻き戻りに及ぼす影響

○廉岡 昭雄、鎌形 清人、伊野部 智由、佐伯 喜美子、桑島 邦博 (東大院 理学系 物理)

シャペロニン GroEL は標的蛋白質と結合し、その巻き戻りに影響を及ぼす。以前の我々の研究では、GroEL 存在下で、スタフィロコッカス・スクレアーゼ (SNase) は GroEL と結合したまま巻き戻ることが示された。しかし、プロリンペプチド結合の異性化のため、その巻き戻り過程は複雑であり、反応スキームは未解明であった。そこで、プロリンをすべて他のアミノ酸に置換し、不安定化変異 A69T を導入した SNase 変異体 (Pro⁻+A69T) を用いて、系の単純化を試みた。Pro⁻+A69T について、トリプトファン (Trp140) の蛍光をプローブとして、ストップフロー法で pH 2.5 から pH 7.5 にジャンプさせ、蛍光変化と天然状態形成それぞれの速度過程を測定した。その結果、GroEL 非存在下では速度定数 0.75 s⁻¹ と 0.23 s⁻¹ の 2 つの平行な経路で巻き戻り、GroEL 存在下では GroEL に結合したまま、速度定数 0.15 s⁻¹ と 0.031 s⁻¹ の 2 つの平行な経路で巻き戻ることが示された。

さらに、GroEL からの散乱光の影響がない、より定量的なデータを得るため、トリプトファンから IAEDANS への蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) を利用した実験を行っている。トリプトファンの蛍光を利用する場合は入射光の波長 295 nm、検出波長 320nm 以上で観測したが、FRET を利用する場合は入射光の波長 295 nm、検出波長 420 nm 以上で観測することができる。SNase 変異体 Pro⁻+A69T+K64C を IAEDANS でラベルした蛋白質について、ストップフロー法で pH 2.5 から pH 7.5 にジャンプさせ、IAEDANS の蛍光変化の速度過程を測定した。その結果、GroEL 非存在下で 0.56 s⁻¹ と 0.082 s⁻¹ と 0.0055 s⁻¹ の 3 つの相が観測された。GroEL 存在下で同様に実験を行ない、GroEL が SNase の巻き戻りに及ぼす影響について発表する予定である。

A.Kadooka, K.Kamagata, T.Inobe, K.Saeki, K.Kuwajima : Effect of GroEL on the refolding of staphylococcal nuclease

B186

荷電アミノ酸の付加による蛋白質の溶解度の向上

○加藤 淳¹、黒田 裕²、曾田 邦嗣¹ (¹長岡技術科大・生物系、²理化学研究所・ゲノム科学総合研究センター・蛋白質構造機能研究グループ)

蛋白質の構造・物性・機能を解析したり、応用したりする上で、溶解度は、立体構造安定性と並んで、蛋白質という分子機能素子の「質」の評価に大きく関わる因子である。それは、例えば NMR 法による構造解析では、数 100 μ M ～数 mM という高い溶解度が必須であるという研究材料としての質と共に、細胞内は蛋白質の濃厚溶液であることを考えれば、当然のことである。しかし、蛋白質の溶解度は構造安定性と同様に静電相互作用や疎水効果などによって決定されているにも拘わらず、その溶解度に及ぼすアミノ酸置換の影響は、未だ構造安定性ほど研究が進んでいない。

我々は、蛋白フォールディングの研究においてモデル蛋白質として頻用されている、58 残基からなる BPTI(牛脾臓トリプシンインヒビター)の変異体を用いて、蛋白質の総電荷がその溶解度にどのように影響するかを調べた。具体的には、BPTI のカルボキシル末端に、GGKKK と、2 個の gly を介した 3 個の lys 残基を持つタグを付加することによって、蛋白質分子の総電荷を上げた。溶解度は、溶液中の蛋白質濃度を徐々に上げて行き、沈殿の生成が見られた時点で、溶液を孔径 0.1 μ m のフィルターで限外濾過し、濾液中の蛋白質濃度を可溶化の限界と見なして求めた。その結果、lys 残基を付加した BPTI 変異体の溶解度は、付加していないものと比較すると、2～3 倍上昇していることが確認された。今後は、可溶化限界での蛋白質分子の会合状態を調べるために、溶液 X 線散乱実験も行なう予定である。

本研究の結果は、多様な蛋白質の溶解度を、短いタグの付加によって向上する一般的な手法の開発の可能性を期待させる。

A.Kato,Y.Yutaka,K.Soda : Enhancement of Protein Solubility by Adding Charged Amino acids

B188

分子間力顕微鏡を用いた細胞間の接着形成システムに関する接着蛋白質の 1 分子物性計測

○塚崎 克和¹、喜多村 和郎²、清水 一也¹、岩根 敦子³、高井 義美¹、柳田 敏雄³ (¹阪大院・医学、²ロンドン大・ウォルフソン生物医学、³阪大院・生命)

新しく発見された細胞接着機構であるネクチン-アフアディン系は、カドヘリン-カテニン系と協調して細胞間の接着形成システムを時・空間的に制御している。まず、細胞はネクチンを介して相互認識し、その後ネクチンがアフアディンを介してカドヘリン-カテニン系や他の接着蛋白質をリクルートすることにより、細胞間接着が形成されると考えられている。本研究では、このような細胞間の接着形成システムの理解に向けて、分子間力顕微鏡を用い、関与する接着蛋白質について 1 分子計測を通してその物性計測を行う。これら接着蛋白質の機能を 1 分子レベルで計測するために、非常に柔らかいガラスマイクロニードル (～1 pN/nm) を自作し、ナノ計測法と組み合わせることにより超高感度分子間力顕微鏡 (nm-pN-ms) を作成した。次に、試料として接着蛋白質の機能部位とシステイン残基の豊富なヒト IgG の Fc 領域を融合させたキメラ蛋白質 (Cef: Cadherin Extracellular Fragment, Nef: Nectin Extracellular Fragment) を構築し、発現させた。試料は、ガラスマイクロニードルに取り付けた ZnO ウィスカ、および固定基板となるガラスビーズをポリエチレングリコール (PEG) で表面処理し、Fc 領域の高反応性システイン残基を利用することで、PEG を介して固定した。針とビーズを接触・解離させる実験系により、蛋白質 1 分子同士の破断力を計測した。結果として、PEG の伸張性を検出することで、特異的な接着蛋白質 1 分子同士の破断力の計測に成功したので報告する。今後、破断力計測に加え、機能を計測し、接着蛋白質種間の物性の違いについて考察を進めていく。

Y.Tsukasaki, K.Kitamura, K.shimizu, A.H.Iwane, Y.Takai, T.Yanagida : Cell Adhesion Molecules Interaction Probed Using Intermolecular Force Microscopy