2P069

親水性アミノ酸配列タグによる蛋白質の溶解度向上法の開発

○加藤 淳¹、曾田 邦嗣²、黒田 裕¹ (¹東京農工大・生命工、²長岡技科大・生物系)

蛋白質の溶解度は、蛋白質立体構造解析などの物理化学的実験を行う上で重要な要素の一つである。例えば、NMR法による蛋白質の構造解析では、数100 μ M～数m Mの高い溶解度が必須である。また一般に、蛋白質の機能の活性や構造的な特性を測定する際、そのS/N比が試料濃度の二乗に比例する。即ち、より溶解度の高い試料を調製することができれば、より質の高いスペクトルを短時間に得る事が可能になり、解析も容易になる。このように、蛋白質の構造や機能を解析する上でその溶解度は極めて重要であるにも拘らず、研究が余り進められていないのが現状である。本研究の目的は、目的蛋白質の機能や立体構造に影響を及ぼすことなく、その溶解度の向上を図る事である。従来、目的とする蛋白質の溶解度を向上させる方法としては、pH、温度や塩濃度などの変化による手法が一般的であった。しかし、これらの方法では溶媒条件が制限されるために蛋白質の機能発現が低下するなど、問題を生じることが多い。

我々は、蛋白フォールディングの研究に頻用されている58残基からなるBPTI(牛胰臓トリプシンインヒビター)の変異体であるBPTI22を溶解度の低いモデル蛋白質として用い、荷電量の変化が溶解度にどのように影響するのかを調べた。具体的には、BPTI22変異体のC末端、N末端に、それぞれ数個のArg残基やLys残基を付加することによって、蛋白質分子の総電荷を上げた。その結果、蛋白質の荷電量の増加と共に、溶解度が非線形に向上することが明らかになった。

A.Kato, K.Soda, Y.Kuroda : Toward a Systematic Method for Enhancing Protein Solubility

2P071

アポミオグロビンの酸変性過程における蛋白質溶媒相互作用

○馬殿 直樹、寺嶋 正秀(京大院理)

溶液中の蛋白質構造について、NMR(核磁気共鳴)やCD(円二色性)等を用いて多くの研究が行われてきている。しかし、一つの手法だけでは蛋白質のある一面しか捉えることができないため、蛋白質を完全に理解するためには複数の手法による結果を組み合わせる必要がある。拡散係数(D)は、蛋白質全体の大きさや形、溶媒との相互作用を反映するため、蛋白質を特徴づける重要なパラメーターである。従来、D測定には光散乱法やパルス磁場勾配NMR法などが用いられてきたが、試料の濃度が高い、測定時間が長い等の問題点があった。そこで、われわれは、自発的に蛋白質にラベルされる光反応性分子(sulfo-HSAB)と過渡回折格子法を用いて、シンプルな試料調製、低濃度の試料で、短時間測定可能な手法を開発した。またこの手法を用いて、アポミオグロビン(アポMb)の変性過程におけるD変化を測定した。アポMbはpH4において平衡中間体を取り、その構造がpHジャンプ法で観測されるkineticな中間体と非常によく似ていることが知られている。測定の結果、DとCDでは異なるpH依存性を示した。まず、pH4においてCD値は減少したが、Dは天然状態とほぼ同じ値を示した。この結果とこれまでのX線散乱やNMRの結果から、pH4中間体はいくらか二次構造が壊れているが、コンパクトな構造で溶媒との相互作用も天然状態類似であることがわかった。次に、変性状態(pH2)ではDは天然状態の約半分になった。これは、変性に伴う形や回転半径の変化から予想される値よりも小さい。従って、変性状態ではアポMbは溶媒と強く相互作用していると考えられる。pH2においてアポMbは塩添加によりモルテングロビュール様構造を形成するが、この強い蛋白質-溶媒相互作用がその一因であろう。

N.Baden, M.Terazima : Protein-solvent interaction upon the acid denaturation of apomyoglobin

2P070

タンパク質の安定性に対するH₂OとD₂Oの比較

○山本 未央、富沢 由美子、清水 昭夫(創価大学院・生物工学)

タンパク質の安定性は分子内相互作用とタンパク質と水との相互作用である水和の微妙なバランスで決定する。つまり、溶媒効果はタンパク質の安定性に対してきわめて重要な要因である。これまでの研究でいくつかの天然状態のタンパク質においてD₂O中の方がH₂O中に比べて安定であるということが報告されている。その理由としてD₂Oの水素結合がH₂Oに比べて強いためであるといわれているがその詳細に関しては未だよく分かっていない部分が多い。また、分子全体ではなく二次構造である β -ヘアピン、 α -ヘリックスといった部分構造あるいはモルテングロビュール状態等の中間体に対する系統的な溶媒効果(D₂OとH₂Oの比較)に関しては研究がほとんどされていない。本研究では天然状態および中間体の性質がよくわかっているウシ α -ラクトアルブミンを用い、天然状態や中間体の編成過程を水素結合の強さの異なるD₂O中とH₂O中で調べ、タンパク質の安定性に対する溶媒効果に関する知見を得ることを目的とする。二次構造(CDスペクトル)および三次構造(蛍光スペクトル)のD₂OおよびH₂O中での尿素変性過程を調べた結果、すでにH₂O中で報告されているようにD₂O中においても二次構造の変性が三次構造の変性より高尿素濃度で起こり中間体を形成した。D₂O中とH₂O中を比較すると二次・三次構造共に変性がD₂O中の方が高尿素濃度で始まることからD₂O中の方が安定であると考えられる。また、転移はD₂O中の方がシャープで協同性が高いと考えられる。さらに、中間体を形成する尿素濃度領域はD₂O中の方が狭いことが明らかとなった。現在これらの結果を詳細に検討するとともに β -ヘアピン、 α -ヘリックスといった部分構造に対する溶媒効果を測定中でありその結果も合わせて報告する予定である。

M.Yamamoto, Y.Tomizawa and A.Shimizu : The solvent effect on the structural stability of protein

2P072

NMRによる超好熱菌由来のPyrrolidone carboxyl peptidaseのリフォールディング中間体に関する研究

○竹内 誠¹、水口 峰之¹、河野 隆英¹、大木 進野²、油谷 克英³、森 佳洋¹、篠田 裕之¹、河野 敬一⁴ (¹富山医薬大・薬、²北陸先端大学、³理研播磨、⁴北大院・理)

タンパク質が変性状態から天然構造へとリフォールディングする反応の初期には、平衡条件下でのモルテングロビュール状態に類似する中間体構造を形成することが多い。このようなリフォールディング初期中間体は過渡的に形成されるため通常は詳細に研究することが困難である。しかし、リフォールディングが非常に遅いタンパク質を用いることによって、初期中間体の立体構造を調べることが可能になると考えられる。我々は、リフォールディングが異常に遅いタンパク質として知られている超好熱菌、*Pyrococcus furiosus*、由来のPyrrolidone carboxyl peptidase (PCP)のCysフリー変異体(PCP-0SH)を利用して、そのリフォールディング初期中間体について研究した。核磁気共鳴(NMR)法はタンパク質の溶液中での立体構造を調べるのに優れた手法であり、原子レベルでの立体構造情報を与える。初期中間体のHSQCスペクトルはシグナルの分離が悪く、さらに、シグナルの数がアミノ酸残基数から予想される数の半分程度であったため解析は困難であった。我々は、PCP-0SHのセルフリー発現システムを構築しアミノ酸選択的に¹⁵N標識したPCP-0SHを15種類作製した。PCP-0SHの初期中間体について、アミノ酸選択的ラベルとCBCANH等の3次元NMRスペクトルを用いて主鎖の連鎖帰属を行った。帰属の結果よりHSQC上で観察されたクロスピークはPCP-0SHのN末端半分由来するシグナルであり、C末端側のシグナルは観測されていないことがわかった。次に、異種核¹H-¹⁵N NOEによって解析したところ、N末端側半分はピコ秒からナノ秒タイムスケールの高い運動性を有することがわかった。

M. Takeuchi, M. Mizuguchi, T. Kouno, S. Ohki, K. Yutani, Y. Mori, H. Shinoda, and K. Kawano : NMR investigation of the refolding intermediate of pyrrolidone carboxyl peptidase from a hyperthermophile