1P081

PrionはDownhill Folderか？

○桑田 一夫、中村 寛則、鎌足 雄二、松本 友治（岐阜大学人獣感染防御研究センター）

プリオンの正常立体構造形成過程は二状態的である、と考えられている。しかし、平衡測定ではp Hに依存してフォールディング中間体の形成が観測されている。また、速度論的な中間体の存在が示唆されるデータも報告されている。一方、プリオンのリフォールディング過程は極めて早く、室温ではおよそ100 μ 秒の緩和時間で進行する。さらに、高圧NMRの観測結果によれば、プリオンの安定性は、二次構造のモチーフ毎に大きく異なり、残基レベルでも異なっている。これらのことは、プリオンの立体構造形成過程に、特徴的なエネルギーバリアーが存在しない可能性を示唆している。近年、我々によって開発された連続光プローブ・ナノ秒レーザー温度ジャンプ法による観測に基づき、正常プリオンの α ヘリックス形成が二状態的であるのか、ないのか、あるいは連続的であるのか等について議論する。プリオンにおける異常立体構造形成過程においてはどうか？プリオンには少なくとも8種類の生物学的性状の異なる株の存在が知られている。もし、異常構造形成過程が二状態的であれば、このような株はどのようにして安定化されるのだろうか？Prusinerらのグループによれば、異常プリオン構造には、長い β ヘリックスの形成が見られる。この β ヘリックス形成過程は、計算機シミュレーションによれば、二状態的ではなく、連続的である。以上の結果は、プリオンにおいては、その立体構造形成過程が、正常構造、異常構造を問わず、モノマーレベルでは連続的に進行し、異常構造においては、アミロイド形成により、複数の中間体が様々な‘株’として安定化される可能性を示唆している。またこのようにして出来たアミロイドは、当然、不均一で、感染性を持つものと持たないものとが混在している可能性も高いだろう。

K. Kuwata, H. Nakamura, Y. Kamatari, T. Matumoto : Is Prion a downhill folder ?

1P083

アミノ酸配列を単純化したタンパク質の構造安定性

○山田 宗高¹、中村 成芳²、村上 さおり¹、加藤 淳¹、城所 俊一²、黒田 裕¹（¹東京農工大・生命工学、²長岡技科大・生物系）

立体構造はアミノ酸配列により指定されるが、最近の研究で、配列中の全残基が構造形成に等しく寄与するわけではなく、寄与が少ないアミノ酸を配列リンカーに置き換えることが可能であることが実験的に示されている。例えば、タンパク質の折れたたみの研究によく用いられるウシ膵臓トリプシン阻害タンパク質（BPTI）においては、58残基のうち21、22、26と27箇所をリンカーの役割のアラニン残基に置換した単純化配列BPTI変異体でさえ、立体構造がほとんど変わらないという知見が得られている。

本研究では、1組のジスルフィド結合を持つ還元型のBPTI変異体（野生型BPTIでは3組存在する）を標準型とし、単純化BPTI変異体との構造安定化要因を解明することを目的とする。そのため、高精度示差走査型熱量計（DSC）を用いて、標準型BPTIとアラニンの21、22、26、27残基置換体である単純化BPTI変異体について、定量的な熱力学的解析を行っている。現在までの測定から、標準型BPTIとアラニン21、22残基置換体の熱変性過程が2状態転移であることを明らかにした。今後、各々の単純化BPTI変異体の熱変性中間温度（ T_m ）、変性のエンタルピー変化、熱容量変化などの熱力学的パラメーターを求める。

発表では、これらの解析結果から、アミノ酸配列を単純化した変異体の構造安定化の評価、及び標準型BPTIと単純化配列変異体BPTIの構造安定化機構の相違についての熱力学的な考察をする。

M. Yamada, S. Nakamura, S. Murakami, A. Kato, S. Kidokoro and Y. Kuroda : Structural stability of BPTI variants with highly simplified amino acid sequences

1P082

カルシウムイオン非存在下におけるヤギ α -ラクトアルブミンの ϕ 値解析

○友寄 克亮、佐伯 喜美子、槇 互介、桑島 邦博（東大・理・物理）

α ラクトアルブミンのモルテングロビュール状態は、天然状態ほど安定ではないが α ドメインが部分的に形成されている。遷移状態において α ドメインがさらに安定化されるのか否かは最近まで解っていなかった。Saeki.et.al[J Mol Biol 2004;341:589-604]の ϕ 値解析によれば、ヤギ α ラクトアルブミンの遷移状態の構造形成開始部位は α ドメイン広範囲にわたって分布するのではなく、 Ca^{2+} 結合部位とCヘリックス、 β ドメイン間のインターフェースを含む領域に局在化していることが示された。しかしながら、 Ca^{2+} 存在下と Ca^{2+} 非存在下で遷移状態の構造が同様であるか否か解かっていない。 Ca^{2+} 結合部位は、遷移状態の構造化領域に含まれており α ラクトアルブミンのフォールディングに重要な役割を果たす可能性がある。本研究では、 Ca^{2+} 非存在の条件下で、 Ca^{2+} 結合部位近傍および α ドメイン、 β ドメインの各部分に変異を導入した変異体を使用し ϕ 値解析を行う予定である。これまでのところ Ca^{2+} 非存在条件下では、 Ca^{2+} 1mM存在条件下と比べて、 Ca^{2+} 結合部位近傍のCヘリックス上にあるVal90は、遷移状態で構造ができていないことがすでに明らかになった。今回 α ドメイン、 β ドメインの各部分にも変異を導入した変異体を用いて、平衡論および速度論的な測定を行い Ca^{2+} 非存在下での遷移状態の構造形成開始部位を探索する。また Ca^{2+} 1mM存在下における佐伯らの測定ではヤギ α ラクトアルブミンの場合、中間状態の安定性が低く、中間体の安定性の変異体と野生型との違いは、天然状態の安定性の変異体と野生型との違いと相関が見られない。今回 Ca^{2+} 非存在下においても同様に中間体の安定性についてストップフローCD装置を用いて調べる予定である。詳細はセッションにて説明を行う。

K.Tomoyori,K.Saeki,K.Maki,K.Kuwajima : The ϕ -Value Analysis of Goat α -Lactalbumin in the Absence of Calcium Ions

1P084

イヌミルクリゾチームにおける立体構造形成とAsn残基の非酵素的脱アミド化反応の関わり

○野中 康宏、秋枝 大介、相沢 智康、出村 誠、新田 勝利、河野 敬一（北大院・理・生物）

蛋白質にとって望ましくない化学修飾は、構造的不安定化や機能の低下を招く事がある。その一つとして知られるAsn残基の非酵素的な脱アミド化では、Asn残基が反応後にAspもしくはisoAspに変換する。種々の蛋白質やペプチドで見られるため、実験試料や医薬品の精製・保存における問題となる事や、病気や老化の原因となる事が知られている。脱アミド化の生じやすさは温度、pH等の溶液条件や、Asn残基の近隣の一次配列によって大きく異なると考えられている。さらにAsn残基周辺の水素結合や二次構造等の形成も影響すると考えられているが、立体構造とAsn残基の反応性との関係は、まだ十分には示されていない。イヌミルクリゾチーム(CML)は保存する溶液条件によって、容易に等電点の不均一性を生じた。より高温で塩基性条件の時に起こり、分子量の大きな変化が無い事から、Asn残基の脱アミド化であると推測した。CML野生型について塩基性溶液中で反応を進行させ、クロマトグラフィーで調べたところ、複数のAsn残基が速やかに反応する様子が示された。一次配列と、水素結合や二次構造、ジスルフィド結合形成の情報を基に、特定のAsn残基の脱アミド化速度を予測する計算方法が過去に提示されているので、CMLのAsn残基について計算した。計算結果から高い反応性を持つと判断されたAsnをGlnに置換した変異体を作製し、脱アミド化の様子を調べたが、それ以外に非常に反応しやすいAsn残基が存在する事が分かった。つまりこのAsn残基が予測計算に反して高い反応性を有しており、一次配列や構造形成以外の要因が関わっている可能性も考えられる。さらに変性状態で脱アミド化を進行させた実験では、native構造の時とは異なるAsn残基が反応した。これは構造形成の違いがAsn残基の反応性に影響する事を表わしている。

Y.Nonaka, D.Akieda, T.Aizawa, M.Demura, K.Nitta and K.Kawano : Structure formation and non-enzymatic deamidation of asparagine residus in canine milk lysozyme