1P089

非天然状態にある蛋白質の部分分子容予測法の開発

○関 安孝、曾田 邦嗣（長岡技科大・生物）

部分分子容は、天然状態だけでなく、解鎖状態や変性中間状態などの非天然状態の蛋白質とその水和水の構造を反映する観測量である。これらの実測値に基づいて、多様な非天然状態にある蛋白質の構造を議論するためには、任意のコンホメーションをもつ蛋白質の部分分子容に対する水和水の寄与を正確に予測する必要がある。これ迄にも、部分分子容に対して様々な予測法が提案されているが、任意のコンホメーションを持つ蛋白質の部分分子容を定量的に予測できる方法は未だ無い。本研究の目的は、天然及び非天然状態の蛋白質に適用可能な部分分子容の予測法を開発することである。

最初に、溶質と溶媒の間に水素結合が無いときの、溶質周辺の溶媒水の空間分布を調べるために、メタンと部分電荷をゼロにした無極性アラニン、リゾチーム水溶液の分子動力学シミュレーションを行った。その結果、溶質分子表面近傍の“溶質と溶媒の隙間”が部分分子容に有意に寄与すること、またその厚さを分子表面で平均すると、溶質のサイズや表面形状に依存せず、約0.06nmとなることが分かった。この隙間の寄与は、解鎖状態など分子表面積が大きい場合に、特に大きくなる。次に、20種のトリペプチドと4種の蛋白質の分子動力学シミュレーションを行い、溶質と溶媒水分子との水素結合数を調べた。その結果、各水素結合サイトの平均水素結合数は、露出表面積よりも分子表面積に良く比例することが分かった。予測法にこれらの結果を取り込むことにより、溶媒露出度が大きく異なる分子種（蛋白質、アミノ酸、ジペプチド、有機低分子）について、実測値を高精度で予測することが可能になった。年会では、解鎖状態や変性中間状態等の非天然状態の様々なモデルについて、予測結果を議論する。

Y.Seki, K.Soda : Developing a method for predicting the partial molecular volume of proteins in nonnative states

1P091

高酸化活性セレン試薬を用いたリボヌクレアーゼ A のフォールディング過程の解析

○米田 光政、逸見 佳代、岩岡 道夫（東海大・理・化学）

SS 結合をもつタンパク質の酸化的リフォールディングの実験において、従来からグルタチオンやDTTox等のイオウ試薬が用いられてきた。このようなイオウのリフォールディング試剤では、タンパク質と平衡反応となるために多量の試薬が必要であり、かつ反応速度が遅いという欠点がある。しかし、最近DHSoxと呼ばれる水溶性セレン試薬が合成され、これを用いるとイオウ試薬よりもはるかに速くSS結合が生成することがわかった。リフォールディング中間体では、SS形成反応と同時にSS交換反応も進行することが考えられるが、DHSoxを用いた場合には、SS形成反応の方が速やかに進行するため、SS交換反応が起こる前に反応が完結する。即ち、DHSoxを用いることにより、SS交換反応を分離することが可能である。本研究では、イオウの代わりにセレンを含む新しいフォールディング試剤の開発を進め、それらを用いたリボヌクレアーゼAのリフォールディング過程の解析を行い、セレン試薬の有用性を示すことを目的に研究を行った。DHSoxを用いたリボヌクレアーゼAのリフォールディング実験では、HPLCの解析からフォールディング過程がR→1S→2S→3S→4Sとなることがわかった。実験データの解析から反応速度定数(k1-k4)を求めたところ、速度定数の値は中間体に含まれるSH基の数にほぼ比例することがわかった。SS形成反応が迅速かつ不可逆であることを利用して、SS交換反応をモニターしたところ、3S中間体から熱力学的に安定なN体(native状態)の生成が最終的に確認できた。

M. Yoneda, K. Henmi and M. Iwaoka : Analysis of the folding pathways of ribonuclease A by using selenium reagents with high oxidizing ability.

1P090

シトクロムcのモルテングロビュール状態の多状態熱転移に伴う構造・体積変化

○中村 成芳、馬場 隆之、関 安孝、城所 俊一（長岡技科大・生物系）

多くの蛋白質のフォールディング過程でモルテングロビュール(MG)状態が過渡的な中間体として観測されている。また特定の溶液条件下ではMG状態を平衡論的に安定な構造として観測することができ、その構造や安定化機構について多くの研究が行われている。シトクロムcは酸性pH、高塩濃度下で2つのMG状態(MG1, MG2)が存在することが分光学的研究により示唆されている。我々は示差走査熱量測定(DSC)により高塩濃度、酸性pHで2つのMG状態間の熱転移を観測し、MG状態の熱転移に伴う熱力学量変化を決定した。またMG状態の熱転移におけるCDスペクトルの温度依存性を測定し、DSCにより決定した熱力学量を用いて解析することで、MG1, MG2のCDスペクトルの同定に成功した。その結果、MG1, MG2ともに2次構造含量は天然(N)状態と同程度だが、芳香族残基、ヘム周辺の立体構造はN状態とは異なることがわかった。また、MG2ではMG1に比べて3次構造がより壊れていることも示唆された。さらに、圧力振動熱量測定(PPC)と高精度密度測定を用いてMG状態の熱転移に伴う部分分子体積変化を観測した。この結果、MG2→MG1→Nの転移過程では段階的に部分分子体積が減少することが明確になった。疎水性残基の側鎖が脱水和すると部分分子体積が減少することを考慮すると、シトクロムcのフォールディング過程(MG2→MG1→N)では、αヘリックスが形成された後、疎水性側鎖が分子内部に段階的に埋もれていくことが推定された。

S. Nakamura, T. Baba, Y. Seki, S. Kidokoro : The structure and volume change on the multi-state thermal transition of the molten-globule state of cytochrome c

1P092

プロリン残基を含まないスタフィロコッカール・ヌクレアーゼ変異体のNMRシグナルの帰属と天然条件下での水素・重水素交換法

○榎 互介、遠藤 峻彦、桑島 邦博（東大・院理・物理）

スタフィロコッカール・ヌクレアーゼ(SNase; 149残基)のプロリン残基を全て他の残基に置換したproline-free変異体は、野生型と比べてより単純なフォールディングを示すことが知られており、フォールディング速度論の研究において有用である。本研究では、proline-free SNaseの一つであるSNase P11A/P31A/P42A/P47T/P56A/P117Gを用いて、proline-free SNaseのフォールディング及び中間体の詳細を明らかにすることを目的とする。現在までproline-free SNaseのフォールディング機構について、残基レベルでの詳細については知られていない。そこで我々は、まずproline-free SNaseの多次元NMRスペクトルを測定した(25℃, pH* 7.0)。¹H-¹⁵N HSQC, HNCACB及びCBCA(CO)NHスペクトルを測定することにより、主鎖の¹H^N, ¹³C α, ¹³C β, ¹⁵Nのシグナルの70%程度を帰属することができた。帰属されたシグナルを野生型と比較すると、置換した残基からのシグナルが存在すること以外に殆ど差はなかった。この結果に基づき、proline-free SNaseの安定性を残基レベルで調べるために、天然条件下において水素・重水素交換を行い、その交換過程をNMRを用いて測定した(25℃, pH* 5.1)。各2次構造要素ごとの安定性を調べたところ、β-strand II, III及びVが、β-strand I及びIV, helix I及びIIよりも安定であることが示唆された。

K. Maki, T. Endo and K. Kuwajima : NMR resonance assignments and native-state hydrogen/deuterium exchange of a proline-free variant of staphylococcal nuclease