1P065

生体分子の構造転移に伴う近傍の「水の場」の協同的運動

○納多 哲史¹、馬場 昭典^{1,3}、小松崎 民樹^{1,2,3} (¹神戸大院・自然、²分子研・理論、³JST/CREST)

近年、タンパク質と水の構造変化の時間スケールは単純に分離しておらず、両者に共通の運動の時間スケールが存在し、その時間スケールでは両者が動的に相互作用していることが指摘されている。また、ポリペプチドが β ターンを形成する際にポリペプチド、水分子双方で運動の統計的複雑さが減少し、構造形成時における動的協同現象の存在が観測されている。本研究では、水を場として扱った場合のタンパク質と水の動的相互作用を具体的に解明することを目的として以下の解析を行った。

タンパク質のプロトタイプとして、helix-coil の2状態的転移が見られる分子量の小さいポリアラニンを採用し、バルクの水および水を陽に含んだポリアラニンの分子動力学計算を行い、ポリアラニンのターン構造形成と水の双極子ベクトル場との動的相互作用を解析した。個々の水分子の運動を追跡する代わりに空間固定の立方格子内に含まれている複数の水分子の短時間平均、局所空間平均を行った双極子ベクトルの場の運動を観察する。ここでポリアラニンの運動と双極子場との相互相関を評価する指標を新たに導入し、ポリアラニンのターン形成前、形成時、形成後での評価を行った。発表ではこの解析結果・考察について報告する。

S. Noda, A. Baba and T. Komatsuzaki : Collective motion of water field vicinity of the structural transition of biomolecule

1P067

分子シャペロン HtpG が特異的に相互作用する標的ポリペプチドの同定

○仲本 準、佐藤 壮志 (埼玉大・理学部・分子生物)

我々はシアノバクテリア *Synechococcus* PCC 7942 株の htpG 遺伝子破壊株を構築し、この変異株が高温・低温・強光・メチルビオローゲン感受性を示すことを明らかにすることで、HtpG の機能を初めて確立した。この変異株は通常培養条件下でも野生株と比較してフィコシアニンなどの光合成色素量の減少を示した。本研究では、HtpG の機能解明をさらに進めるために、この分子シャペロンが相互作用する標的タンパク質を初めて同定したので報告する。htpG 遺伝子破壊株と野生株の細胞抽出液のタンパク質組成を SDS-PAGE で比較したところ、変異株ではフィコビリソーム 30kDa リンカータンパク質が著しく減少していた。フィコビリソームはシアノバクテリアや紅藻などのチラコイド膜に規則的に配列している超分子集合体で光化学系のアンテナとして機能している。数種のリンカータンパク質はこの複雑かつ精緻な構造をつくり上げるために重要な働きをしている。ショ糖密度勾配遠心における変異株のフィコビリソームの沈降速度は野生株のそれよりも小さく、30kDa リンカータンパク質の減少によりフィコビリソームロッド構造の天然型への成熟が阻害されることが示唆された。このリンカータンパク質と HtpG の直接的な相互作用を解析するために、フィコビリソーム、30kDa リンカータンパク質及び HtpG を精製した。これらを用いて、会合体から解離したリンカータンパク質は変性凝集しやすいこと、さらに HtpG がこのリンカータンパク質の変性凝集を阻止することを明らかにした。BSA はこの凝集阻止活性をもたなかった。30kDa リンカータンパク質の凝集による光散乱強度の増加は、1:1 のモル比で HtpG を加えることで完全に抑制された。C 末ドメインを欠損したモノマー HtpG では、リンカータンパク質との相互作用が著しく阻害されたことから、このドメインが特異的相互作用に重要であることが示唆された。

H. Nakamoto and T. Sato : Identification of a client polypeptide interacting with the molecular chaperone HtpG

1P066

コラーゲンモデルペプチド (4(R)-hydroxyprolyl-4(R)-hydroxyprolyl-Gly)₁₀ の熱安定性に及ぼす水和の効果

○西 義則^{1,5}、河原 一樹¹、中村 昇太¹、内山 進^{1,4}、西内 祐二²、中沢 隆³、大久保 忠恭¹、小林 祐次⁵ (¹阪大院・薬、²ペプチド研、³奈良女子大・理、⁴阪大院・工、⁵大阪薬大)

コラーゲンには他のタンパク質ではほとんど見られない 4(R)-ヒドロキシプロリン (Hyp^R) が存在し、トリプルヘリックス構造の熱安定性の上昇に重要な役割を果たしている。我々は、コラーゲンモデルペプチドである (Pro-Pro-Gly)₁₀ と (Pro-Hyp^R-Gly)₁₀ について、転移に伴う熱力学量及び部分モル体積と露出表面積 (ASA) を求め、後者は水和によるエンタルピー増加がトリプルヘリックス構造の熱安定性の上昇に寄与していることを既に報告した¹⁾。ところが (Hyp^R-Hyp^R-Gly)₁₀ は (Pro-Hyp^R-Gly)₁₀ と同程度の熱安定性を有するにもかかわらず、転移に伴うエンタルピー及びエントロピー変化は (Pro-Hyp^R-Gly)₁₀ より大幅に小さく²⁾、その安定化機構は不明であった。今回、(Hyp^R-Hyp^R-Gly)₁₀ の X 線結晶構造解析が完了し (Hyp^R-Hyp^R-Gly)₁₀ の ASA を見積もることが可能になったため、部分モル体積測定の結果と併せることによって (Hyp^R-Hyp^R-Gly)₁₀ の水和の程度を求めた。その結果、三本鎖状態では (Hyp^R-Hyp^R-Gly)₁₀ と (Pro-Hyp^R-Gly)₁₀ の間に水和の程度の差はなかったが、一本鎖状態では (Hyp^R-Hyp^R-Gly)₁₀ の方が (Pro-Hyp^R-Gly)₁₀ より水和の程度が高いことが分かった。水和は水分子と水素結合を形成することによりエンタルピーを減少させ、それによりペプチドの周囲に存在する水分子の自由度が低くなってエントロピーを減少させることから、(Hyp^R-Hyp^R-Gly)₁₀ の高い熱安定性は一本鎖状態における水和の程度の増大によってもたらされたものと考えられた。

1) Y. Nishi et al., *Biochemistry* **44**, 6034-6042 (2005).

2) M. Doi et al., *J. Pept. Sci.* in press.

Y. Nishi, K. Kawahara, S. Nakamura, S. Uchiyama, Y. Nishiuchi, T. Nakazawa, T. Ohkubo, and Y. Kobayashi : Hydration effects on the thermal stability of collagen model peptide, (4(R)-hydroxyprolyl-4(R)-hydroxyprolyl-Gly)₁₀

1P068

クラウディング効果による蛋白質の構造安定化に関する熱力学的研究

○菅 裕美子、月向 邦彦 (広大院・理)

細胞内にはさまざまな物質が混在し隙間がかなり少ないクラウディング状態にあるため、生体内に存在する蛋白質は、排除体積効果により安定化されているのではないかと考えられている。しかし、生体内の環境を実験的に再現することが困難であるなどの理由から、クラウディング効果により蛋白質の安定化が実際に起こっているか、また、その安定化はどのような機構によるかについては不明な点が多く残されている。そこで本研究では、断熱型示差走査熱量計 (MicroCal MC-2) と精密密度計 (Anton Paar DMA5000) を用いて、分子量の異なるデキストランおよびポリエチレングリコール (PEG) 水溶液中におけるリボヌクレアーゼ A (RNaseA) の絶対熱容量を測定し、RNaseA の熱変性における熱力学的パラメータをもとに、クラウディング効果による蛋白質の安定化機構を考察した。

変性中点温度 T_m 及び変性自由エネルギー変化 ΔG は、高分子の濃度が増加するにつれて上昇しており、構造が安定化することが分かった。これは、体積の大きい高分子は蛋白質表面から排斥され、水分子が選択的に結合 (選択的水和) したためと考えられる。次に、RNaseA の構造安定化と排除体積の関係を調べるため、安定性に及ぼす各種高分子の分子量の影響を調べた。 T_m 及び ΔG は高分子の分子量が大きくなるほど増加しており、排除体積が大きいほど蛋白質の変性が抑制されていると考えられる。しかし、添加した高分子の分子量が程度以上に大きくなると、 ΔG の値はほとんど変化しなくなり、安定化に及ぼす排除体積効果に飽和点が存在することが分かった。変性のエンタルピー変化 ΔH とエントロピー変化 ΔS がともに増加することから、この安定化は主として蛋白質のコンホメーションの広がりが抑制された結果と考えられる。

Y. Suga, K. Gekko : Thermodynamic study on protein stabilization induced by macromolecular crowding