B193

interleukin21(IL-21)とその可溶性受容体間の相互作用解析

○真壁 幸樹、津本 浩平、浅野 竜太郎、熊谷 泉（東北大・理工・生工）

IL-21はその受容体としてIL21R及び共通 γ 鎖(γ c)を用いており、これらが三者複合体となることで細胞内にシグナルを伝達する。その結果、活性化T細胞、NK細胞の増殖、CD40刺激B細胞の活性化を促す。我々はIL-21及びIL-21R、共通 γ 鎖細胞外ドメインを組換え体として作製し、これらの間に働く相互作用を表面プラズモン共鳴法によって解析した。IL-21は大腸菌不溶性画分から段階透析法によって巻き戻し操作を行い、活性体を調製し、IL-21R、共通 γ 鎖細胞外ドメインは昆虫細胞発現系により培地上清画分から調製した。また、IL-21Rに関して大腸菌不溶性画分からの巻き戻しによる調製では段階透析法より希釈法が有効であることを見いだした。表面プラズモン共鳴法による測定からIL-21、IL-21R間の速度論的パラメータは $k_a=3.70 \times 10^5$ (/Ms), $k_d=1.24 \times 10^{-3}$ (/s), $K_D=3.34$ (nM)となり、IL-2とIL-2R α 、 β 複合体間の親和力(1.07nM)に類似であった。また、共通 γ 鎖はそれ単独ではIL-21と観察可能な親和力で相互作用しないが、IL-21がIL-21Rと複合体を形成している状態では強く相互作用することを見いだした。ホモロジーモデリングによる推定の三次構造からIL-21、IL-21R間では静電的な相互作用に強く支配されていることが予想されたため電荷残基の変異体を作製し、現在解析を進めている。

K. Makabe, K. Tsumoto, R. Asano and I. Kumagai : Interaction analysis of interleukin21 and its receptor soluble domain

B195

急速凍結EPR分光法による緑膿菌由来NO還元酵素の短寿命中間体の観測と反応機構解析

○汲田 英之¹、松浦 宏治²、高橋 聡³、堀 洋⁴、福森 義宏⁵、森島 績²、城 宜嗣¹ (¹理研・播磨、²京大院・工、³阪大・蛋白質研、⁴阪大・基礎工、⁵金沢大・理)

バクテリア由来のNO還元酵素(NOR)は、脱窒過程においてNOからN₂Oへの還元反応を触媒するチトクロムbc型の膜タンパク質である。これはヘムcを含む17kDaのサブユニット(NorC)と低スピンヘムb、高スピンヘムb(ヘムb₃)、及び非ヘム鉄(Fe_B)を含む53kDaのサブユニット(NorB)によるヘテロダイマーであり、NO還元の活性部位はNorBのヘムb₃とFe_Bによって複核中心を形成している。また、NorBのアミノ酸配列は、好気呼吸系の末端酸化酵素であるチトクロムc酸化酵素のSubunit Iと高い相同性が見出され、生物の呼吸過程の進化を探る上で注目されている。本研究では、緑膿菌*Pseudomonas aeruginosa*由来NORによるNO還元の触媒反応を、独自の急速凍結システムを用いた時分割EPRスペクトルによって追跡し、反応中間体の構造、電子状態の帰属を行った。本装置は、反応させる2液を特殊な構造をしたミキサーにより混合した後、 ~ 0.2 msにおいて77 Kで凍結させ、反応を停止させることが可能である。反応はジチオナイトにより調製した完全還元型NORに飽和NO溶液を混合させることで開始させ、0.2 $\sim$ 10 msにおける凍結サンプルを調製し、EPRスペクトルを測定した。その結果、反応開始後1 ms以前のEPRスペクトルでは、 $g = 2$ 付近に5配位型ニトロシルヘムに特徴的なN核による超微細分裂を含むシグナルと同時に、 $g = 4$ にNOと高スピン状態の非ヘムFe²⁺($S = 2$)の相互作用により生じた $S = 3/2$ 状態に起因したシグナルを観測した。この結果は、NO還元の反応中間体においてヘムb₃とFe_BのそれぞれにNO分子が配位した構造をとり、ヘムb₃ではNOが配位することによりHisN-Fe²⁺の結合が切断されることを明らかにした。現在、これを基にNORによる触媒反応機構に関して検討中である。

H. Kumita, K. Matsuura, S. Takahashi, H. Hori, Y. Fukumori, I. Morishima, and Y. Shiro : Structural and electronic characterization of reaction intermediate of bacterial nitric oxide reductase

B194

不溶性グルカン合成酵素デキストラン結合の定量的解析

○片山 基輝¹、深田 はるみ²、小松 英幸³、児玉 孝雄⁴ (¹九工大院・情報科学・生化、²大阪府立・農、³九大・先端物質化学研、⁴九工大・情報工・生化)

口腔連鎖球菌 *Streptococcus sobrinus*の菌体外酵素である不溶性グルカン合成酵素はN端の触媒ドメイン(110kDa)、C端のデキストラン結合ドメイン(DXB 58kDa)から構成されている。DXBは、繰り返し配列をもつリピート構造タンパク質である。本研究では、長さの異なる4つのDXB欠損変異体(535残基(6R)、454残基(5R)、339残基(4R)、266残基(3.5R))を遺伝子工学的に作製し、等温滴定熱測定を行ない、デキストラン結合によるエンタルピー変化: ΔH 、結合定数: K 、および、結合単位: U (DXBに結合するグルコースユニット数)からリピート構造を持つDXBとデキストラン結合の様態を考察する。

すべての変異体DXBとデキストランの結合は $\Delta H < 0$ (-134 $\sim$ -271KJ/mol), $\Delta S < 0$ (-0.344 $\sim$ -0.762 KJ/K $\cdot$ mol)となり、エンタルピーの減少がDXBとデキストランの結合を駆動していることが分かった。 ΔG ($= -\log K$)の大きさの関係は3.5R < 4R=5R < 6RとなりDXBが長くなるほどデキストランとの結合が強くなる傾向があった。また、 U (17.9 $\sim$ 32.5), ΔH (-134 $\sim$ -271KJ/mol)はDXBの残基数にはほぼ比例した。つまり長いDXBほど長いデキストラン鎖と結合することができる。

以上の結果は、DXBのリピート部分はデキストラン結合ユニットであり、残基数の多いDXBはそのユニットを多く有するためにデキストランとより強く結合していることを示唆する。

M.Katayama, H.Fukada, H.Komatsu, T.Kodama : Thermodynamic analysis of the interaction between dextran and glucosyltransferase.

B196

糖加水分解酵素活性のbicinchoninic acidを用いた高感度測定法

○相馬 聡、Nurul Karim、有川 浩史、城所 俊一(長岡技科大生物系)

糖加水分解酵素活性の評価法の一つとして基質である糖が加水分解されることで生じる還元末端を定量する手法が広く用いられている。特に、この定量法としてSomogyi-Nelson法(SN法)が良く知られているが、この方法には、異なる温度(室温と100℃)を用いた複数の行程が必要で手数がかかる、低濃度の酵素活性を測るのには感度が不足するなどの問題があった。一方bicinchoninic acid(BCA)は、ペプチドにより還元されてできる一価の銅イオンにBCAが特異的に結合して呈色することを利用して、溶液中のタンパク質の濃度決定に広く用いられている。この定量法は妨害物質の影響を受けにくく、簡便かつ高感度である。本研究では、BCAのこのような優れた性質を利用して、糖還元末端の定量に用いることで、簡便で高感度の糖加水分解酵素活性法の開発を試みた。糖加水分解酵素の一例としてカビ由来のセルラーゼのカルボキシメチルセルロースの加水分解活性をBCA法とSN法とで評価し比較した。予め37℃に予温しておいた基質溶液、酵素溶液を混合することで酵素反応を開始し、設定した間隔で反応溶液を採取する。この溶液中の還元末端の定量をSN法は常法により行い、BCA法では20倍量のBCA溶液(BCA Protein Assay Reagent Kit, PIERCE社)と混合し60℃で30分間加熱した後の562nmの吸光度を測定することで定量を行った。様々な酵素濃度で評価し比較したところ、SN法では定量が困難な1 μ g/ml $\sim$ 10 μ g/mlの酵素濃度範囲での酵素活性がBCA法では定量可能であることがわかった。また、酵素濃度の高い条件でもBCA法の方が定量性が高いこともわかった。すなわち、本研究で提案するBCAによる酵素活性評価法は、従来法であるSN法と同等以上の幅広い酵素濃度範囲に適用できる、簡便かつ精密な高感度測定法であると言える。

S.Souma, N.Karim, H.Arikawa, S.Kidokoro : Sensitive and precise method to measure the glycosidase activity with bicinchoninic acid