3P033

NMR検出HD交換法によるリゾチーム2 SS変異体 [6-127, 64-80] の構造解析

土井 学¹、山崎 向太²、瀬川 新一²、〇橋 秀樹¹ (¹神戸大・理、²関西学院大・理工)

ニワトリリゾチームのジスルフィド結合に共役した立体構造形成における個々のSS結合の役割は以下のようにわかりつつある。SS結合1本を欠損する変異体の結果からすると、C30-C115とC64-C80はそれぞれ、D/B-ヘリックス側面ならびにループ/ベータ鎖の形成に特異的に寄与する。SS結合が1本だけ架かる変異体はアンフォールド状態に近いが、SS結合形成と共役する分子内サブ構造はC6-C127で一番大きく、非常に不安定なサブ構造はC64-C80、C30-C115で比較的に安定である。C6-C127とC30-C115の2つを持たせたアルファドメインは独立にフォールドでき、その中心核に基底付着するベータドメイン中の3つの部位とC-ヘリックスを通じてドメインを超えた構造形成が誘起される。ここではベータドメイン内の局所構造形成への関与が期待されるC64-C80と大局的な構造安定化作用が期待されるC6-C127の2本のSS結合を持つ変異体の構造を調べた。この変異体の1H-15N-HSQCスペクトルはランダムコイルの特徴を示すが、溶媒にグリセロールを添加すると高次構造量が増加する。30%グリセロール、pH 3.0、4度CのD2O溶液中でHD交換反応を行い、残基ごとの交換反応プロテクションファクターを、DMSO 95% / D2O 5%中で測定されるHSQCスペクトル中の約100個の帰属ピーク体積のHD交換反応時間に対する減少より求めた。その結果、Baiによって報告されているモデルペプチドでの交換反応時間値に比べると、残基55-56、A-ヘリックス、B-ヘリックスの中央部、C-ヘリックスのN端に近い領域がHD交換反応からプロテクトされることがわかった。これらの結果を、SS結合をすべて欠損させた変異体などの実験結果と比較して考察する。

G.Doi, K.Yamazaki, S.Segawa and H.Tachibana: Structural analysis of lysozyme 2SS variant [6-127, 64-80] by means of NMR-detected amide hydrogen exchange

3P035

ヒトリゾチームの中性子結晶構造解析により観測された局在水素及び水和水による部位特異的ペプチド結合の歪み

〇千葉 かおり^{1,2}、松井 拓郎³、茶竹 俊行⁴、大原 高志²、Ostermann Andreas⁵、田中 伊知朗⁶、油谷 克英⁷、新村 信雄⁶ (¹産総研、生物情報セ、²原研、中性子利用セ、³松下電産(株)、先端技研、⁴千葉科大・薬、⁵ミュンヘン工大、⁶茨城大・工、⁷理研、播磨)

中性子結晶構造解析のひとつの大きな特徴は、室温でも水素及び重水素の原子核を炭素や窒素と同程度に観測することができる点である。我々は蛋白質と溶媒の界面の水分子や、これまでX線とNMRなどから予測されてこなかった水素に着目してヒトリゾチームの中性子結晶構造解析を行った。Glu35のオミットマップを、X線の電子密度図と比較したところ、主鎖のカルボニル酸素の近傍で中性子のマップが溶媒領域に大きく突き出しているのが観測された。この中性子の付加的なピークは溶媒の水由来の水素の局在によるものと思われたが、分解能1.8 Åの中性子結晶構造解析データだけではそれ以上の議論はできなかった。そこで我々は、このGlu35の主鎖のカルボニル酸素が、隣の残基(Ser36)の主鎖のアミド窒素と共鳴構造をとってペプチド結合を形成している点に注目し、この窒素の電子状態を最も敏感に反映すると考えられた¹⁵N NMRのケミカルシフト値との対応を調べた。その結果、ペプチド結合が平面構造を形成すると低磁場シフトする傾向のある¹⁵Nのケミカルシフトが、この部位で高磁場側に観測されることがわかった。主鎖カルボニル酸素近傍に水素原子を向けて水分子がアサインされたTyr54の隣(Gly55)のアミド窒素でも、同様な傾向が観測された。このことから、ペプチド結合を形成する電子の共鳴構造が局所的に崩れている可能性が示唆されたので、実際に原田らの1.15 Å分解能のX線の構造(1JSF)を用いてペプチド結合の歪み角 ω を計算したところ、上記の2箇所を含む6箇所のペプチド結合で10°以上(最高で18°)の部位特異的な歪みが観測された。

K.Chiba, T.Matsui, T.Chatake, T.Ohara, A.Ostermann, I.Tanaka, K.Yutani, N.Niimura: Site-specific twist of peptide bond in human lysozyme by localized hydrogen or hydration water observed by neutron crystallography

3P034

質量分析計によるリゾチーム3SS変異体のSS結合再生過程の研究—再生過程に対するグリセロールの影響

〇岡本 邦彦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S-S結合再生反応のプロセスから追跡する手法は、質量分析計の進歩に伴って、再生途中の非天然型S-S結合を検出する手間と精度が大きく向上してきた。4本のS-S結合を持つ天然リゾチームのS-S結合再生過程も詳細に研究されてきているが、我々はC30-C115結合をAla置換によって欠損させた3SS変異体[C30A/C115A]を用いることで、再生反応途中に現れる非天然型S-S結合再生中間体の数を減少させて、反応経路を単純化させる工夫をした。この3SS変異体は、天然タンパク質とほぼ同一の立体構造を回復するので、天然秩序構造を再生する過程の研究にもなっている。最近我々は、秩序構造を完全に失ったリゾチーム2SS変異体にグリセロールを加えると、 α ドメインと β ドメインの連結部で秩序構造が大きく回復するという実験結果を得た。折りたたみ反応に対するグリセロールの役割を明確にすることが目的の一つである。3SS変異体の再生生成物をトリプシンで加水分解し、Cys64、Cys76、Cys80、Cys94が存在するペプチド断片を逆相HPLCカラムで精製し、これをpH2.0においてペプシンで加水分解した混合物を質量分析計(Bruker ultraflex)に直接導入した。その結果、アミノ酸残基I78、L83、L84、I88、A90のC端側ペプチド結合が加水分解されたペプチド断片が検出された。この断片の有無を検出すると、C64-C80、C76-C94の天然型S-S結合のみならず、非天然型のS-S結合の有無も直接決定することが出来る。現在、グリセロールの存在下での再生生成物と、非存在下の結果を比較検討している。

K. Okamoto, Y. Noda, H. Tachibana, S. Segawa: Mass spectrometric study of regeneration processes of disulfide bridges in 3SS-variants of lysozyme - Effects of glycerol

3P036

プロリン置換によるウマ β ラクトグロブリンの非天然状態の構造解析

〇中川 香奈子、徳島 章仁、山田 好輝、池口 雅道(創価大・工・生物工)

ウマ β ラクトグロブリン(ELG)は、天然状態では8本の β ストランドからなる β バレル構造をとっているが、酸変性(A)状態では天然状態より α ヘリックス含量が増加したモルテングロビュール状態となり、低温変性(C)状態では、分子の大きさは変性状態のそれに近くなり、A状態よりもさらに α ヘリックス含量が増加した構造をとる。このA状態の構造は、フォールディング反応の初期に観測される中間体と同じものである事が明らかとされている。本研究では、Pro置換変異体を用いて、ELGのA状態とC状態に存在する二次構造と、その形成領域を調べる事を目的とした。Pro置換部位が、野生型において、何らかの二次構造を持っていたならば、野生型とプロリン置換変異体との間で、CDスペクトルの強度や形状に変化が見られると考えられる。変異体は現在までに19種類作製し、それぞれの222nmにおけるCD強度を比較した。その結果、天然構造でF、G、Hストランドを形成している領域と、 α ヘリックスを形成している領域にPro置換を行った場合に、CD強度の大きな減少が見られた。そして、その変化はC状態の方が顕著であった。また、それ以外の領域にPro置換を行った場合には、CD強度の顕著な変化は認められなかった。よって、F、G、Hストランドの領域と、C末端に存在する α ヘリックスの領域は、A状態においても、C状態においても、何らかの二次構造を保持している事が示された。これは以前に水素交換実験から得られた結果と矛盾しないものであった。また、CDスペクトルの形状を詳細に比較したところ、F、Gストランドの領域は、A状態では β シート、C状態では α ヘリックスを形成している可能性が示唆された。

K.Nakagawa, A.Tokushima, Y.Yamada, M.Ikeguchi: Structural analysis of equine beta lactoglobulin in the non-native states using the site-directed proline substitutions