3P045

天然状態で中間的構造を形成する腸管出血性大腸菌 O157 タイプ III 分泌系蛋白質 EspB

○浜田 大三¹、池上 貴久²、柳原 格¹ (¹大阪府立母子センター・免疫部門、²阪大・蛋白研・プロテオミクス)

[序] EspB 蛋白質は腸管出血性大腸菌の O157 タイプ III 分泌系に属し、EspA フィラメントの末端に EspD とともに結合すると言われている。また、EspB は宿主細胞膜下の α カテニンと相互作用し、これらにより宿主細胞と大腸菌間にタイプ III 分泌機構のニードルが形成され、様々な病原因子が宿主細胞内に注入されると言われている。また、最近では EspB の α 1-アンチトリプシンとの結合が示されており、同蛋白質が多様な分子認識特性を持つことが明らかになってきた。

本研究では、円偏光二色性 (CD) スペクトル、ANS 蛍光、異核種 NMR を用い溶液中での EspB の構造状態について解析を行った。

[結果] 20℃、pH 7.0 において、EspB は α ヘリックス構造に特徴的な遠紫外部の CD スペクトルを示した。また pH 2.0 でもその二次構造含量に変化はなかった。ANS 蛍光を測定したところ、酸性 pH で蛍光強度の増加が見られ、疎水性クラスターの溶媒への露出が示唆された。興味深いことに、pH 7.0、2.0 では、尿素変性状態に似た分離の悪い ¹H-¹⁵N HSQC スペクトルが観測された。遠紫外部の CD により EspB の尿素変性を調べたところ、pH の減少に伴い蛋白質の安定性が低くなるが、変性の協同性に変化がないことがわかった。以上より、pH 2.0 で EspB は典型的なモルテン・グロビュール状態にあるが、pH 7.0 ではオーダード・モルテン・グロビュール様の構造状態にあることが示唆された。

[考察] EspB が天然条件下で中間的な構造状態にある蛋白質であることが示された。このような特性を持つ病原因子の例は、あまり知られていない。腸管出血性大腸菌は様々な生物種に対し感染性を持つ。EspB のフレキシブルな高次構造特性は、種々の生物種由来の様々なターゲット分子と結合するのに有効であると考えられる。

D. Hamada, T. Ikegami and I. Yanagihara : EspB from enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157 is a natively partially folded protein

3P047

超好熱菌由来蛋白質の異常な環境にあるアミノ酸残基のフォールディングと安定性に果たす役割

○飯村 哲史¹、小笠原 京子²、野田 康夫¹、瀬川 新一¹、油谷 克英³ (¹関学大・理工、²阪大・蛋白研、³理研播磨研究所)

超好熱菌 *Pyrococcus furiosus* 由来の pyrrolidone carboxyl peptidase (208 残基、分子量 22.8k、PCP と略す) は、酸性条件下で変性と復元の緩和速度が異常に遅い。

X 線構造解析により得られた PCP の立体構造には 159 番のシス型の Pro 残基と疎水性コア内の 192 番の荷電アミノ酸 Glu 残基の 2 つの特異な残基が存在する。この異常な環境にあるアミノ酸残基のフォールディングと安定性に果たす役割を明らかにするために、この両部位について、それぞれ 1 残基置換変異体を作製し、フォールディング速度と安定性への寄与を 222 nm の CD スペクトルの変化で観測した。

159 番のシス型の Pro 残基を Ala に置換した変異体 P159A の緩和速度は野生型のそれに比べ速くなることはなく、むしろ遅くなった。天然構造にシス型で存在する Pro 残基は多くの場合、遅いフォールディング反応の要因となりうるが、P159 は PCP の遅いフォールディング過程には寄与していなかった。これは、P159 が二次構造中ではなくヘリックスとシートの間のループ領域にあることが影響している可能性がある。

一方、疎水性コア内の 192 番の Glu 残基についても、Ala に置換した変異体 E192A を作製したが、その緩和速度が野生型より速くなることはなかった。また、pH 7 における安定性に関しても大きな違いは見られなかった。疎水性コア内の荷電アミノ酸残基はフォールディングプロセスと天然構造の安定化にとって、不利に働くと考えられるが、Ala への置換が安定性を向上させなかったことは、E192 の側鎖カルボキシル基がイオン化せずに水素結合を形成し、不安定化因子ではなく安定化因子として働いている可能性を示している。

S. Iimura, K. Ogasahara, Y. Noda, S. Segawa, K. Yutani : The role of amino acid residues existing in unusual environments of hyperthermophile protein in folding and stability.

3P046

顆粒球コロニー形成刺激因子 (G-CSF) の熱変性過程への塩濃度の影響

○山崎 勝由^{1,2}、井浦 貴文¹、石川 リカ¹、尾崎 幸洋² (¹キリンビール (株)・医薬カンパニー・生産技術研究所、²関西学院大・理工・化学)

顆粒球コロニー形成刺激因子 (G-CSF) は好中球の前駆細胞に作用し、好中球の産生を促進するサイトカインである。大腸菌で産生させた遺伝子組換えヒト G-CSF (rhG-CSF) は 175 アミノ酸残基からなる分子量約 19000 の蛋白質である。X 線結晶構造解析によりその立体構造は four-helix bundle motif をとることが明らかとなっている。また、rhG-CSF は疎水性の高い蛋白質で、酸性で安定であることが知られている。これまでの我々の検討では、rhG-CSF は pH が低い程、変性温度、及び変性の可逆性が低くなり、アグリゲーションの生成温度が高くなることがわかっている。今回、我々は赤外分光法 (IR)、及び円偏光二色性 (CD) を用いて rhG-CSF の熱変性過程への塩濃度 (NaCl) の影響を検討した。IR 測定では、rhG-CSF を重水素置換後、濃度 1.0 % (w/w) に調整し、透過法にて測定を行った。測定には NEXUS670 赤外分光計を用いて、温度は 25~80℃、pH は 2~4 の範囲で測定を行った。また、CD 測定には Jasco J-820 型円偏光二色性分散計を用いて、IR 同様の温度範囲、及び pH で測定を行った。その結果、rhG-CSF はいずれの pH でも塩濃度が高くなる程、変性温度、アグリゲーションの生成温度、及び変性の可逆性の低下が認められた。しかし、その低下の程度は pH によって異なり、50 mM NaCl 存在下では非存在下と比較して、アグリゲーションの生成温度は pH 2.5 では 12℃、pH 4.0 では 6℃低下し、pH 2.5 の方がより低下傾向を示した。本発表ではこれらの結果をもとに rhG-CSF の熱変性過程への塩濃度の影響について詳細に検討する。

K. Yamazaki, T. Iwura, R. Ishikawa, Y. Ozaki : Effect of the Ionic Strength on the Thermal Unfolding Process of Granulocyte-Colony Stimulating Factor (G-CSF)

3P048

コンカテマー GroES の熱力学的安定性と力学的安定性

○坂根 勲^{1,2}、元島 史尋³、本郷 邦広^{1,2}、溝端 知宏^{1,2}、河田 康志^{1,2} (¹鳥取大・工・生物、²鳥取大院・医・機能再生、³東工大・資源研)

大腸菌由来のコシャペロニン GroES は、97 残基から成るサブユニットが環状に 7 個会合したホモオリゴマータンパク質である。塩酸グアニジンによる変性平衡実験から、GroES の変性は 3 状態モデルで記述できることが解かっている。すなわち、変性剤濃度を上げていくにつれて、まず 7 量体が単量体へと解離し、続いて単量体が変性する。GroES の全変性自由エネルギーに占める解離エネルギーの割合は 70% 以上であり、サブユニット間の相互作用がこのタンパク質の安定性にとって重要である。

コンカテマー GroES (ESC7) は、GroES の隣り合うサブユニットの C 末端と N 末端を、遺伝子工学的に結合させたものである。塩酸グアニジンによる変性平衡実験から、ESC7 は 2 状態転移を示し、GroES と比べて高濃度の変性剤存在下でも天然状態を維持していた。しかし、転移曲線から求めた全変性自由エネルギーは、GroES の全変性自由エネルギーの半分以下であり、エネルギー的には不安定化していることが解かった。変性速度の解析から、この不安定化は、分子長が 7 倍になったことによる変性状態のコンフォメーション空間の増大に起因するのではないかと考えられる。

この構造安定性の問題を別の視点から解明するために、ESC7 の力学的安定性の測定を試みた。ESC7 を機械的に操作するために作製した変異体を AFM のプローブと基板との間に固定し、力学的に伸長させることにより、力学的変性実験を行った。その結果、変性過程の力-伸長曲線には、ノコギリ歯状のパターンが観測された。解析の結果、各ピークは、GroES のサブユニット相当部位の変性に対応することが解かった。本発表では、力学的変性による力-伸長曲線の解析結果と変性剤による熱力学的安定性について議論する予定である。

I. Sakane, M. Fumihito, K. Hongo, T. Mizobata, Y. Kawata : Thermodynamic and mechanical stability of concatenated GroES