3P065

サブミリ秒分割H/D交換とNMRを用いたアポミオグロビンの折り畳みにおけるヘリックス形成機構

○鶴澤 尊規¹、西村 千秋^{2,3}、秋山 修志⁴、石森 浩一郎⁵、高橋 聡³、Jane Dyson²、Peter Wright² (¹京大院・工、²Scripps、³阪大・蛋白研、⁴理研・播磨SPRING-8、⁵北大院・理)

蛋白質の折り畳み過程の解明には、二次、三次構造の形成過程を詳細に調べる必要がある。折り畳み過程に関する研究が大きく進んでいる蛋白質の一つにアポミオグロビン(apoMb)があげられ、A $\rightarrow$ EとG,Hの7つのヘリックスのうち、ABGHヘリックスが形成された中間体が折り畳み開始後数ミリ秒以内に形成するとされている。しかし、この中間体の残基レベルでの安定性が観測されていないため、なぜ配列の両末端に存在するこれらのヘリックスが最初に安定化されるのかは理解されていなかった。そこで、本研究では高速溶液混合と水素重水素(H/D)交換法を組み合わせ、初期中間体でどの残基が安定なヘリックス形成に寄与するのかを明らかにし、折り畳み初期の構造形成に対する知見を得ることを目的とした。

pH2で変性したapoMbを高速溶液混合技術で急激にpH6へジャンプさせ折り畳み反応を開始した。初期中間体を観測するため、0.4 msの折り畳み時間の後に、H/D交換を促進する高いpD(7.10.7)の重水緩衝液と混合した。さらに、H/D交換を3.6ms間行った後、pDを6に下げH/D交換を停止させた。得られたサンプルのHSQCスペクトルを測定し、各シグナル強度のH/D交換時のpDに対する変化から、プロテクションファクター(PF)を残基ごとに見積もった。PFは高いほど、立体構造形成によりH/D交換が遅れることを示す。

以上の観測の結果、初期中間体ではA(C末端)、B(N末端)とGヘリックスに位置する残基のPFが高いことがわかった。これらは主に疎水性残基であり、三次元構造上で蛋白質内部の一箇所に集中していることから、折り畳みにおいて疎水性残基による初期収縮が起こり、疎水性度の高い蛋白質内部から二次構造が安定化されるという機構を提案する。

T.Uzawa, C.Nishimura, S.Akiyama, K.Ishimori, S.Takahashi,H.J. Dyson and P.E. Wright : Helix formation in apomyoglobin folding revealed by submillisecond H/D exchange & NMR

3P067

ウシβラクトグロブリンのタンフォード転移のダイナミクスと機構の研究

○櫻井 一正¹、後藤 祐児^{1,2} (¹阪大・蛋白研・構造生物、²CREST/JST)

ウシβラクトグロブリン(β LG)のEFループは、溶媒と蛋白質内部の間を仕切る“蓋”のような部位である。pH 7以下では蓋は閉じているが、pH 7以上ではその蓋が開く。この構造変化はタンフォード転移として知られている。 β LG分子内部には疎水分子リガンドが結合することから、タンフォード転移はリガンド結合能を変化させる働きをしていると考えられている。今回、私たちはEFループ構造変化のダイナミクスをNMRを用いて詳細に調べ、その結果からタンフォード転移の機構を理解することを目指した。

野生型の β LGは中性でNMRシグナルの広幅化を起こすため、実験では変異体A34Cを用いた。まずpH変化に伴うHSQCシグナルの変化を調べた。またモデルフリー緩和解析もpHを変化させて行った。これらの結果から、EFループの先端部ではmsより遅い時間スケールの運動性を示すのに対しループの根元では μ s-msの時間スケールの運動性を示すことが分かった。結晶構造中では、根元の残基はEFGストランド間で水素結合を形成している。このことからEFループの構造変化は、はじめにストランド間の水素結合の開裂が起こり、続いてループ全体の構造変化が起こるという2段階経路であると考えられる。そして、それぞれの反応速度が μ s-msと>msの時間スケールであると思われる。

また、HSQC測定からpH 6付近でGHループにも構造変化があることが分かった。上で述べた通りEFGストランド間の水素結合が存在することから1段階目の水素結合開裂はこのGHループの構造変化により引き起こされていることが考えられる。つまり、pH変化に伴うGHループの構造変化が、ストランド間の水素結合を介し、間接的にEFループの構造変化を起こしているのではないかと考えられる。

K. Sakurai and Y. Goto : Study of dynamics and mechanism of Tanford transition of bovine β -lactoglobulin

3P066

基準振動解析による相同なタンパク質の動的構造の比較

○輪湖 博¹、大塚 元央²、富澤 裕樹³、加藤 雅樹⁴、猿渡 茂⁵ (¹早大・社会科学、²NECソフト(株)、³(株)サイエンスハウス、⁴東大・医科研・HGC、⁵北里大・理・物理)

基準振動解析では、立体構造がほとんど同じでも、アミノ酸配列が少しでも異なれば、アミノ酸残基どうしの相互作用の微妙な違いを反映して、あるアミノ酸残基のゆらぎや、あるアミノ酸残基ペアのゆらぎの相関などに微妙な、そして時には顕著な変化を引き起こすことがある。したがって、逆に、そうした変化を引き起こした相互作用を調べることによって(あるいは変化が引き起こされなかった場合には、その理由を調べることによって)、どのアミノ酸とどのアミノ酸の相互作用が立体構造の動的構造にどのように寄与しているかを推定することが可能となる。タンパク質の動的構造の理解には、動的な視点から定義されたドメイン構造や、相互作用のネットワークといったより高次の機構を解析することが重要であるが、アミノ酸配列の違いという振動に対するゆらぎの変化という応答を調べることによって、多くの情報が得られると期待できる。しかもこうした情報は、静的な構造の違いを解析しただけではなかなか得られない情報でもある。これまでも、434Croとリプレッサーとの比較、BPTIとリゾチームのアミノ酸置換体と野生体との比較を通して、こうした議論を報告してきたが、今回は、いくつかの相同タンパク質の比較にまで拡張した解析結果を報告する。より大きなアミノ酸配列の変化が起っても変わらない様相、起こったことによって大きく異なる様相などを調べ、それぞれのFOLDにおける動的構造の特徴について議論する。結果の詳細については、当日報告する予定であるが、結果の一部は、基準振動解析データベース ProMode (<http://promode.socs.waseda.ac.jp/>)でも公開している。ここでは、ASH(藤ら)による相同タンパク質の立体構造アラインメントを反映させた形で、原子の位置ゆらぎや二面角のゆらぎを相同タンパク質間で比較することができる。

H. Wako, M. Otsuka, Y. Tomizawa, M. Kato and S. Endo : Comparative study on dynamic structures of homologous proteins by normal mode analysis

3P068

イーストディスプレイ法を用いたウサギ抗体作製法の開発

○中川 将利、東 隆親(東京理科大・生命研)

高アフィニティ抗体はタンパク質の微小な構造変化やシグナル伝達などのタンパク質間相互作用を調べる上で非常に重要である。しかし、従来のハイブリドーマ法によるモノクローナル抗体作製法では、アフィニティの高い抗体を産生する細胞の限界希釈過程での消失、長い作製時間など、アフィニティの高いモノクローナル抗体を迅速に作製することは困難であった。そこで本研究では、高アフィニティポリクローナル抗体を産生することが知られているウサギをモデルとして用い、そのB細胞を取り出し、抗体可変領域遺伝子を増幅後、イーストディスプレイ法を用いることによって、従来の方法では得ることの出来なかった高アフィニティのウサギ抗体作製法を開発し、短期間で大量の抗体作製が可能な系を構築することを目的とした。

脾臓および骨髓から集めた抗体産生細胞のmRNAを取り出し、RT-PCR法を用いてcDNAを作製した。H鎖、L鎖それぞれのFv領域の遺伝子をPCRで増幅し、それらをリンカーでつなぎ、single chain Fv(scFv)とした。そのN末端にHAタグ、C末端にc-mycタグを共発現するようなコンストラクトを作製し、それを用いて酵母を形質転換することにより、酵母表面に抗体をscFvとして発現させた。抗原特異的な抗体を発現する酵母の一段目の選択はMACSで行った。集めた酵母を培養した後、FACSによるスクリーニングを行い、完全に抗原特異的な酵母のみを回収した。以上の操作の結果、抗原に対してアフィニティの高いscFvを得ることに成功した。また、脾臓由来と骨髓由来の抗体についての比較検討も行ったので、それについてもあわせて報告する。

M.Nakagawa and T.Azuma : A novel method for preparing rabbit antibody using yeast display system