1P073

超好熱菌由来蛋白質の構造安定性に及ぼす Osmolyte の効果

○向山 厚、古賀 雄一、高野 和文、金谷 茂則 (阪大院・工)

細胞内には様々な物質が存在し、それらとの相互作用や物理的効果が蛋白質の安定性に影響を及ぼしている。その中でも、Osmolyte と呼ばれる低分子化合物による蛋白質の安定化は、変性状態の水和効果によることが近年の理論および実験の研究から明らかになりつつある。しかしながら、Osmolyte による蛋白質の安定化を詳細に調べた例はまだ少なく、特に超好熱菌由来蛋白質のような高い安定性を有している蛋白質に対する安定化を調べた報告はほとんどない。そこで本研究では Osmolyte の一つである Trimethylamine N-oxide (TMAO) が超好熱菌由来蛋白質の安定性にどのような効果を及ぼすのかを調べることにした。研究対象には *Thermococcus kodakaraensis* 由来リボヌクレアーゼ HII (*Tk*-RNase HII) を用いた。*Tk*-RNase HII は 228 残基からなる単量体の蛋白質で、その立体構造はすでに決定されている。これまでの研究から *Tk*-RNase HII は塩酸グアニジン (GdnHCl) による変性剤変性や熱変性において可逆的に変性し、高い構造安定性を有していることが明らかになっている。TMAO 存在下の *Tk*-RNase HII の構造安定性は塩酸グアニジンを用いた変性剤変性による平衡論的安定性を CD スペクトルの波長 220nm を追跡することで評価した。0.5M TMAO 存在下における GdnHCl 変性は高い可逆性を示し、50 °C での変性のギブスエネルギー変化は TMAO がいないときに比べ、9.2 kJ mol⁻¹ 大きいことがわかった。このことは蛋白質が持つ安定性の大きさに関わらず、蛋白質は TMAO によって安定化されることを示し、TMAO による安定化は変性状態の水和効果によることを支持している。

A. Mukaiyama, Y. Koga, K. Takano and S. Kanaya : The effect of osmolytes on the conformational stability of a hyperthermophilic protein

1P075

高圧 FT-IR 法によるインスリンアミロイド線維の二次構造

○横田 亮平、加藤 稔、谷口 吉弘 (立命館大・理工)

【緒言】アミロイド線維はタンパク質の異常な折れたたみによりできる凝集体であり、アルツハイマー病やプリオン病などの様々な疾患の原因物質とされている。圧力はタンパク質の多量体を単量体へと解離させる効果があることが知られているが、二次構造の観点からの研究はあまり報告されていない。FT-IR 法はタンパク質の二次構造の変化を追跡することができ、なおかつ高圧下での測定が可能である。そこで、本研究では、アミロイド線維形成のモデルタンパク質としてインスリンを用い、形成時間及び、溶媒条件 (pH) 下の異なるインスリンアミロイドの二次構造に及ぼす圧力効果を調べた。

【実験】インスリン溶液 (100 mM NaCl, pH 2) を 60 °C で 50 分または 3 日間インキュベーションし、アミロイド線維を形成させた。50 分、3 日間インキュベーションし得られた凝集体をそれぞれ二種類の溶媒 (50 mM Tris-DCl (pH* 7.6) 重水溶液、及び DCl (pH* 2.0) 重水溶液) にそれぞれ置き換え、凝集体を十分沈降させた後、沈殿物を測定試料として用いた。

【結果】インスリンアミロイドのアミド I/I' バンドから、天然状態には存在しない平行型 β -シート構造に起因するピーク (pH* 7.6:1624 cm⁻¹, pH* 2.0:1626 cm⁻¹) が形成時間、溶媒条件に依存しなくそれぞれ観測された。これらのピークは 1 GPa 以上の圧力をかけても消滅しなかった。これより、平行型 β -シート構造は 1 GPa 以上の高圧下でも解離しないことが示唆される。また、常圧下の二次微分スペクトルから、溶媒条件によりインスリンアミロイドが有している二次構造に違いが見られた。この違いは、アミノ酸側鎖の解離基の影響によるものではないかと考えられる。発表では、その他の条件についても議論する予定である。

R.Yokota, M.Kato and Y.Taniguchi : Pressure-tuning FT-IR spectroscopic study of the secondary structure of insulin amyloid fibril

1P074

蛋白質が foldable になるための必要十分条件は何か?: フォールディング・エレメントからの理解

○新井 宗仁、巖倉 正寛 (産総研・生物機能)

蛋白質のフォールディング問題を配列空間という視点から見ると、foldability の決定因子解明が重要な問題となる。この問題は、蛋白質が foldable になるための必要十分条件を解明する問題と言い換えることもできる。我々は、蛋白質のフォールディング・エレメント (FE) を手がかりとしてこの問題に取り組んできた。FE とは、円順列置換変異によって主鎖を切断し新しい末端とすると蛋白質が non-foldable になる部位であり、ジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR) には 10 個の FE (平均 8 残基) が存在する。FE を壊すと蛋白質は foldable でなくなることから、蛋白質が foldable になるための必要条件の一つは、全ての FE が存在していることと言える。では、FE が存在しているだけで十分なのだろうか? DHFR の FE 部分に対応するペプチドを合成し混合してみたが、FE ペプチド間の相互作用は弱く、天然状態様の二次構造は形成されなかった (1)。したがって、FE が存在しているのみでなく、FE 同士が適切に連結されていることも、蛋白質が foldable であるための必要条件である。一方、FE の役割を調査することで、foldable になるための必要十分条件を考察できる。DHFR の FE ペプチドは単独で安定な構造を形成できなかったことから (1)、FE とは非局所的相互作用において重要な役割を果たす領域であり、こうした相互作用を通して foldability に関与していると考えられる。そして、非局所的な FE 間相互作用を妨げるような操作 (円順列置換など) を加えると、蛋白質は non-foldable になると考えられる。したがって、FE 間相互作用を効率的に実現させることが、蛋白質を foldable にするための必要十分条件であると推測される。

1. Arai & Iwakura (2005) *Proteins*, in press.

M.Arai, M.Iwakura : What are the necessary and sufficient conditions for a protein to be foldable? Understanding from the folding elements

1P076

SS 結合を 1 本含むリゾチーム変異体によるアミロイド様線維形成反応

○下浦 弘貴¹、河野 良平²、赤坂 一之²、橘 秀樹¹ (¹神戸大・理、²近畿大・生物理工)

ニワトリリゾチームのジスルフィド結合全欠損体 (OSS 体) は自然状態でアンフォールドしており、アミロイド様線維を形成する。我々はその前駆会合体の高圧下での解離、会合体の安定性、解離に伴う体積減少、解離反応の遷移状態の特性、会合反応における見かけの核サイズなどを報告してきた。ここでは単量体での分子内構造がアミロイド様線維形成に及ぼす影響を知るために、いろいろな程度に弱く分子内フォールドしている、ネイティブな SS 結合を 1 本だけ持つようなリゾチーム変異体 (1SS 体) 4 分子種によるアミロイド様線維形成反応を調べた。1SS-[C6-C127] および 1SS-[C30-C115] はどちらも天然リゾチームの構造で言う alpha-domain に SS 結合を持っており、モノマー状態に関するこれまでの研究から、構造の大きさはそれぞれ、天然構造の約 50 %、39 %、また 1SS-[C64-C80] および 1SS-[C76-94] は beta-domain ならびに inter-domain に SS 結合を持っており、構造の大きさはそれぞれ、天然構造の約 14 %、20 %、SS 結合が架かっていない時の構造安定性は C64-C80 > C30-C115 > C6-C127 > C76-94 の順であり、SS 結合が架かっている時の構造安定性は C30-C115、C6-C127 > C64-C80 > C76-C94 の順であることがわかっている。濁度法と CD で見たそれらの会合速度は 1SS-[C30-C115] および 1SS-[C64-C80] で速く、1SS-[C76-94] では OSS 体と同程度、一方、1SS-[C6-C127] では遅かった。いずれの場合も beta 構造の増加を伴った。また、OSS 体に比べると重合核サイズの塩濃度依存性が少ない。原子間力顕微鏡による会合体形態の観察結果ならびに NMR 検出 H-D 交換法によって推定される OSS 体線維内で構造化しているポリペプチド領域との関連も報告する。

H.Shimoura, R.Kouno, K.Akasaka and H.Tachibana : Amyloid-like Fibril Formation of Hen Lysozyme Single-Disulfide Variants