3P029

圧縮率からみた高活性DHFR変異体の構造・揺らぎ・機能相関

○月向 邦彦¹、神山 匡²、片柳 克夫¹、巖倉 正寛³ (¹ 広大院理、² 近大理工、³ 産総研)

蛋白質の立体構造の揺らぎは、機能発現のメカニズムや立体構造形成の仕組みと密接に関わっており、蛋白質物理学の重要な研究課題となっている。我々はこれまで大腸菌の3種の蛋白質 (AspAT, DHFR, CRP) の種々の変異体について、断熱圧縮率 (体積揺らぎ) と酵素機能の関係を調べ、圧縮率の大きい変異体ほど活性が高いことを見出し [1,2]。このことは、揺らぎが機能発現に有利に働いていることを示すとともに、揺らぎを指標とした蛋白質デザインの可能性を示唆している。そこで本研究では、大腸菌ジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR) の高活性変異体の断熱圧縮率とX線結晶構造解析をとおして、機能発現における揺らぎの役割を考察した。

空間配列に基づいた進化分子工学的手法により、メチオニンとシステインを種々のアミノ酸に置換した7重変異体 (M1A, M16N, M20L, M42Y, C85A, M92F, C152S) を作成した。この変異体の部分比容は 15 °C で 0.730 cm³g⁻¹、断熱圧縮率は 3.5 Mbar⁻¹ で野生型の 0.723 cm³g⁻¹、1.7 Mbar⁻¹ より大きく、揺らぎの大きい構造をとっていることがわかった。X線結晶構造から求めたキャビティーの体積はやはり変異体で増加しており、圧縮率の増加がキャビティーに起因していると考えられる。この変異体の活性は野生型の3.7倍で、これまでに報告してきた3つのフレキシブルループ中での変異体で得られた活性-圧縮率プロット [1] から予測される値に近い。こうして、揺らぎを促進する変異は酵素機能を上昇することが確認された。発表時には熱膨張係数・熱安定性の結果も含めて、本変異体の特徴を考察する。

[1] K. Gekko *et al.*, *J. Biochem.* 56, 21 (2002)

[2] K. Gekko *et al.*, *Biochemistry* 43, 3844 (2004)

K. Gekko, T. Kamiyama, K. Katayanagi and M. Iwakura : Highly flexible structure of hyper-active mutant of DHFR as revealed by compressibility

3P031

非天然状態にあるタンパク質の残基特異的HD交換反応に対する高濃度変性剤の影響—リゾチームOSS変異体と2SS変異体の場合

○木村 雅也¹、山崎 向太¹、飯村 哲史¹、野田 康夫¹、橋 秀樹²、瀬川 新一¹ (¹ 関学大・理工、² 神戸大・理)

タンパク質の折りたたみ反応の初期状態は秩序構造を完全に失ったランダムコイルに近い状態にあると考えられてきた。そのことを確かめるために我々はS-S結合を全て欠失させたリゾチームOSS変異体のHD交換反応を行い、残基毎に交換反応速度を測定した。そしてBaiのモデルペプチドのHD交換との比較から、残基毎のプロテクションファクター (PF) を求めてきた。すると、20mMのギ酸バッファー、pH3.0、4 °Cという条件でOSS変異体のいくつかの残基はPFが小さくなった。これらの残基は多くの場合、リゾチーム天然構造の二次構造のつなぎ目で、タンパク質表面に露出するループ部分に位置する親水性残基であった。このことは2SS[64-80,76-94]変異体に対してもほぼ同様の実験結果が得られており、βドメインに2本のS-S結合が存在することによる影響はほとんど見られなかった。HD交換速度がモデルペプチドより速くなる理由として、近接する電荷の影響が考えられるので、0.1MのKClを添加して実験を行ったが顕著な変化は見られなかった。そこで、変性剤である Guanidinium 塩 (GuHCl) を4.0Mまで添加して実験を行うと、2SS[64-80,76-94]変異体の場合4.0MGuHCl中でHD交換速度はモデルペプチドに対する実験値に近づいた。すなわち、20mMギ酸バッファー中で異常に速くHD交換するNH基はその原因が解消されてモデルペプチドの値に戻ったと考えられる。つまり、非天然状態にあるポリペプチド鎖は、疎水性の残基の部分ではHD交換反応という測定値で判断するとランダムコイルに近いが、むしろ親水性の残基の部分で近傍の電荷などの影響を強く受けて異常な環境におかれているように見えることが分かった。現在、高濃度GuHCl中の実験をOSS変異体に対しても行っている。

M. Kimura, K. Yamasaki, S. Iimura, Y. Noda, H. Tatibana, S. Segawa : Effects of concentrated GuHCl on residue-specific HD-exchange rates of proteins in non-native state-OSS and 2SS-variants of lysozyme

3P030

低振動数ラマン分光法によるニワトリ卵白リゾチームの立体構造に及ぼす溶媒効果

○野口 博章、谷口 吉弘、加藤 稔 (立命館大・理工)

【緒言】 赤外分光法、ラマン分光法などの振動分光法において、300 cm⁻¹以下の低振動数領域におけるスペクトルは、低分子では分子間振動、タンパク質などの高分子では collective mode という分子内振動の情報が得られる。タンパク質の collective mode にはペプチド鎖、α-helix、β-sheetの全体の振動があり、分子内の水素結合状態を特に強く反映するとされている。しかし、これまで、タンパク質の低振動数領域はラマン散乱がレイリー散乱に埋もれてしまうため、測定及び解析が非常に困難であり報告例はほとんどない。本研究では、タンパク質で低振動数領域における帰属が最も進んでいるリゾチームを用いて、pH効果、DMSO、塩酸グアニジンなど変性剤中における立体構造の変化を追跡する。【結果】 レイリー散乱の効果をなくすため R(ν) 変換を行ったリゾチームのスペクトルとその帰属を Fig. 1 に示した。DMSO、塩酸グアニジンによる変性では、リゾチームの α-helix ねじれ振動、β-sheet 変角振動はほぼ失われ、またペプチド鎖の束縛回転運動は分子内水素結合の切断により不均一になることが示唆された。一方、酸変性では collective mode への影響は少なく、リゾチームがある程度二次構造を保っていることがわかった。

Fig. 1. Different R(ν) Raman spectra of 200 mg/ml lysozyme in aqueous solution at pH 4.0.

H. Noguchi, Y. Taniguchi, M. Kato : Solvent effect on the conformation of Hen-Egg-White-Lysozyme by Low-Frequency Raman spectroscopy.

3P032

グリセロールが非天然状態にあるタンパク質に与える影響を残基毎に調べる—リゾチームOSS変異体と2SS変異体の相違

○山崎 向太¹、木村 雅也¹、野田 康夫¹、橋 秀樹²、瀬川 新一¹ (¹ 関学大・理工、² 神戸大・理)

タンパク質の折りたたみ反応を残基レベルの分解能で詳細に観測するために、種々の構造秩序度を持つリゾチーム変異体を作製し、その構造をNMR分光法によって研究してきた。天然状態では4本存在するS-S結合を欠損させることにより、天然秩序構造を徐々に失わせた。最近天然秩序構造をほぼ完全に失ったリゾチーム変異体の研究に重点をうつしてきた。その様な非天然状態にあるポリペプチド鎖の残留部分構造を、HD交換反応を残基特異的に観測し交換反応のプロテクション因子 (PF) を調べるという方法によって研究してきた。ここで非天然状態のHD交換の反応速度は速すぎるため、任意の反応時間で一度凍結乾燥することで、反応を止めた。そして易動性プロトンのない溶媒をNMR測定溶媒として用いることで観測を可能とした。この方法を用いてすでに昨年、2SS変異体の一種である2SS [64-80,76-94] 変異体に対するグリセロールの影響を報告してきたが、今回、グリセロールがHD交換反応のPFを顕著に増大する部分がαとβドメインの接合部 (残基55-60の部分とB-, C-, 3₁₀-ヘリックスの一部でIle55、Leu56部分に近傍する部位)であることを明瞭に突き止めた。この結果は、2SS変異体に残る2本のS-S結合には関係なく、アミノ酸配列にのみ依存する現象ではないかと予測して、S-S結合をすべて欠損させたOSS変異体に対して同様の実験を行った。しかしながら、OSS変異体においてはグリセロール添加の影響が非常に小さいことが判明した。この事実は、非天然状態にあるタンパク質においても、βドメインに存在する2本のS-S結合がαドメインのB-, C-, ヘリックスのプロテクション因子に大きな影響を及ぼしていることを示唆している。

K. Yamasaki, M. Kimura, Y. Noda, H. Tachibana and S. Segawa : Residue-specific study on effects of glycerol on proteins in non-native states -Differences between OSS and 2SS-variants of lysozyme