3P025

超好熱菌由来リボヌクレアーゼ HII の構造安定性に対する活性残基の寄与

○向山 厚、古賀 雄一、高野 和文、金谷 茂則（阪大院・工）

超好熱菌 *Thermococcus kodakaraensis* 由来リボヌクレアーゼ HII（*Tk*-RNase HII）は 228 残基からなる単量体の蛋白質で、その立体構造はすでに決定されている [1]。これまでの研究から *Tk*-RNase HII は塩酸グアニジンによる変性剤変性や熱変性において可逆的に変性し、高い構造安定性を有していることが明らかになっている。そこで本研究では、*Tk*-RNase HII の安定化機構を解明することを目的として、その活性部位が構造安定性にどのような影響を及ぼしているのかを活性部位変異体を用いて調べることにした。*Tk*-RNase HII の活性部位は Asp7、Glu8、Asp105 および Asp153 の 4 つの酸性アミノ酸残基から構成されており、各アミノ酸残基を Ala および Asn/Gln に置換した変異体を作製した。構造安定性は塩酸グアニジンを用いた変性剤変性による平衡論的安定性を CD スペクトルの波長 220nm を追跡することで評価した。活性部位変異体の一つである D105A 変異体は活性をほとんど示さない [1]。その構造安定性を測定したところ、50℃での変性のギブスエネルギー変化 ($\Delta G(H_2O)$) は野生型に比べ 7.8 kJ mol⁻¹ 大きいことがわかった。これは活性残基間の負電荷の反発が D105A 変異体では解消されたためと考えられる。これまで蛋白質の機能に関与するアミノ酸残基は、構造の安定性に至適ではないことが多くの常温生物由来の蛋白質において報告されている。今回の結果は、一般に高い構造安定性を有している超好熱菌由来の蛋白質においても、その関係は成立していることを示している。[1] Muroya et al. (2001) Protein Sci. 10, 707-714.

A. Mukaiyama, Y. Koga, K. Takano and S. Kanaya : The role of active site residues in the conformational stability of ribonuclease HII from a hyperthermophile, *Thermococcus kodakaraensis*

3P027

Molten Globule(MG) 状態イヌミルクリゾチーム (CML) のハイドロキシアパタイトに対する吸着挙動

○島本 伶史、相沢 智康、安井 雅範、山本 宏子、出村 誠、新田 勝利、河野 敬一（北大・理・生物科学）

リン酸カルシウムの結晶の一つであるヒドロキシアパタイト (HAp、Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂) は、骨や歯の主要構成要素である生体物質である。優れた生体適合性と骨親和性をもち、骨充填材、人口骨、人工関節、人工歯根など医用材料として応用されている。また、HAp は液体クロマトグラフィーの担体としても、酸性タンパク質、塩基性タンパク質、核酸、糖質などの幅広い生体分子を対象に、通常的手法では分離不可能な分子の分離に利用されている。HAp とこれら分子の相互作用は、単なるイオンの相互作用のみでは決まらず、HAp の有する結晶構造と吸着分子固有の立体構造により大きな影響を受け、高い分離能を実現すると考えられているが、未知の点が多く残されている。本研究では、吸着分子の立体構造が HAp への吸着挙動に及ぼす影響を調べるために、イヌミルクリゾチーム (CMLZ) の Molten Globule(MG) 状態に着目した。二状態変性挙動を示すニワトリ卵白リゾチーム (HELZ) と異なり、CML は、天然状態と変性状態の中間体で、安定した部分変性状態である MG 状態を形成する。MG 状態は、高い割合で二次構造を保っているが三次構造が壊れており、アミノ酸側鎖は高い自由度を有している状態である。

CMLZ(MG) と HAp との相互作用を検討するため、HELZ、CMLZ の HAp クロマトグラフィーを行った。その結果、天然状態と比較し、MG 状態の CMLZ は HAp に対して強い吸着を示した。これは、MG 状態では CMLZ のアミノ酸側鎖は自由度が高く、HAp 結晶面に対し、吸着しやすい配向を取ることが可能であることに起因すると考えられる。この結果は HAp がタンパク質の立体構造を認識し、吸着挙動に重要な役割を果たしていることを直接的に証明する結果といえる。

S. Shimamoto, T. Aizawa, M. Yasui, H. Yamamoto, M. Demura, K. Nitta and K. Kawano : Adsorption behavior of Canine milk lysozyme(CML) in Molten Globule state onto Hydroxyapatite

3P026

イヌ・ミルク・リゾチームのフォールディングの解析

○中尾 正治、横 互介、桑島 邦博（東京大・院理・物理）

今までに我々が行ってきた実験で、イヌ・ミルク・リゾチームのフォールディング反応においては、二つの中間体（バーストフェーズ中間体、速度論的中間体）が観測されていた。そこでこれらの中間体の性質をより特徴づけるために、CD をプローブとして 215 nm から 240 nm まで 10 個の波長でフォールディング反応の波長依存性を測定した。結果、反応の二つの速度定数、 $k_1 = 22 \pm 2$ (s⁻¹)、 $k_2 = 0.53 \pm 0.02$ (s⁻¹) と、観測された各中間体の CD スペクトルを得ることが出来た。平衡条件における中間体の CD スペクトルとバーストフェーズ中間体の CD スペクトルを比較してみると、それらの類似性が高いことがわかった。さらに、変性状態から平衡条件での中間体に巻き戻る反応を測定すると、装置の不感時間内にシグナルの変化が完了していた。以上から平衡条件での中間体は、巻き戻りの速度過程におけるバーストフェーズ中間体と同一であることがわかった。得られた速度過程における各中間体のスペクトルから、バーストフェーズ中間体から速度論的中間体への相、および速度論的中間体から天然状態への相のそれぞれにおける差スペクトルを得ることが出来た。前者の相においては、二次構造成分の増加とチロシン残基やトリプトファン残基の側鎖の周りの環境が非対称になっていく過程であることがわかった。一方後者の相の差スペクトルを見ると、225 nm と 227.5 nm の中間を境に CD 値の符号が入れ替わるスペクトルが得られた。これは芳香族側鎖が接近することによって生じるエキシトンカップリングが起こっていることが示唆される。以上のことから、速度過程での中間体から天然状態への相は、トリプトファン残基のパッキングが起こっていると推測される。

M. Nakao, K. Maki and K. Kuwajima : The study on the folding of canine milk lysozyme

3P028

イヌミルクリゾチームの天然、モルテングロビュール状態における体積挙動

○渡部 正博、相沢 智康、出村 誠、新田 勝利（北大院・理・生物科学）

イヌミルクリゾチーム (CML) とその相同タンパク質の α -ラクトアルブミン (LA) の変性機構は N-Molten Globule(MG)-U の 3 状態モデルで表され、変性過程において安定な MG 状態を取ることが知られている。MG 状態は速度論的研究によるフォールディング反応の初期に見られる中間体と等価であることが明らかにされており、フォールディング中間体として注目されている。本研究は、CML の MG 状態をモデルとし、圧力変性によって得られる体積変化 ΔV や断熱膨張率変化 $\Delta \alpha$ などの熱力学的パラメータにより、LA などの他の球状タンパク質と比較・検討することを目的とする。CML の N および MG 状態における体積挙動を観察するために、UV スペクトルを用いて追跡した。N-MG および MG-U 転移をそれぞれ温度変性曲線として常圧から 100 MPa の範囲で求めたところ、体積変化 ΔV は共に負の値を示し、昇温につれてその値が小さくなる温度依存性が認められた。また、MG-U 転移における CML の体積挙動は、ウシ α -ラクトアルブミン (BLA) とは異なる結果を示した。CML の MG-U 転移における ΔV は、25℃において BLA では殆ど観察されなかったのとは対照的な結果を得た。CML と LA では MG 状態の挙動は異なり、熱量測定において CML の MG 状態では協同的な熱転移が観測されるが、LA においては観測されないことが報告されている。NMR 測定において、CML の MG 状態は BLA と比較した時に高い安定性を持ち、N 状態に近いことが報告されている。BLA が MG 状態において膨潤した疎水性のコアを保持するのに対して、我々の結果は CML の MG 状態は水分子が入り込むことが出来ないタイトにパッキングされた疎水性のコアを持つことを示唆しており、2 つのタンパク質の MG 状態における挙動の違いを支持している。

M. Watanabe, T. Aizawa, M. Demura, and K. Nitta : Volumetric behavior of the native and molten globule state of canine milk lysozyme