

2P082

天然タンパク質と人工タンパク質のフォールディングおよび凝集物性

(千葉大院・融合¹, 富山県大・工², 立命館大・薬³)

今村 比呂志¹, 磯貝 泰弘², 加藤 稔³, 森田 剛¹, 西川 恵子¹

Folding and aggregation properties of natural and artificial proteins

(Chiba Univ.¹, Toyama Prefectural Univ.², Ritsumeikan Univ.³)

【序】

タンパク質の天然構造は、生理条件下で最も熱力学的に安定とされ、溶液中で自発的にフォールディング（折り畳み）反応が起こる。立体構造へのフォールディングと安定性は、アミノ酸配列によって規定されているが、その機構は未だ十分に明らかではない。天然にはないアミノ酸配列を持つ人工タンパク質の設計を試み、その物性を評価することは、タンパク質の構造構築原理を知る上で有効なアプローチの一つである。本研究で対象とする人工CroはIsogaiらによって設計・合成され、天然に存在するDNA結合タンパク質λCro（天然Cro）とアミノ酸配列は75%異なっているが、同等の立体構造を持つことが確認されている [1]。立体構造と同様に、人工Croと天然Croのフォールディング物性が同等か調べることは興味深い。本研究では、温度と圧力に対する天然Croと人工Croの二次構造の安定性を赤外分光法を用いて評価した。

【実験】

天然Cro（配列: MEQRITLKDYAMRFGQTKTAKDLGVYQSAINKAIHAGRKIFLTINADGSVYAE EVKDGEVKPFPS）と人工Cro（配列: MRKKLDLKKFVEDKNQEYAARALGLSQKLIEEVLKRGLP VYVETNKDGNIKVYITQDGITQPFPP）は*E. coli*により発現し、逆相HPLCにより精製、凍結乾燥したものをを用いた。タンパク質粉末を、0.1 M NaCl, 0.05 M HEPES-NaOD/D₂O溶媒に溶解し（タンパク質濃度はそれぞれ1.8, 1.4 mM, pD 7.4）、FTIR6100（JASCO）で赤外スペクトルを測定した。高圧装置としてダイヤモンドアンビルセルを用いた。

【結果と考察】

天然 Cro と人工 Cro の FTIR スペクトルにおけるアミド I バンドを観測し、ピークを各二次構造に帰属した (Fig. 1)。アミド I バンドの変化より、天然 Cro が昇温、加圧に伴ってアンフォールディングすることが確認された。また、α-helix 構造とβ-sheet 構造に帰属されるそれぞれのピーク強度の変化をプロットしたところ、天然 Cro のα-helix 構造とβ-sheet 構造のアンフォールディングは協同的であることがわかった。一方人工 Cro の場合、昇温により 1616 cm⁻¹ に新しいピークが現れた。これは分子間β-sheet 構造に由来し、人工 Cro が熱凝集することを示している。この分子間β-sheet 構造は 90 °C まで昇温することにより解離したが、降温すると再び形成した。

人工 Cro の β -sheet 構造は約 400 MPa において消失したが、 α -helix 構造のアンフォールディングにはさらに高い圧力（約 1 GPa）が必要であった。これは人工 Cro の二次構造のアンフォールディングは協同的ではなく、 α -helix が残存し β -sheet が消失した中間体構造が存在することを示している（Fig. 2）。過去の α -helix 型の人工ペプチドの研究を鑑みると [2,3]、加圧による人工 Cro の α -helix のアンフォールディングは、 α -helix を安定化している helix 領域の三次構造の破壊が要因と考えられる。天然 Cro は α -helix 領域と β -sheet 領域の相互作用が強く、二次構造が互いに安定化しているのに比べ、人工 Cro は α -helix 領域と β -sheet 領域の相互作用が弱く、それぞれの二次構造が独立して安定化されていると考えられる。二次構造間の相互作用が十分でないことによる立体構造のゆらぎは、疎水性側鎖の露出を容易にし、蛋白質間相互作用を強めると予想される。当日は X 線小角散乱法を用いた蛋白質間相互作用の評価についても報告する。

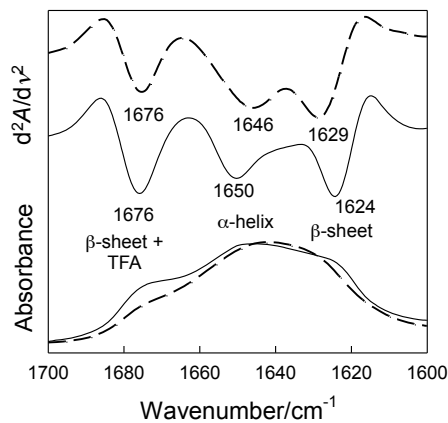


Figure 1. Infrared spectra of the amide I' region of natural Cro (—) and de novo Cro (---). The second derivative spectra are also shown.

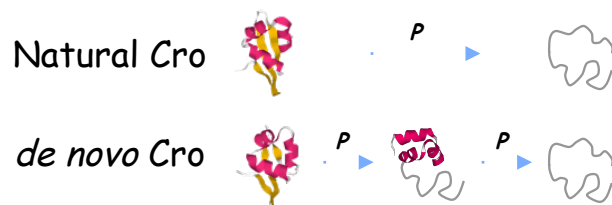


Figure 2. Schematic illustration showing the effect of pressure on the structure of natural Cro and de novo Cro.

[1] Isogai, Y., Ito, Y., Ikeya, T., Shiro, Y., Ota, M. (2005) J. Mol. Biol. 354, 801-814.

[2] Imamura, H., Kato, M. (2009) Proteins 75, 911-918.

[3] Imamura, H., Isogai, Y., Takekiyo, T., Kato, M. (2010) Biochim. Biophys. Acta 1804, 193-198.