1P065

シャペロニン GroEL の C 末端欠損変異体の機能解析

○三浦 貴宏¹、座古 保²、上野 太郎²、船津 高志^{1,2} (¹ 早大院・生命理工、² 東大・薬)

(目的) 大腸菌由来のシャペロニンである GroEL は、補因子である GroES と共同してタンパク質の折れたたみを介助する。この反応サイクルは 8 秒で行われるが、最初の 3 秒間は、基質タンパク質の折れたたみが抑制されている^{1,2}。これは、基質タンパク質が GroEL の縁から外れた後も、GroEL の空洞内に結合しているためと考えられているが、この結合部位は全く不明である。そこで本研究では、第 2 の結合部位の候補として、未だに機能が分かっていない GroEL の C 末端部位に注目しこれを削った変異体による、基質タンパク質の折れたたみ過程を調べることにし、C 末端部が第 2 の結合部位かどうかを検討した。

(方法と結果) C 末端を 10 および 20 残基削った GroEL 欠損変異体を作製した。次に、GFP を酸変性させて GroEL と結合させ、GroES、ATP と混合し、シャペロニン反応サイクルを開始させた。蛍光分光光度計を用いて GFP の折れたたみにともなう蛍光の回復を計測したところ、野生型 GroEL と同じく、3 秒間のタイムラグを経て GFP が折れたたんだ。この結果は、GFP の折れたたみ反応においては C 末端が第 2 の結合部位でないことを示唆している。今後は、GroEL に依存して折れたたむリンゴ酸脱水素酵素の巻き戻し実験を行い、C 末端の機能のさらなる解析を行う予定である。

参考文献

- 1 H.Taguchi et al. Nature Biotech 19: 861-865 (2001)
- 2 T.Ueno et al. Mol.Cell 14: 423-434 (2004)

T.Miura,T.Zako,T.Ueno and T.Funatu : Functional analysis of C-terminal deficient mutants of chaperonin GroEL

1P067

チロシン含有オリゴペプチドによる金属タンパク質の還元反応

○廣田 俊¹、奥村 久野²、近藤 崇代¹、舟崎 紀昭¹、渡辺 芳人² (¹ 京都薬大・薬、² 名大院・理・化学)

生体内では、チロシンが酸化されてキノンが生成したり、チロシルラジカルが酵素反応の重要な役割を担ったりしているが、これまでにチロシン含有オリゴペプチドと金属タンパク質との反応に関する詳細な報告はなされていない。そこで、本研究では、ヘムタンパク質であるシトクロム *c* (cyt *c*) と銅タンパク質であるプラストシアニン (PC) を用いて、チロシン含有ペプチドとの反応を様々な反応条件下で調べた。さらに、反応生成物のマスマスペクトルを調べることにし、チロシン含有ペプチドによる金属タンパク質の還元反応の詳細を明らかにした。酸化型 cyt *c* と TyrTyrPhe とを混合すると、cyt *c* は徐々に還元型に変化し、酸化型 PC と TyrTyrTyr とを混合すると、PC が還元された。各反応において、吸収スペクトルの等吸収点が観測されたことより、cyt *c* や PC には反応中間体が存在しないことが示唆された。反応溶液の pH を高くすると反応速度が速くなったことより、ペプチド内のチロシンの脱プロトン化により反応が進行することが解った。反応速度のイオン強度依存性より、cyt *c* と TyrTyrPhe および PC と TyrTyrTyr がそれぞれ複合体を形成して、反応が進むことが解った。各反応生成物を高速液体クロマトグラフィーにより分離精製した後、各フラクションのマスマスペクトルを測定したところ、キノン類やチロシルラジカルによる反応生成物に対応する質量が検出された。以上の結果より、cyt *c* や PC などの金属タンパク質がチロシン含有ペプチドにより還元され、同時にチロシルラジカルが生成することが明らかとなった。

S.Hirota, H.Okumura, T.Kondoh, N.Funasaki, and Y.Watanabe : Reduction of metalloproteins by tyrosine-containing oligopeptides

1P066

大腸菌 AAA プロテアーゼ FtsH による基質タンパク質のアンフォールディング機構

○奥野 貴士、福永 里美、山中 邦俊、小椋 光 (熊本大・発生研・細胞複製)

AAA ファミリータンパク質に属する FtsH は膜結合型プロテアーゼであり、ATP 加水分解依存的に可溶性タンパク質や膜タンパク質を分解し細胞機能の調節を行う。AAA ファミリータンパク質に特徴的なドーナツ型のホモオリゴマーを形成する FtsH は、基質タンパク質の unfolding や、基質タンパク質をリング内側に送り込む (translocation) 際に ATP の加水分解を要求する。我々は、主に in vitro における大腸菌 FtsH の機能解析を進め、その分子機構解明を目指している。今回、FtsH の基質として大腸菌由来のフラボプロテインである flavodoxin を見出し、flavodoxin の安定性の変化が分解に与える影響を検討した。その結果、基質タンパク質の安定性が上がると分解速度が遅くなり、逆に不安定になると分解速度が速くなることが分かった。基質タンパク質の安定化で分解反応が遅くなる一つの要因として、FtsH が基質タンパク質の unfolding に失敗し、基質タンパク質を release する確率が高くなることが示唆された。また、β-ヘアピン構造を有するモデルポリペプチドを用い、ポリペプチドの構造や安定性の違いが FtsH による分解に及ぼす影響についても検討したのでその結果についても報告する。

T.Okuno, S.Fukunaga, T.Yamanaka and T.Ogura : Molecular mechanism of protein degradation by AAA protease FtsH

1P068

多波長観測 bicinchoninic acid 法を用いた糖加水分解酵素活性の高感度測定

○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 °C) を用いた複数の行程が必要で手数かかり検出に毒性の高い砒素を用いる、低濃度の酵素活性を測る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生じる一価の銅イオンに BCA が特異的に結合し呈色することを利用して、蛋白質溶液の濃度決定に広く用いられており、妨害物質の影響を受けにくく、簡便でかつ高感度な定量法である。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。glucose を BCA 法と SN 法で定量し比較したところ、BCA 法では 1 μg/ml ~ 500 μg/ml と SN 法を超える濃度範囲で定量が可能であった。また、多波長 (662 ~ 462nm) で観測することで、より高濃度範囲でも高い精度で定量が可能である。糖加水分解酵素の一例として B. species 由来 α-amylase による amylose の加水分解活性を BCA 法と SN 法とで評価し比較した。37 °C で酵素反応を行い、生じる還元末端の経時変化を SN 法は最適条件下で常法により行い、BCA 法では 60 °C、30 分の検出条件を用いた多波長観測法により定量を行った。様々な酵素濃度、基質濃度で評価し比較したところ、BCA 法で SN 法と同等以上の範囲で定量が可能であった。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定量範囲を持ち、簡便でかつ精密な高感度測定法であると言える。

S.Souma, N.Karim, K.Arikawa and S.Kidokoro : Sensitive and precise measurement of the glycosidase activity using multi-wave-length bicinchoninic-acid method