1P069

エントロピー駆動の生体高分子凝集と溶媒と構造の関係

○狩野 康人¹、秋山 良¹、木下 正弘² (¹九大・理・化学、²京大・エネルギー理工)

生体中では溶媒をはじめとする様々な低分子や生体高分子が混み合っており、タンパク質の凝集には周囲の分子の影響が大きく働いている。生体高分子の幾何学的形状に応じた溶媒と構造の変化は、凝集の強さを制御するものと思われる。本研究では、特にエントロピー的な効果に注目し、球および非球状の剛体（生体高分子）を小剛体球（水分子）-中剛体球（低分子）二成分系溶媒に浸して溶媒と構造を解析し、溶媒分子の空間分布を計算した。また、溶媒と自由エネルギーを計算し、凝集の強さについて検討した。

まず、小球(S)、中球(M)、大球(L)の直径が1:4:8の系について、 $\phi_S=0.3997$ 、 $\phi_M=0.0003$ (ϕ は充填率)の条件下で、三次元 OZ-HNC 方程式を用いた計算を行った。図は、二つの大球が重心間距離 $12d_S$ 離れて存在する場合の中球の数密度分布である。中球が大球に挟まれる位置で、極端に大きなピークを持つことがわかる。この異常な中球の選択的捕獲が大球の凝集挙動に大きな影響を与えるものと考えられる。

当日は三次元 OZ-HNC の計算結果の詳細について発表する。

Y.Karino, R.Akiyama and M.Kinoshita : Relation between Entropically Driven Aggregation of Biomacromolecules and Solvation Structure

1P071

Staphylococcal nucleaseの折り畳み反応におけるグリセロール添加の効果

○馬場 隆、上久保 裕生、鬼塚 正義、山崎 洋一、今元 泰、片岡 幹雄 (奈良先端大・物質創成)

我々は Staphylococcal nuclease (SNase) をモデル蛋白質として、蛋白質の安定化、巻き戻り機構を明らかにすべく研究を行っている。これまでに、SNase では C 末端領域の Trp140 を中心とした疎水性クラスターの形成が、N 末端領域に存在する β -core 構造との長距離相互作用の形成を促し、天然構造を安定化していることを示してきた。本研究では、疎水性相互作用を安定化するグリセロールが巻き戻り反応に与える影響を明らかにし、C 末端領域の疎水性クラスター形成が折り畳み過程に果たす役割を同定することを目的とした。

速度論的パラメータのグリセロール濃度依存性を明らかにするために、酸変性状態からの巻き戻り反応を、終条件のグリセロール濃度を 0~50% の間で変化させながら、W140 をプローブとした蛍光ストップフロー法で観測した。野生型の巻き戻り過程は不感時間 (1.9msec) 内に終わる反応 (Burst phase) に引き続き少なくとも 4 つの速度成分 (150、10、1.0、0.05s⁻¹) を持つ反応曲線で表されたが、グリセロール存在下でも類似した反応曲線が観測された。しかしながら、Burst phase の強度と、最も速度の大きい成分に著しいグリセロール濃度依存性が見られた。特に、Burst phase の相対蛍光強度はグリセロール非存在下で 18% だったものが、50 w/v% グリセロール中では 30% に増加した。これは巻き戻り初期過程において W140 近傍に疎水性クラスターが形成し、グリセロールを添加するとより凝集した疎水性クラスターが形成されたことを示唆している。本結果から、W140 近傍の疎水性クラスターが天然構造の安定性のみならず、巻き戻り反応初期過程においても重要な役割を果たしていると考えられる。年会では、他の速度論的パラメータや m 値のグリセロール濃度依存性の解析結果をふまえ、巻き戻り過程における疎水性相互作用の役割について詳細な議論を行う。

T.Baba, H.Kamikubo, M.Onitsuka, Y.Yamazaki, Y.Imamoto and M.Kataoka : Glycerol effects for the folding reaction of wild-type Staphylococcal nuclease

1P070

高温リフォールディング法における加熱凝集抑制剤の効果

○浜田 寛之、白木 賢太郎 (筑波大院・数理工学)

大腸菌を用いて組換えタンパク質を生産する場合、封入体と呼ばれる凝集体がしばしば形成される。この凝集体から本来の天然構造を再構成するには、いったん凝集体を高濃度の変性剤により可溶化したのち、透析や希釈により変性剤を除く操作 (リフォールディング) が必要となる。リフォールディング過程で生成する中間体は凝集しやすく、タンパク質濃度に依存して凝集量も増えることから、この中間体の凝集を防ぐことがより多くの活性型タンパク質を得るための鍵となる。我々はこれまでに、ニワトリリゾチームをモデルタンパク質として、変性温度以上の高温を利用したリフォールディング法を報告してきた。還元したリゾチームを常温の緩衝液に希釈するのではなく、98℃の緩衝液に希釈して常温に戻すと、リフォールディング収率が 2 倍ほど向上する。この結果は変性剤変性状態よりも熱変性状態の方がリフォールディングに適した構造であることを示唆しており、加熱凝集抑制剤を用いることでリフォールディング中間体の凝集を抑制できると予想される。そこで本研究では、加熱凝集抑制剤を希釈溶媒に添加して収率の向上を試みた。還元変性させたニワトリリゾチームを、様々な凝集抑制剤を含む希釈溶媒に 100 倍希釈しリフォールディングさせたところ、アルギニンとアルギニンエチルエステルについて収率が向上し、アルギニンエチルエステルを用いた方が高い収率を示した。しかし、同様に高い加熱凝集抑制効果をもつグリシンエチルエステルやポリアミンを共存させても収率が向上しなかった。つまり加熱凝集とリフォールディングの鍵になる反応が異なることを示唆する。pH 依存性などの測定結果を交えて、本大会では、加熱凝集抑制効果とリフォールディングの関連について、第三成分という視点から議論したい。

H.Hamada, K.Shiraki : The effect of thermal aggregation inhibitors on thermal-assisted refolding

1P072

 β -アミロイド凝集に及ぼす水代替物質トレハロースの効果○渡邊 亜沙子¹、岡畑 恵雄²、古澤 宏幸³、星 美奈子⁴、櫻井 実¹ (¹東工大・バイオセンター、²東工大院・生命理工・フロンティア、³東工大院・生命理工、⁴三菱生命研・アルツハイマー病研究グループ、東工大・院生命理工)

アルツハイマー病をはじめとする神経変性疾患は蛋白質フォールディング病と呼ばれ、これらの病気の共通点はある特定の蛋白質が何らかの構造変異を生じ、凝集物を形成、蓄積することである。アルツハイマー病の異常蓄積蛋白質は β -アミロイド (A β) だが、その凝集過程は複雑であり、A β 分子種、濃度、溶媒条件等の違いにより、オリゴマー、線維、ADDL s、プロトフィブリル、アミロスフェロイド等の様々な凝集体を形成する。このような凝集体形成は、蛋白質-蛋白質及び蛋白質-水間相互作用におけるわずかな熱力学的安定性の差異によって支配されていると考えられる。それゆえ、適合溶質の添加によってこの凝集過程は影響を受けると予想される。本研究では、水の代替物質トレハロースが A β の凝集過程に与える影響を、水晶共振マイクロバランス法 (QCM) と円偏光二色性 (CD) を用いて解析した。QCM 実験の結果、トレハロースは、1. β シート構造の A β 同士の凝集に対しては顕著な抑制効果を示さないが、2. β シート構造の A β とランダムコイル構造の A β の凝集に対しては対照として用いたネオトレハロースとマルトースに比べ高い抑制効果をもつ、3. ランダムコイル構造の A β 同士の凝集に対しては、むしろより大きい凝集体の形成を促進する傾向が得られた。次に、CD スペクトルを用いて溶液中の A β の二次構造を追跡した結果、トレハロース存在下では、観測時間中で通常認められるランダムコイル構造から β シート構造への転移が観測できなかった。以上の結果から、トレハロースは A β の β シート構造への転移を抑制することにより、 β シート構造の凝集体の成長を抑制することが示唆された。現在、多種ある A β 凝集体のうち、どの凝集体の成長を抑制しているのか解析中である。

A. Watanabe, Y. Okahata, H. Furusawa, M. Hoshi and M. Sakurai : Effect of trehalose on the aggregation of β -amyloid