3P049

1 分子計測から見たヌクレオチドの結合による GroEL の揺らぎ変化

○宮崎 拓也¹、奥村 泰章¹、河田 康志²、佐々木 裕次¹
(¹SPRING-8/JASRI JST/CREST (Sasaki Team)、²鳥取大・工・生物応用)

シャペロニン GroEL は ATP 加水分解活性を伴い、蛋白質の構造形成に深く関与していることが知られている。ところが、ヌクレオチドの結合・加水分解による影響に関しては不明な点も多く残されている。中でも ATP の結合と GroEL の構造変化の関係については現在でも様々な提唱がされている。今回我々はヌクレオチドの結合による GroEL に対する影響を観測した。我々が行った測定は X 線を用いた 1 分子計測 (Diffracted X-ray Tracking: DXT) である。DXT は金のナノ結晶を修飾した GroEL に X 線を照射し、金によって回折された X 線をモニターすることでこれまで観測できなかった GroEL 1 分子のピコメートル精度の構造変化を可観測可能な手法である。これにより、これまで観測できなかった GroEL の微少な揺らぎを観測することができる。本実験では変異型 GroEL A133C を用いて、Cys 部位にナノ結晶を修飾することによって、ヌクレオチド結合部位近傍の揺らぎを観測している。我々は、ヌクレオチド存在下と非存在下でナノ結晶から得られる回折点の動きに注目した。その結果、ヌクレオチド非存在下では回折点が一方向に移動するのに対して、ヌクレオチドが存在した場合、回折点は振幅を持った軌跡を示した。これは、ヌクレオチドが結合していない時、GroEL 分子には分子内に空間的余裕がありブラウン運動による大きな揺らぎを生じている。一方、ヌクレオチドが結合すると分子内の構造安定性が増し、ブラウン運動が抑制され、より小さい振幅をもった運動に変わるのではないかと考えられる。また GroEL の ATP 結合状態と ADP 結合状態でも揺らぎに違いが見られることから、我々はこの振幅運動はシャペロニン ATP 加水分解メカニズムと関係があるのではないかと考えている。

T. Miyazaki, Y. Okumura, Y. Kawata, Y. C. Sasaki : Influence of GroEL fluctuations by binding nucleotides using single molecule detection system

3P051

ミトコンドリア蛋白質の膜透過反応における局所・全体構造安定性と膜透過速度の関連性の解析

○佐藤 健大¹、江崎 雅俊¹、Julio M. Fernandez²、遠藤 斗志也¹
(¹ 名大院理・物質理学・生物化学、² シカゴ大学)

ミトコンドリアマトリクスに局在するタンパク質のほとんどは細胞質でミトコンドリア局在化シグナルを付加されて合成される。これら局在化シグナルを持った前駆体タンパク質は、ミトコンドリア内へ輸送されるとき、unfolding した状態でミトコンドリア二重膜に存在する膜透過装置の孔を透過し、マトリクスへ局在化する。前駆体タンパク質の局在化シグナルが長い場合には、マトリクスに存在する mtHsp70 によって引張られ、前駆体タンパク質の unfolding が促進されるが、局在化シグナルが短い場合には、マトリクスまで局在化シグナルが届かないため自発的な unfolding が必要だと考えられている。我々は力学的安定性と熱力学的安定性が詳細に調べられている titin の変異体を用い、その N 末端もしくは C 末端に、長い局在化シグナルと短い局在化シグナルを付加した融合タンパク質を作製した。そして、単離ミトコンドリアへこれらの融合タンパク質の取り込み反応を行い、膜透過速度と local/global 構造の関連性について解析した。その結果、膜透過速度に対するアミノ酸変異の影響が、N 末端にシグナル配列を付加した場合と C 末端へ付加した場合とは異なっていた。さらに、シグナル近傍のアミノ酸変異が膜透過速度に影響を与えることが局在化シグナルの長さに関わらず示された。発表では、膜透過反応時における前駆体タンパク質の unfolding のメカニズムについて議論する。

T. Satoh, M. Esaki, Julio M. Fernandez and T. Endo : Relationship between local/global structures and import rates of mitochondrial precursor proteins

3P050

大腸菌で生産される *Pyrobaculum islandicum* 由来のグルタミン酸脱水素酵素の活性化機構

○西川 良美¹、郷田 秀一郎¹、米田 一成¹、櫻庭 春彦¹、津下 英明²、勝沼 信彦²、柊 弓絃³、大島 敏久¹ (¹ 徳島大工・生物工、² 徳島文理大・健康科学研、³ 関西医大・物理)

大腸菌で生産される *Pyrobaculum islandicum* 由来グルタミン酸脱水素酵素 (GDH, 47 kDa x 6 量体) は、活性を殆ど示さない。この不活性型 GDH は 90 °C (15 分間) の熱処理や 5M 尿素処理 (37 °C、5 時間) によって、*P. islandicum* から得られた天然酵素とほぼ同じ比活性をもつ活性型酵素へ変換された。この変換過程を X 線小角散乱法 (SAXS) で分析した結果、不活性型分子の回転半径 ($R_g, z = 54.6 \text{ \AA}$)、及び最大長 ($D_{\max} = 145 \text{ \AA}$) は熱又は尿素処理により、約 47 Å 及び 120~124 Å に大きく減少した。不活性型分子の Kratky plot は、四次構造を持つタンパク質に見られる典型的な二つのピークを示し、活性化によりピーク位置は高角側にシフトした。一方、分子質量に比例する $J(0)/C$ の値に殆ど変化はなく、熱・尿素活性化による分子質量の変化はなかった。また、疎水性領域探索試薬 ANS の蛍光スペクトル分析から、不活性型分子の表面に疎水性残基が露出しており、これが活性化に伴い内部に移行することが分かった。これらの結果は、GDH の活性化には、サブユニット同士のパッキングの強化を伴う四次構造変化が重要であることを強く示唆している。熱活性化過程の経時的構造変化を SAXS で分析すると、不活性型分子の R_g, z 値は指数関数の一次式によくフィットして減少し、熱活性化による構造変化が二状態変化であることが示唆された。 $p(r)$ 関数のピークの位置は経時的にシフトし、熱活性化の過程で構造の劇的な変化があることが分かった。また、熱による酵素活性の上昇は構造変化に遅れて起こることから、酵素分子の構造変化と活性化には、時間的なずれがあることが分かった。このような熱活性化過程における酵素分子の構造変化と活性発現を、SAXS によって経時的に解析したのは、本研究が最初の例である。

Y. Nishikawa, S. Goda, K. Yoneda, H. Sakuraba, H. Tsuge, N. Katunuma, Y. Hiragi, T. Ohshima : Activation mechanisms of hyperthermophilic *Pyrobaculum islandicum* glutamate dehydrogenase produced in recombinant *E. coli*

3P052

Photoactive yellow protein における配列情報の理解の試み

○白井 久美子、山崎 洋一、上久保 裕生、今元 泰、片岡 幹雄 (奈良先端大・物質)

我々は、アミノ酸が担う構造情報を減らした単純化蛋白質を作製することにより、アミノ酸配列と構造、機能との対応関係の理解を目指している。これまでに、性質の類似したアミノ酸が同じ構造情報を持つために生じる過剰性を減らすことを基本方針とした Photoactive yellow protein (PYP) の単純化を行ったが、全長に渡る単純化では野生型と異なる二次構造を形成し、発色団再構成能を損失してしまった。また、先の年会では、部分的単純化を行い、各領域が担う配列情報や領域間の相互作用の有無について議論し、部分的単純化が配列と構造、機能との関係理解に有用であることを報告した。このとき、疎水性残基と相同蛋白質間で保存されている残基は置換しておらず、これらの残基が単純化を許容しうるかは検討していなかった。そこで、本研究では、全ての残基を単純化した sPYP0 の部分的単純化により最大限に単純化した配列を見出し、PYP における配列情報の完全理解を目的とした。部分的単純化の手法として DNA shuffling 法を採用するが、得られた膨大なライブラリから呈色する PYP を効率良くスクリーニングするのに、発色団を再構成する方法は、手間と時間を要し適当でない。そのため、発色団をチロシンから生合成する酵素 Tyrosine ammonia lyase (TAL) と発色団を補酵素 A に結合する酵素 *p*-hydroxycinnamic acid ligase (pCL) を PYP と共発現させる系を構築し、ホロ体を発現した大腸菌が黄色を呈することを確認した。現在、この系を用いて野生型と sPYP0 間での DNA shuffling を行っており、本年会ではその進捗状況について報告する予定である。

K. Shirai, Y. Yamazaki, H. Kamikubo, Y. Imamoto and M. Kataoka : An attempt at understanding sequence information in photoactive yellow protein