1P029

超好熱菌由来シャペロニンとブレフォルディンとのアフィニティーが及ぼす基質受け渡し効率への影響

○村瀬 陽介^{1,2}、座古 保²、飯塚 怜¹、井出 直希¹、吉田 尊雄³、前田 瑞夫²、養王田 正文¹ (¹農工大・院工・生命工、²理研・バイオ工学、³海洋研究開発機構)

【緒言】シャペロニン (CPN) は ATP 依存的に変性タンパク質をリフォールディングする代表的なシャペロンである。一方ブレフォルディン (PFD) は変性タンパク質を捕捉し、CPN へ受け渡すと考えられているが、詳細な機構は未解明である。本研究では超好熱性古細菌 *Thermococcus* sp. strain KS-1 由来の CPN ホモオリゴマー 2 種 (α CPN, β CPN) を材料とし、超好熱性古細菌 *Pyrococcus horikoshii* OT3 由来 PFD (PhPFD) に対する α CPN の親和性が β CPN より著しく小さいことを利用して CPN-PFD 間相互作用の解析を行った。【結果・考察】 β CPN の Helical protrusion 領域を欠損させると PhPFD との親和性が大きく減少した。 α CPN, β CPN ではこの領域のアミノ酸残基の電荷が 2 箇所逆転していることから α CPN の該当箇所を β CPN 型に置換した変異体 α K250E/K256E を構築し、PhPFD との相互作用を解析した。同変異体は PhPFD との親和性が β CPN と同程度まで増大したことから、この 2 残基周辺が PFD-CPN 相互作用部位であることが示唆された。また PFD に捕捉された酸変性 GFP が CPN に受け渡されてリフォールディングし、蛍光回復が始まるまでにラグが観察された。野生型と変異体で ATPase サイクルに変化がなかったことからこのラグは受け渡しを反映していると考えられる。速度論解析の結果、変異体の受け渡しによるラグは野生型の約 17% であった。このことから PhPFD と CPN の親和性と基質受け渡しの間には相関があることが示唆された。現在、他の基質の検討や FRET による基質受け渡しの評価系の構築を行っている。

Y.Murase, T.Zako, R.Iizuka, N.Ide, T.Yoshida, M.Maeda, M.Yohda : Analyses of interaction of chaperonin with prefoldin and delivery of substrate protein from prefoldin to chaperonin

1P031

プロリン異性化酵素ヒトFKBP12の機能発現の物理化学的解析

○伊倉 貞吉、伊藤 暢聡 (東京医歯大院・疾患生命)

タンパク質を構成するアミノ酸残基の中でプロリン残基は、その直前の残基とのペプチド結合 (X-Pro) に関して、トランスもシスも容易に取りうる点で特異な残基である。近年、この X-Pro の構造異性化が、細胞内のシグナル伝達系におけるスイッチとして、あるいは、ファージの細菌への感染時におけるタイマーとして活用されている事などが明らかになってきた。また、スイッチとしての機能には、異性化酵素 (PPIase) による制御機構が存在することも明らかになった。X-Pro の構造異性化や PPIase の機能の研究は、これまでは主にタンパク質のフォールディングや免疫応答との関連から行われてきたが、今後は多方面への展開が予想される。ところが、PPIase の機能に関しては、「そもそも、なぜ X-Pro の構造異性化機能をもつのか?」という基本問題に対してさえ明確に答えられないのが現状である。そこで、本研究では、PPIase の機能に注目し、活性部位に導入した網羅的変異を手がかりに、PPIase が酵素活性を発現するための必要条件を解析した。

1500 種類以上にのぼる既知の PPIase の中で最小のものがヒト FKBP12 (hFKBP12) であり、hFKBP12 を PPIase 機能の最小構造単位としてみなせることから、本研究では、hFKBP12 を標的として選ぶことにした。hFKBP12 の結晶構造によれば、活性部位は Asp37、Arg42、Phe46、Val55 及び Tyr82 の 5 つのアミノ酸残基から構成されている。そこで、これら 5 つのアミノ酸残基をそれぞれ他の 19 種類のアミノ酸残基に置換し、4 残基からなるモデルペプチドを用いて酵素活性を測定した。これらの測定結果をもとに、PPIase の酵素活性発現の必要条件について議論を行う。

T. Ikura and N. Ito : Physicochemical Analysis of the Functions of Peptidyl-Prolyl cis/trans Isomerase, human FKBP12

1P030

超好熱性古細菌グループ II シャペロニンのヌクレオチド結合状態によるコンフォメーション変化

○伊丹 啓祐¹、吉田 尊雄²、丸山 正²、安永 卓生³ (¹九工大・院工・情報工・情報科学、²JAMSTEC、³九工大・情報工・生命)

シャペロニンは、ATP 加水分解を利用して、その内部の空洞にアンフォールディングタンパク質を閉じ込め、タンパク質フォールディングを助ける機能を有している。超好熱性古細菌 *Thermococcus* シャペロニンはグループ II に属し、分子量約 60 kDa の (α and/or β) サブユニット 16 個でオリゴマーを形成する。 α 、 β のそれぞれはそのフォールディング活性が異なり、かつ成育温度によりその組成が異なることが知られている。しかし、その活性の違いを生み出すメカニズムは明らかではない。そこで我々は、*Thermococcus* シャペロニンのタンパク質フォールディングメカニズムを明らかにするために、様々なヌクレオチド結合状態における α サブユニット 16 量体と β サブユニット 16 量体のコンフォメーションを調査した。上述の試料を負染色電子顕微鏡法で撮影し、その後クラスター解析・精密化を行い、各条件での平均像を得た。その結果、ヌクレオチドフリーのシャペロニンは二つの組み込みのふたが両方開いた対称的なコンフォメーション、シャペロニン-ADP-BeFx は二つのふたが両方閉じた対称的なコンフォメーションを多くとることがわかった。その他のヌクレオチド結合状態におけるコンフォメーションも平均像を得ており、互いの比較検討を進めている。さらに、 α サブユニット 16 量体と β サブユニット 16 量体の間のコンフォメーションの違いについても言及する。そして、現在よりも多くの粒子を解析し、像質を向上させ、*Thermococcus* シャペロニンのタンパク質フォールディング反応中のコンフォメーション変化モデルを示す予定である。

K.Itami : Conformation change of hyperthermophilic archaeal group II chaperonin depending upon bound nucleotide

1P032

Protein Disulfide Isomeraseの構造および機能に及ぼす温度・圧力効果

○阿度 和克¹、竹田 直弘¹、菊池 正和²、谷口 吉弘¹ (¹立命館大・理工、²立命館大・情報理工)

Protein Disulfide Isomerase (PDI) は、細胞内の小胞体に大量に存在し、新生ペプチド鎖のフォールディングに関与するタンパク質である。主な機能として、新生タンパク質の分子内ジスルフィド結合形成に関与し、チオール-ジスルフィド間の酸化、還元、異性化反応を触媒する。また、変性タンパク質やミスフォールディングタンパク質の凝集を抑制するシャペロン能も有する多機能タンパク質である。PDI は、a-b-b'-a'-c の 5 つのドメインから構成される分子量 55kDa のタンパク質であり、a, a' ドメインには、チオール/ジスルフィド形成反応に関与する活性部位が存在する。多機能タンパク質である PDI の研究は、機能の面から数多く研究がなされており、細胞内における PDI の役割は明確になりつつある。一方、PDI の構造に関しては、NMR 等により各ドメインの構造は決定されているが、全体の立体構造は現在も解明されていない。本研究では、PDI に及ぼす温度・圧力効果を構造と機能の両面から評価し、その構造安定性と機能失活の相関関係を検討した。PDI の Trp 蛍光スペクトルは、加熱、あるいは加圧に伴って共に長波長側へのシフトが観測された。しかしながら、Trp 蛍光スペクトルの CMS は、熱変性した PDI は 350nm (90 °C, 0.1MPa) であったのに対し、圧力変性の場合はより長波長側の 353.8nm (25 °C, 400MPa) であった。このことから、少なくとも Trp 残基周辺の環境は、熱変性と圧力変性とは異なる状態であることが示唆された。この変性状態の差異については、1) Insulin を基質として用いたジスルフィド結合の還元反応、及び 2) クエン酸シンターゼの熱凝集反応の抑制から検討し、天然状態に対して比較評価する予定である。特に、チオール/ジスルフィド形成反応に関わる 2 つの活性部位は、共に一次構造上 Trp 残基に隣接するため、PDI の構造と機能の相関性に関する知見が得られると強く期待できる。

K.Ado, N.Takeda, M.Kikuchi and Y.Taniguchi : Temperature and pressure effects on the structure and functions of protein disulfide isomerase