3P053

大腸菌熱ショック蛋白質 ClpB のシャペロン機能における N ドメインと凝集蛋白質の相互作用の役割

○田中 直毅、谷 泰史、服部 洋之、多田 朋子、功刀 滋 (京工繊・繊維)

大腸菌熱ショック蛋白質 ClpB は凝集蛋白質と結合し、DnaK と協同して天然構造へと再生する。ClpB の立体構造解析により、二つの ATPase ドメイン間の中間ドメインが凝集体を認識することが示唆されている。本研究では ClpB の N ドメインに関して、図に示す断片化により機能を調べた。

Malate Dehydrogenase(MDH) の構造形成は ClpB が存在していると収率が抑制される。一方、ClpB ΔN は MDH の構造形成に影響を及ぼさなかった。このことから N ドメインは MDH 中間体と強く結合することがわかった。一方、N ドメイン断片 (ClpBN) の共存下では MDH の構造形成収率は逆に増幅した。構造形成速度の解析により、ClpBN と MDH の解離定数は $45 \mu\text{M}$ 程度と算出された。以上のことから N ドメインは比較的小さい蛋白質凝集体と結合し、その結合の強さはオリゴマー構造によって増幅されていることが示唆された。さらに、N ドメインにおいて基質認識に関与するアミノ酸を同定するために、分子表面に存在するアミノ酸の置換を行なった結果についても発表する。

[文献]

N. Tanaka et al. Protein Science (2004) in press.

N.Tanaka, Y.Tani, H.Hattori, T.Tada and S.Kunugi : Interaction of the N-terminal domain of Escherichia coli heat shock protein ClpB and protein aggregates during chaperone activity

3P054

Stretched-exponential による アポコンカナバリン A の加熱凝集形成の解析

○工藤 基徳¹、白木 賢太郎²、高木 昌宏¹ (¹北陸先端大・材料、²筑波大・物理工)

【目的】加熱によって多くのタンパク質は凝集体を形成する。これまでの報告では、加熱による凝集体形成の経時変化を追跡すると、single exponential にフィッティングできる例が多い。アポコンカナバリン A (aConA) で加熱凝集を形成させた場合には、single exponential にフィッティングできなかった。本研究では、stretched-exponential ($T = T_{lim} - DT \exp(-[k \cdot t]^g)$) を用いて、アポコンカナバリン A (aConA) による加熱凝集体形成を解析した。【方法】タンパク質濃度と溶媒の温度を変化させて円二色性分散計 (CD) や分光光度計を用い凝集体形成に伴う構造変化と濁度変化を観察した。【結果】CD スペクトルを測定すると、ネイティブ構造は 223nm に極小を持つが、加熱後には 215nm に極小がシフトすることが分かった。215nm で凝集体形成に伴う構造変化の経時変化を測定し stretched-exponential にフィッティングさせた。各パラメータである k や g の値はタンパク質濃度に依存しなかった。次に、凝集体形成に伴う濁度の変化を観察した。どの温度でも T_{lim} の値はタンパク質濃度に比例していた。g の値はタンパク質濃度や温度が高くなるに従い低くなった。これは、凝集同士がさらに会合し大きな凝集を形成したことが考えられた。k の値はタンパク質濃度の 0.5~2 乗に比例していた。特に 0.5 乗の場合には、構造変化と会合のどちらも凝集体形成の律速段階になっていることが考えられた。

M. Kudou, K. Shiraki, M. Takagi : Stretched-exponential analysis of heat-induced aggregation of apo-concanavalin A

3P055

天然ポリアミンによるリゾチームの加熱凝集抑制

○岡野定 雅弘¹、白木 賢太郎²、高木 昌宏¹ (¹先端大院・材料科学、²筑波大・物理工)

【背景】タンパク質は熱によって凝集し失活しやすい。これまでに、われわれのグループは、ポリアミン (ブトレッシンとスベルミジン、スベルミン) が熱による凝集と失活を効果的に抑制することを示した。本研究では、凝集と失活を抑制するポリアミンの構造と作用機構について考察を深めるため、3 種類のジアミンと 3 種類のモノアミン、3 種類のジオール、T 字型分岐ポリアミン、従来のポリアミンに加えてノルスベルミジンの効果を調べた。

【方法】ポリアミンを 0~100 mM 添加したニトリリゾチームを pH 6.5 で 98 °C に加熱したのち、残存活性と凝集量を算出した。

【結果と考察】ジアミンはリゾチームの加熱失活や凝集を抑制したが、モノアミンとジオールは抑制しなかった。ジアミンは 1,3-ジアミノプロパン、ブトレッシン、1,5-ジアミノペンタンの順で加熱失活と凝集を抑制した。アレニウスプロットによると、アルキル鎖が短くなるにつれ失活への活性自由エネルギーが上昇するのはエンタルピーによる寄与が大きいことがわかった。T 字型分岐ポリアミンであるトリス 3-アミノプロピルアミンは、スベルミンより凝集を抑制する効果が高かった。以上の結果、凝集抑制剤の化学構造は次の 3 点に要約できる。(1) アミノ基は抑制に効果的に働く。(2) ジアミンはアミノ基間のアルキル鎖が短いほど効果が高い。(3) T 字型分岐ポリアミンは、高濃度のタンパク質存在下でスベルミンよりも凝集を抑制する。

M. Okanojo, K. Shiraki, M. Takagi. : Prevention of thermal aggregation of lysozyme using naturally occurring polyamines

3P056

タウ蛋白リピードドメインの繊維性凝集における陰イオンの寄与

○今野 卓¹、老木 成稔¹、長谷川 一浩²、内木 宏延² (¹福井大・医・分子生理、²福井大・医・分子病理)

タウ蛋白質は、Alzheimer 病患者の脳神経細胞内において繊維性凝集体として沈着する。タウの凝集体形成部位がそのリピードドメインであることは、よく知られた事実である。このアミロイドタイプの凝集現象は、ヘパリンなどのポリアニオンや陰イオン性ミセルなどの存在下で、試験管内においても再現することができる。しかし、これら clustered anion が凝集を促進するメカニズムの詳細は、未だ明らかではない。また、他方、Alzheimer 病患者の脳内におけるタウ凝集体の形態が amorphous から fibrous へ、病態とともに進行することが知られているが、その背景にあるメカニズムも明らかではない。我々は、ポリアニオンや陰イオン性ミセルを用いずにタウ・リピードドメインの凝集をコントロールする溶媒系を確立し、それを用いて、タウの凝集性とその凝集形態を支配する因子を探索した。その結果、溶媒の陰イオン性環境のもつ真の役割の一端を抽出できたと考えている。それについて報告する。

T. Konno, S. Oiki, K. Hasegawa and H. Naiki : Anionic contribution for fibrous aggregation of tau repeat domain