3P009

変性剤によるポリペプチド鎖のヘリックス-コイル転移の統計力学的解析

○新庄 正路¹、Li Jinsong¹、清水 昭夫²、加納 文晶³、松村 義隆¹、寺本 明夫⁴、木原 裕¹ (¹ 関西医大・物理、² 創価大・工学・生命情報工学、³ 昭和大・教養・物理、⁴ 立命館大・理工)

変性剤による蛋白質の変性、ポリペプチド鎖のヘリックスコイル転移は、広く使われているが、その統計力学的解析は充分なされていない。我々は、残基数が17のC17ペプチドを用い、塩酸グアニジンによるヘリックス-コイル転移を測定し、Zimm&Bragg1)の理論を用いて検討した。変性剤濃度とZimm-Braggのsとの関係は、永井2)により与えられた $1/s = 1/s_0(1 + K[\text{GuHCl}])$ を用いて、 $1/s$ と $[\text{GuHCl}]$ の直線性から求めた。直線性が最も良くなるようにsを求めたところ、sが10-3より小さいところではほぼ同じような直線性が得られた。(Fig参照) これらの結果を用いて、CDの変性剤濃度依存性を解析した。発表では、塩酸グアニジンと尿素との比較、別の配列を持つポリペプチドとの比較を示す予定である。

1) B.H.Zimm, J.K. Bragg: (1959) J.Chem.Phys. 31, 526

2) K.Nagai:(1961) J.Phys.Soc.Japan.15,407

M.Shinjo, J.Li, A.Shimizu, F.Kano, Y.Matsumura, A.Teramoto and H.Kihara : Statistical Analysis of Helix-Coil Transition of Polypeptides Induced by Denaturants

3P010

蛋白質のフォールディング・エレメント単体の構造特性

○新井 宗仁、巖倉 正寛 (産総研・生物機能)

蛋白質構造の基本単位として最も合理的なものは、アミノ酸配列上で連続した短い配列要素である。蛋白質のフォールディング・エレメント (FE) とは、このような配列上連続した要素であり、「主鎖の連続していることが天然構造の形成に必須な部位」と定義される。これまでに、網羅的円順列置換解析によって、ジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR) では平均8残基程度のFEが10個同定されている (Iwakura *et al.* (2000) *Nature Struct. Biol.* 7: 580-585)。また、DHFRのフォールディング反応初期にこれらFEが相互作用して集合し、特異的な構造を持った中間体を形成することが示唆されており、蛋白質のフォールディングモデルとして folding element assembly model が提唱されている (Arai *et al.* (2003) *J. Mol. Biol.* 328: 273-288)。今回、FE自体が単独でどのような構造的特性を持つのかを明らかにするために、DHFRのFEのうち7残基以上の長さを持つもの (FE1, FE2, FE3, FE4, FE6, FE7) についてフラグメントをペプチド合成し、円二色性 (CD) スペクトルの測定を行った。その結果、天然条件下では、どのFEフラグメントも変性状態に近いCDスペクトルを示していた。このことは、FEは (必ずしも) 単独で特異的な構造を安定に形成できる単位ではないことを示している。おそらくFEは、蛋白質分子内での相互作用において重要な領域であり、FE同士が相互作用することによって、天然構造様の概形 (主鎖のトポロジー) がフォールディング反応初期に素早く形成されるのではないかと考えられる。

M. Arai and M. Iwakura : Structural characterization of the peptide fragments corresponding to the folding elements of *Escherichia coli* dihydrofolate reductase

3P011

好熱性水素細菌 *Hydrogenobacter thermophilus* シトクロム c の大腸菌での発現と安定性

○及川 健太¹、中村 昇太²、高山 真一³、長谷川 淳⁴、小林 祐次²、山本 泰彦³、内山 進⁵、三本木 至宏¹ (¹ 広大院・生物圏、² 阪大院・薬、³ 筑波大・化学、⁴ 第一製薬、⁵ 阪大院・工)

〔背景と目的〕72℃に生育する好熱菌 *H. thermophilus* のシトクロム c552 (HT) と常温菌 *Pseudomonas aeruginosa* 由来のシトクロム c551 (PA) は、56%のアミノ酸が一致し、主鎖の立体構造も類似している。しかし、HTはPAよりはるかに安定性が高い。立体構造の比較から、HTの安定性に寄与する5つのアミノ酸残基 (A7/M13/Y34/Y43/I78) が推定され、この5残基をPAに導入したところHTと同等の安定性をもつようになった。本研究では、HTにおいてこの5残基がどのように安定性に寄与しているのかを明らかにする。〔方法と結果〕シトクロム c 成熟化を促進するタンパク質因子を共発現させることで、HTの野生体が大腸菌で大量発現することに成功した。発現させた組み換えHTとオーセンティックは、可視、CD、およびNMRの各スペクトルで同一であり、また安定性や酸化還元電位にも違いは見られなかった。つぎにPAの5残基を導入したHT変異体 (A7F/M13V/Y34F/Y43E/I78V) を作成し、熱や化学変性に対する安定性をCDで測定したところ、PA野生体と同等の安定性にまで下がっていた。さらに、HTの5残基のうちどのアミノ酸が最も安定性に寄与しているかを検討した。HTにおいて5残基はN末端 (A7/M13)、中央 (Y34/Y43)、C末端 (I78) の離れた3つの領域に存在しており、各領域単独の変異をもつHT変異体を作成し、CDで安定性を測定した。その結果、Y34F/Y43Eの変異によって一番安定性が下がり、続いてA7F/M13V、I78Vの順になった。HTへの部位特異的な変異導入実験により安定性に寄与すると推定されていた5残基の影響を実証することができた。

K.Oikawa, S.Nakamura, S.Takayama, J.Hasegawa, Y.Kobayashi, Y.Yamamoto, S.Uchiyama and Y.Sambongi : Expression of thermophilic hydrogen-oxidizing bacterium *Hydrogenobacter thermophilus* cytochrome c552 in *Escherichia coli* and its stability

3P012

高温性水素細菌 *Hydrogenophilus thermoluteolus* cytochrome c-552 の構造と安定性の関係

○市来 伸一¹、中村 昇太²、大島 淳²、小林 祐次²、長谷川 淳³、内山 進⁴、西原 宏史⁵、水田 啓子¹、三本木 至宏¹ (¹ 広大院・生物圏、² 阪大院・薬学、³ 第一製薬、⁴ 阪大院・工学、⁵ 茨城大・農)

目的〕52℃に生育する標題菌のcytochrome c-552 (PH) は、常温菌 *Pseudomonas aeruginosa* (生育温度 37℃) のcytochrome c-551 (PA) よりも安定だが、好熱菌 *Hydrogenobacter thermophilus* (同70℃) のcytochrome c-552 (HT) ほどではない。本研究では、三者の構造比較とPHへの変異導入による、タンパク質の構造と安定性の関係を明らかにする。〔方法・結果・考察〕PAとHTの詳細な立体構造比較と変異導入実験によりHTの高い安定性に寄与する5つのアミノ酸残基が同定されている。PHの一次構造においては、そのうち3つはHTと一致しているが、1つはPAと同じであり、もうひとつは三者で異なっていた。これら5残基に着目し、アミノ酸がHT型またはPA型となるようなPHの変異体を作製し、CDスペクトルで安定性を測定した。HT型の変異体の安定性は高くなったが、PA型の変異体の安定性は低下した。微生物の生育温度に対応したcytochrome c タンパク質の安定性をアミノ酸残基のレベルで明らかにすることができた。

S.Ichiki, S.Nakamura, A.Ohshima, Y.Kobayashi, J.Hasegawa, S.Uchiyama, H.Nishihara, K.Mizuta and Y.Sambongi : Stability of cytochrome c-552 from a moderate thermophilic bacterium, *Hydrogenophilus thermoluteolus*