B189

ヒトの脳内グロビン蛋白質「ニューログロビン」はシグナル伝達系のセンサーとして機能する

○若杉 桂輔^{1,2}、中野 智美²、森島 績¹ (¹京大院・工学・分子工学、²科技団・さきがけ研究21)

最近、脳神経細胞に特異的に発現し、可逆的な酸素結合が可能な蛋白質「ニューログロビン(Ngb)」が報告された。この Ngb を過剰に発現させると脳虚血、再灌流に伴う細胞死が減少し、他方、Ngb の発現量を低下させると細胞死が増加することから、酸化ストレスに伴う細胞死を抑制する働きが Ngb にあることが示唆される。今回、我々はこの Ngb が脳神経系においてシグナル伝達系を制御する分子として機能しているという仮説を立て、Ngb が関与する脳神経シグナル伝達系を明らかにすることを目指した。まず、Ngb と相互作用する脳内蛋白質分子を特定するために、Yeast Two-Hybrid System 法により、ヒト Ngb を bait とし、ヒト脳 cDNA ライブラリーを用い、探索を行った。その結果、数種類の脳内蛋白質が Ngb と結合することが明らかになった。表面プラズモン共鳴法による *in vitro* の系での蛋白質間相互作用の解析を行った結果、これら脳内蛋白質は、酸化ストレスにより生じる酸化型 Ngb とのみ特異的に結合し、通常の酸素結合型 Ngb とは結合しないことが明らかになった。さらに、この酸化型 Ngb は、脳内蛋白質と複合体を形成することにより、脳内蛋白質の活性を制御していることが明らかとなった。以上のことから、Ngb は、酸化ストレスに伴い構造を変化させ、特定の脳内蛋白質と結合しシグナル伝達系を制御することにより、神経細胞死を抑制していると考えられる。

K. Wakasugi, T. Nakano and I. Morishima : Human neuroglobin as a sensor for signal transduction in the brain

B191

触媒抗体と基質アナログとの結合自由エネルギー：計算による解析

○岡崎 功¹、斎藤 稔¹、織田 昌幸²、藤井 郁雄³ (¹弘前大・理工、²東理大・生命、³大阪府大)

【序】触媒抗体 6D9 は遷移状態アナログの手法で作成された抗体である。加水分解反応の遷移状態を模したハブテン (ホスホン酸エステル (CPD)) によって免疫反応から得られる (藤井ら)。斎藤らは、蛋白質の機能と物性を理論的に研究するための手法として、分子置換/分子動力学シミュレーション/自由エネルギー摂動法を開発し、蛋白質の熱安定性、蛋白質と DNA の結合エネルギーを定量的に求める事に成功している。今回、我々はこの手法を用いて触媒抗体 6D9 と基質 CPD との結合自由エネルギーを理論計算によって求めて解析した。

【方法と結果】6D9 の Fab の X 線結晶構造をもとに、Fab の抗原結合部位を計算対象とした。蛋白質-基質を取り囲む水球のサイズは半径 41 Å である。CPD に含まれる -CF₃ 基を -CH₃ 基に置換することで、結合自由エネルギー変化を計算し、対応する実験値と比較した。シミュレーションを行なうにあたって、CPD の力場を準備し、新たに CPD の原子電荷を分子軌道計算により求めた。CF₃ → CH₃ の結合自由エネルギー変化は、2.8kcal/mol となり、実験値 1.4kcal/mol と近い値になった。エントロピー変化とエンタルピー変化についての比較も行った。詳細は当日発表する。

I.Okazaki, M.Saito, M.Oda and I.Fujii : Binding free energy calculations of catalytic antibody and ligand analogue

B190

蛍光顕微鏡を用いた、高熱菌由来プレフォルディンと基質タンパク質の相互作用解析

○座古 保¹、飯塚 怜²、大河内 美奈²、上野 太郎¹、養王田 正文²、船津 高志¹ (¹早大・理工・物理、²東京農工大・生命工学)

プレフォルディンは、GroupII 型シャペロニンの共役因子であり、真核生物においては細胞骨格形成に関与している。我々の最近の結果から、プレフォルディンとシャペロニンが直接結合することが明らかになったが、タンパク質の受け渡し機構などは解明されていない。

本研究では、プレフォルディンのさらなるキャラクタリゼーションを目的とし、特に基質タンパク質との相互作用について検討を行った。蛍光標識した基質タンパク質 (Citrate Synthase: Cy3-CS、Green Fluorescent Protein: Cy5-GFP) を用い、超好熱性古細菌 *Pyrococcus horikoshii* OT3 由来プレフォルディンに捕捉されている基質タンパク質を蛍光顕微鏡を用いて測定することにより、プレフォルディンと基質タンパク質の解離定数を求めた。さらに過剰量の蛍光標識していない基質を加えることにより、解離速度定数を求めた。その結果、これらの値はそれぞれ 20 nM, 0.006 s⁻¹ (Cy3-CS), 5 nM, 0.003 s⁻¹ (Cy5-GFP) と求まった。さらに、シャペロニン存在下では、解離速度が4倍程度速くなることを見出した。これらの結果より、プレフォルディンと基質タンパク質はダイナミックな平衡状態にあること、プレフォルディンにより基質タンパク質がシャペロニンに効率的に受け渡されることが示された。

T.Zako, R.Iizuka, M.Okochi, T.Ueno, M.Yohda and T.Funatsu : Fluorescence detection and kinetic analysis of interaction between *Pyrococcus* prefoldin and substrate protein

B192

脂肪酸結合 α -ラクトアルブミンの構造と機能解析

○板橋 実希、増渕 雄輝、相沢 智康、熊木 康裕、出村 誠、新田 勝利 (北大院・理)

α -ラクトアルブミン (α -LA) は、ミルクに含まれる蛋白質でラク トース合成酵素の補因子として知られている。 α -LA は123 残基からなる水溶性蛋白質で、4 本のジスルフィド結合とカルシウムの結合により天然状態の立体構造が安定化する。そして、 α -LA はカルシウムの除去、又は酸性 pH において、二次構造を天然様に保持しているが、三次構造は消失しているモルテングロビュール状態 (MG 状態) をとるということがわかっている。最近、ヒト α -LA が特定の不飽和脂肪酸と複合体を形成し、癌細胞へアポトーシスを誘導するという報告がされた。この複合体は MG 状態と似た構造をとっており、天然状態ではこの活性を持たないことが示されている。しかし、複合体の構造に関する詳細や、 α -LA の細胞取込みの初期過程に見られる脂質膜結合の詳細は解明されていない。そこで、本研究では脂質と α -LA の相互作用、 α -LA と脂肪酸による複合体の構造変化のメカニズムを解明することを目的とした。我々はすでに、多種にわたる α -LA、又、キメラ α -LA の立体構造に関する研究を行ってきた。本研究においても、複合体の性質に対する残基特異性や、立体構造の安定性の寄与を比較、考察するため、 α -LA はヒトの他、ウシ、ヒトとウシのキメラ蛋白質を用いた。そして、SPR 法による脂質と α -LA の相互作用解析、NMR 法と CD 法による複合体構造解析を進めている。

M. Itabashi, Y. Masubuchi, T. Aizawa, Y. Kumaki, M. Demura, K. Nitta : Structure and function of α -lactalbumin complexed with fatty acid.