

構造変化の時間スケールから見て、変性タンパク質は 均一の状態にあるか

Is the denatured state of protein homogeneous in terms of
the time scale of conformational interconversion.

- 遊佐 光伸¹、野田 康夫¹、橘 秀樹²、瀬川 新一¹
- Mitsunobu Yusa¹、Yasuo Noda¹、Hideki Tachibana²、Shin-ichi Segawa¹
(1関学大・理工、2神戸大・理)

1: School of Science and Technology, Kwansei Gakuin University

2: School of Science, Kobe University

Introduction

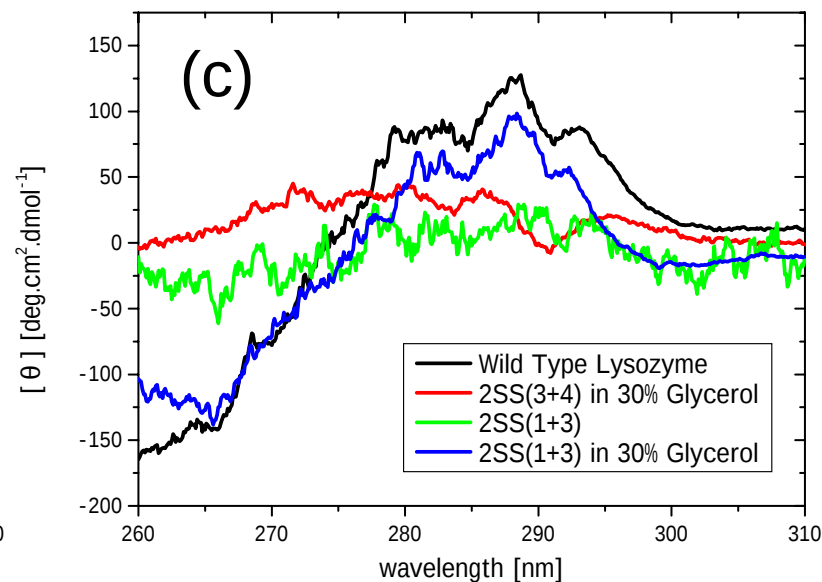
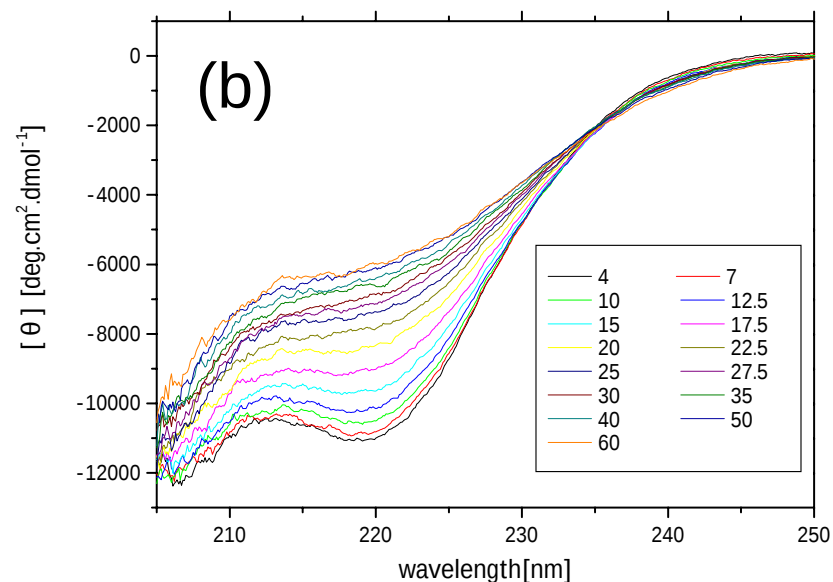
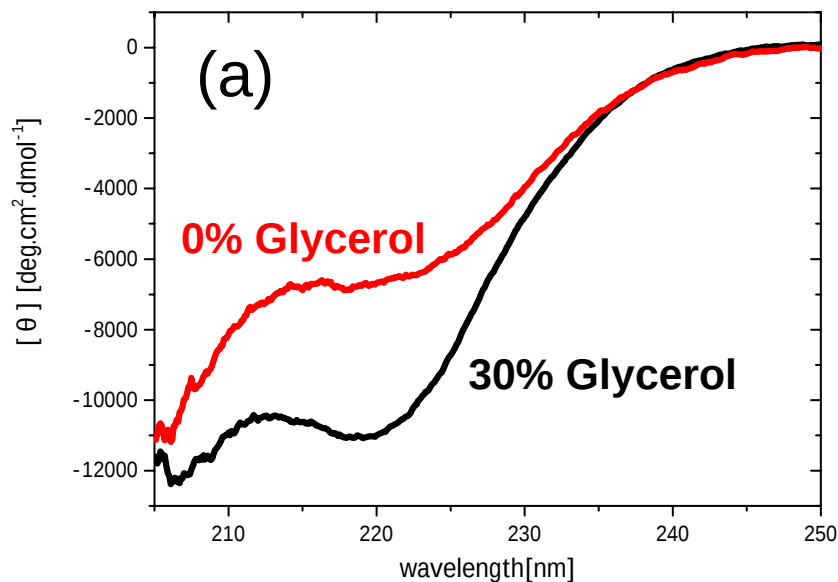
タンパク質の折りたたみ反応を研究するために、S-S結合を欠損させた様々なニワトリ・リゾチームを作製し、NMRによってその構造を残基レベルで解析してきた。S-S結合を欠損させることによって非天然状態になったタンパク質に残る部分秩序構造を、主鎖アミドプロトンのH-D交換反応によって調べてきた。

これまでの研究において、2SS[64-80,76-94]変異体 (2SS(3+4)と略称) はランダムコイルに近い非天然状態であることがCDスペクトルやHSQCスペクトルからわかっている。しかし、30% Glycerolを添加すると2次構造量が顕著に増大することがFar-UV CDスペクトルからわかっている。どの残基領域に変化が生じたのかをH-D交換反応から求まるProtection Factor (P.F.) で解析した。

P.F.は残基54-58領域(特にI55,L56と β 3ストランド)とA、B、CヘリックスのI55 & L56に近接した領域で顕著に増大する。一方 β 1、2ストランド付近の多くの残基において、2つの交換速度があることを見出した。1つは反応初期に素早く交換するものと、もう1つは交換速度の極めて遅いものであった。

原因の一つとして、Glycerol中で分子間の非可逆な凝集体を形成する可能性が考えられる。その可能性を検討するために、CDスペクトルの経時変化を調べたり、またGlycerol濃度の希釈後CDスペクトルが可逆的に元に戻るか実験を行った。その結果、Glycerolによる状態変化が可逆的であることがわかった。また、4M グアニジン塩酸塩 (GuHCl) 溶液中で完全にランダムコイル化した状態から30% Glycerol溶媒条件に変化させてH-D交換反応を追跡する実験を行った。

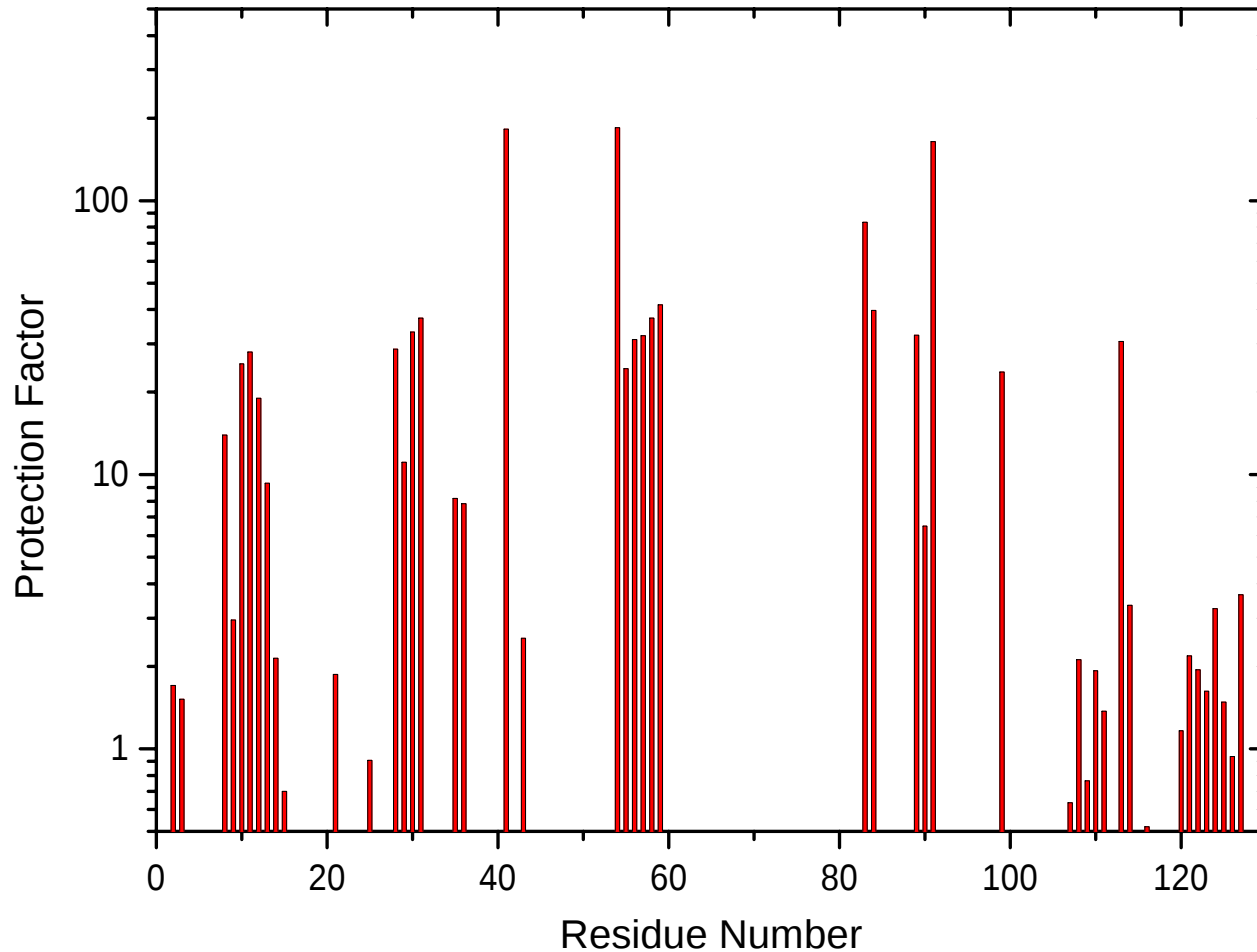
CD spectra of 2SS(3+4) in 30% Glycerol at pH3



- (a) Far-UV CD of 2SS(3+4) at pH 3 and 4
- (b) Far-UV CD of 2SS(3+4) in 30% Glycerol at pH3 and 4
- (c) Near-UV CD of 2SS(3+4), 2SS(1+3), and Wild Type Lysozyme

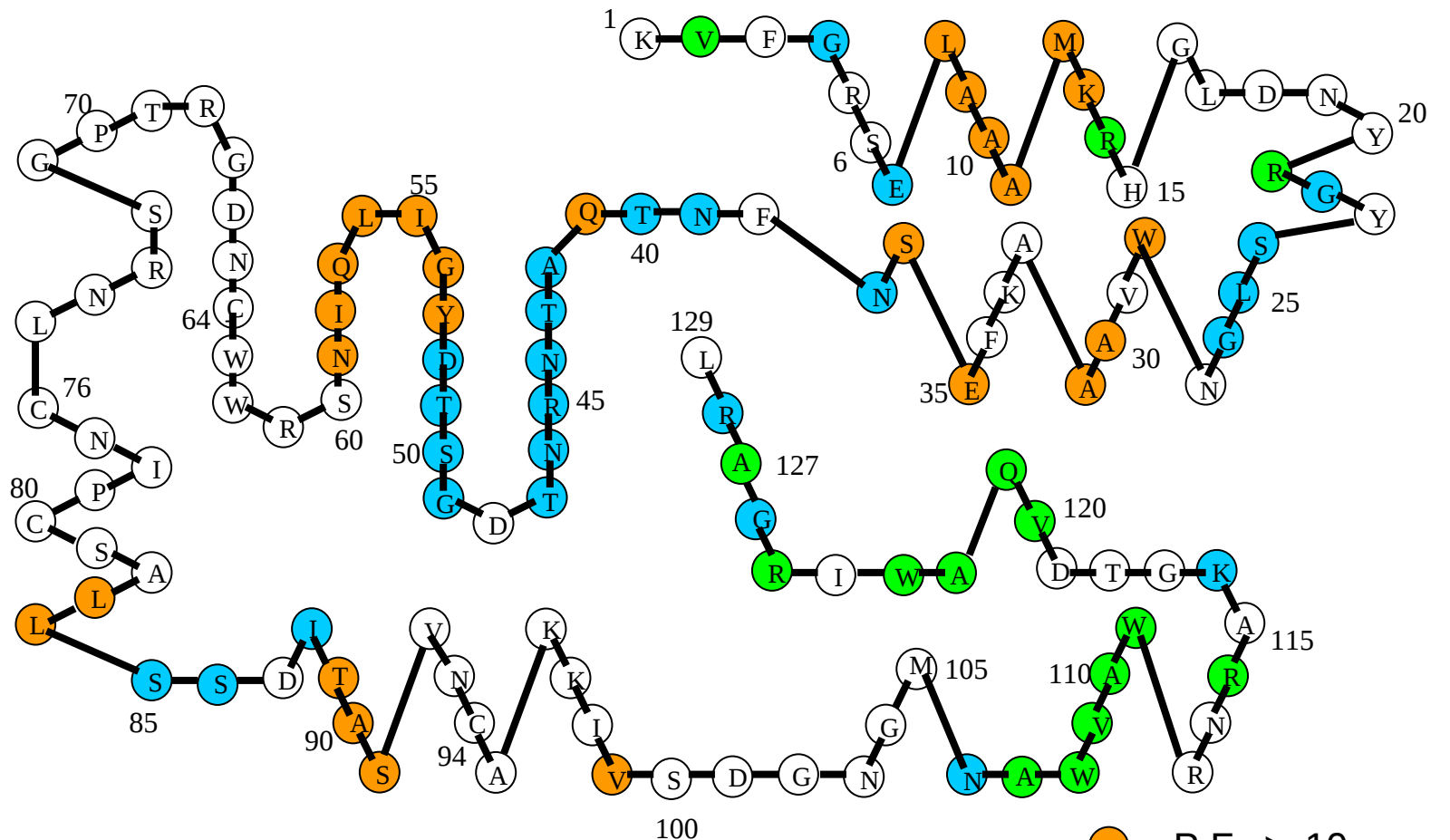
30% Glycerolを2SS(3+4)に加えることによって、2次構造は増加するが、3次構造は変わらない。

Protection factor of 2SS(3+4) in 30% Glycerol at pH 3.0 and 4



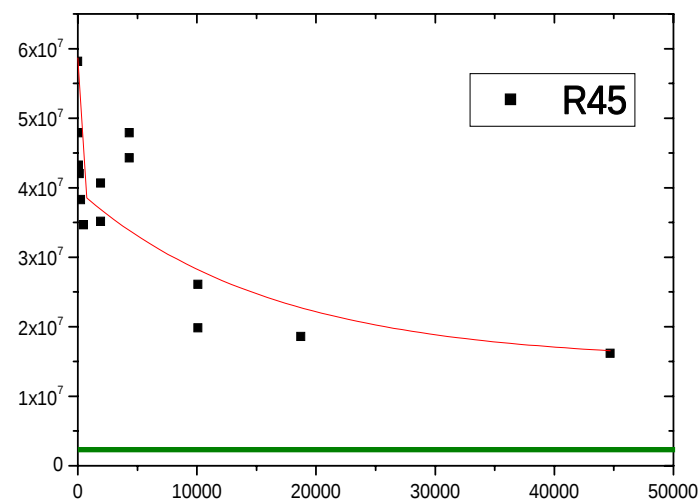
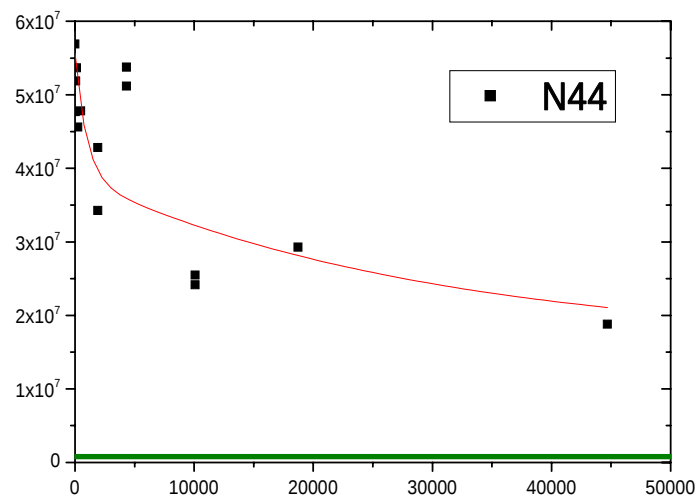
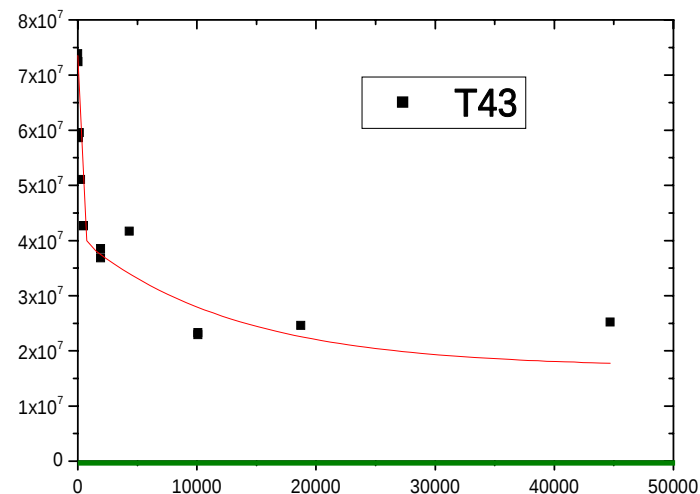
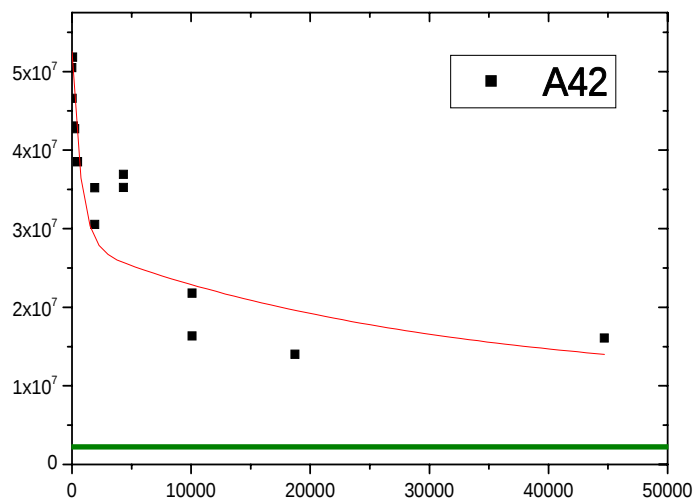
P.F.を求めるためのH-D交換反応の実験方法は後ろのページで示してある。

Correlation between secondary structure and regions where P.F. increased



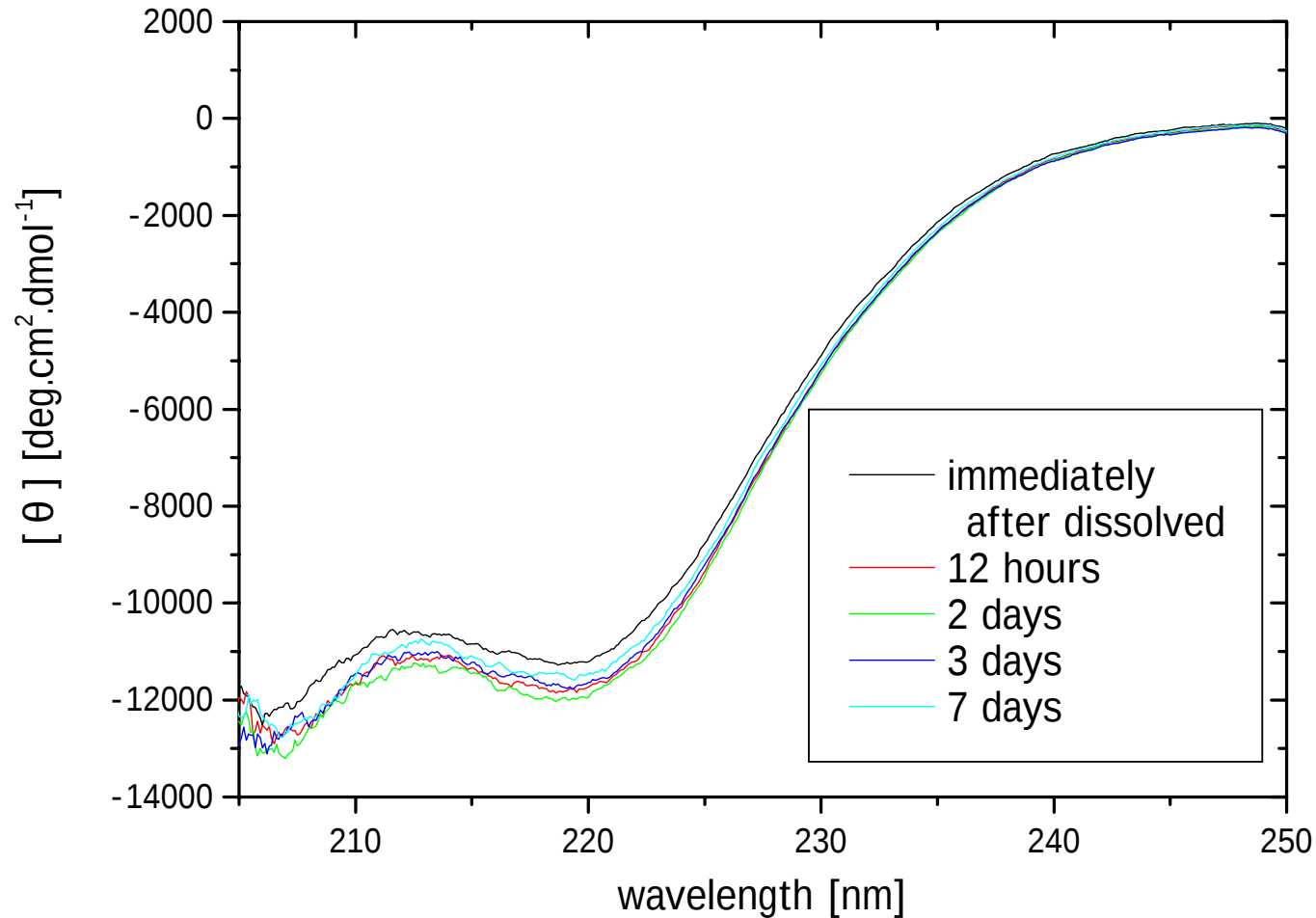
- P.F. > 10
- P.F. = 1
- fast + very slow

Change in peak volumes of HSQC spectra



β 1、2領域残基のピーク体積の反応時間変化を示した。これらは2つの相を持っていて、反応初期の速い相とほとんど変わらない極めて遅い相である。凍結乾燥させたサンプルを溶解後、すぐに反応するものと極めて遅い2種の状態が存在していると考えられる。

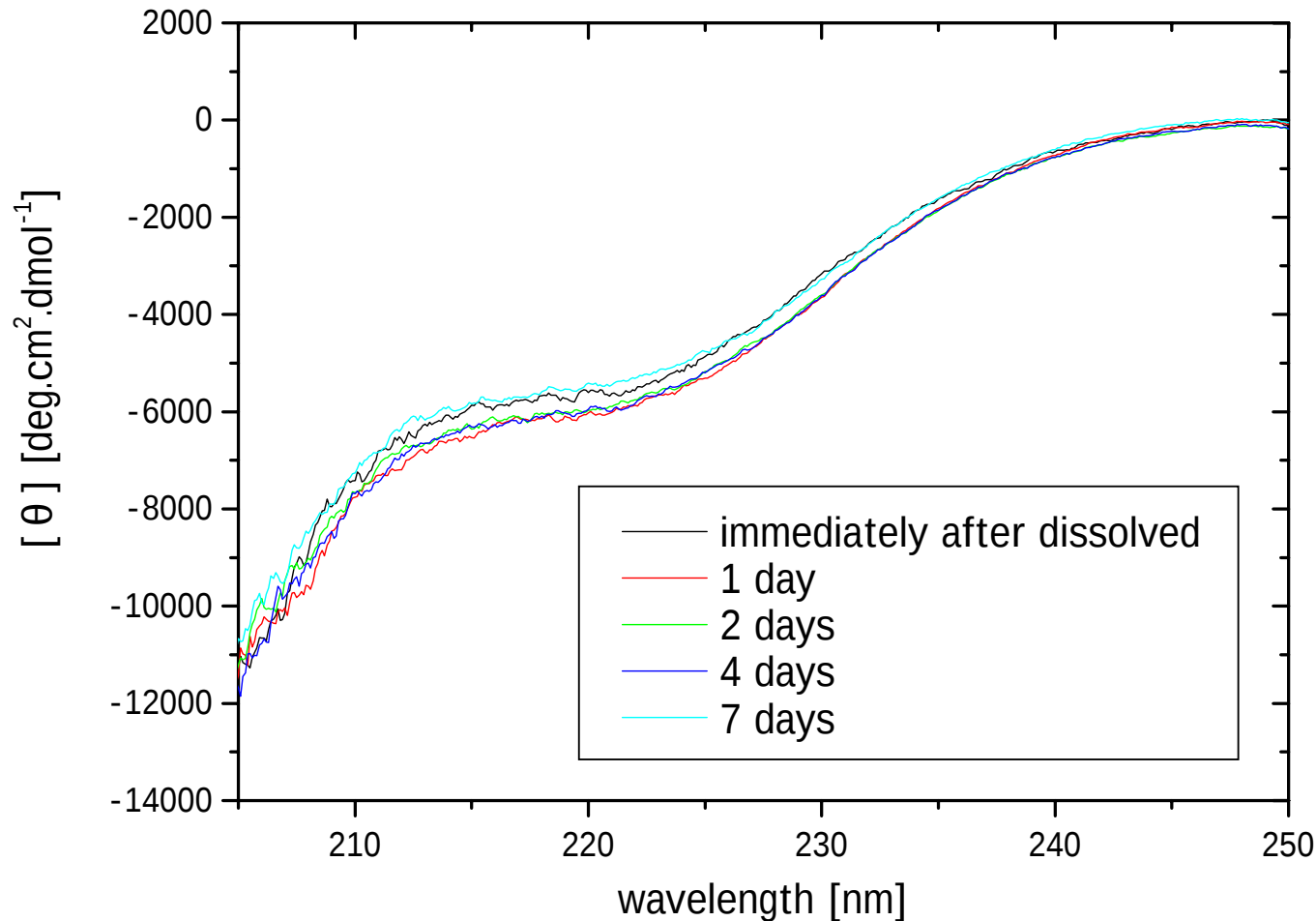
(A) Time course of the state forms partially ordered structure



Time course of 2SS(3+4) in 30% Glycerol at pH 3 and 4 monitored by Far-UV spectrum.

7日経過してもスペクトルはほとんど変わっていない。この条件下で構造に大きな変化は現れていない。

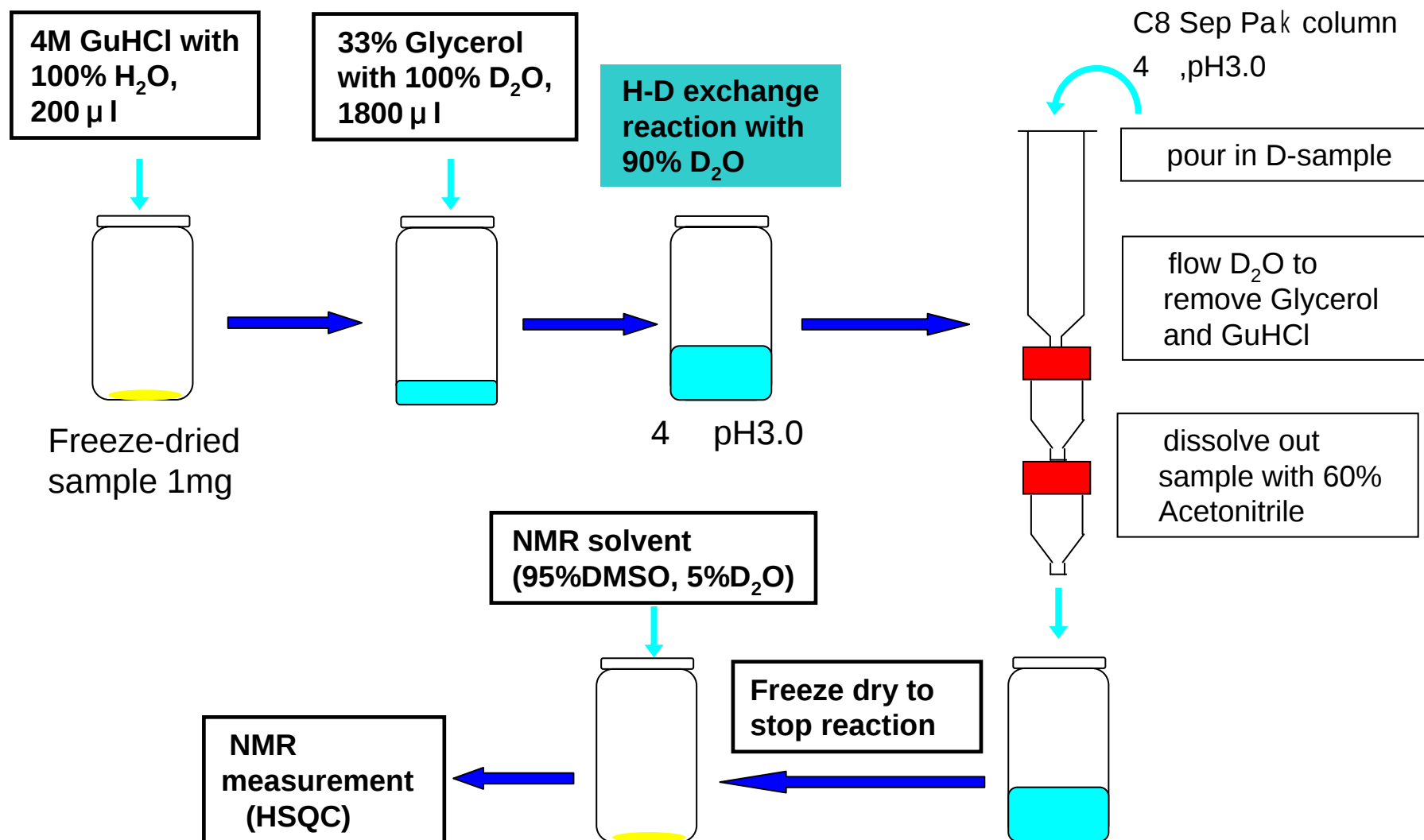
(B) Reversibility of form partially ordered structure



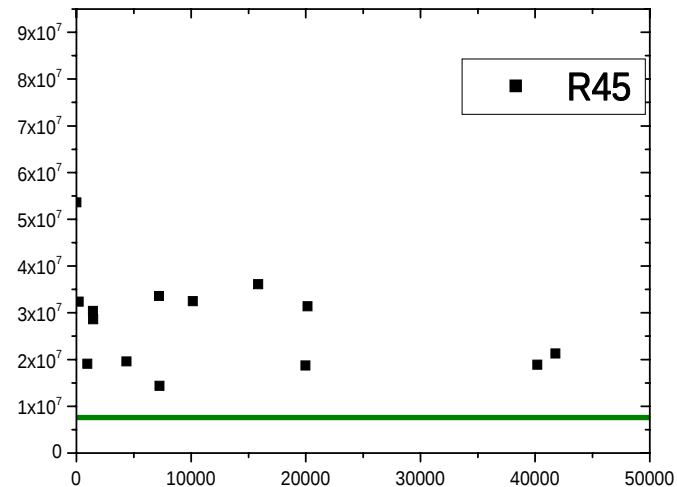
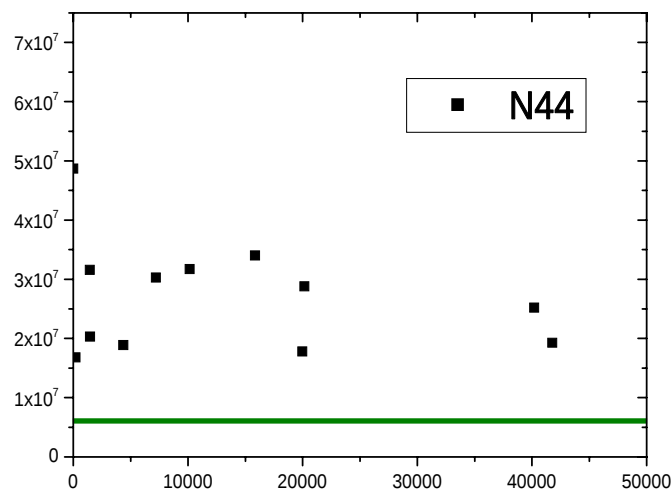
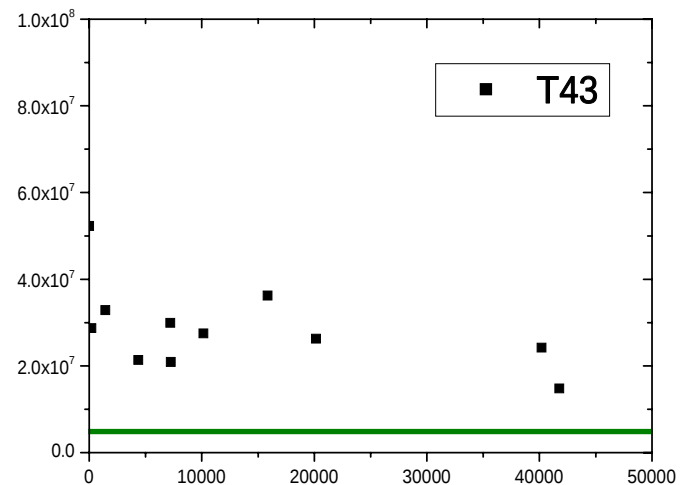
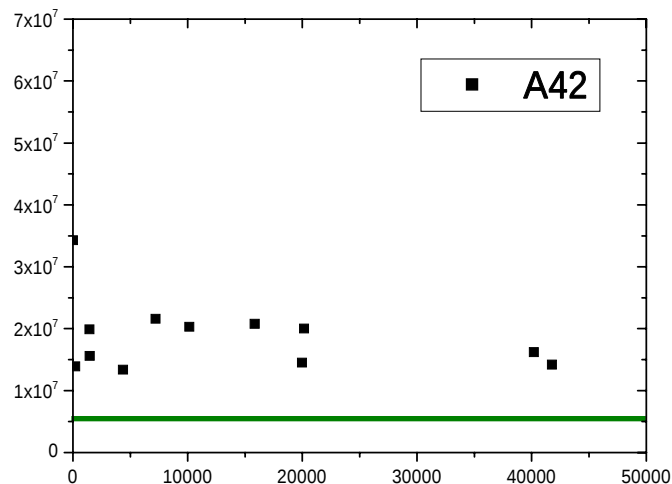
2SS(3+4) was initially dissolved in 30% Glycerol at pH3 and 4. After several days, this sample solution was diluted in concentrations of Glycerol and protein by adding buffer solution. Then Far-UV CD spectra were measured.

長時間30%Glycerol中に置いても、希釈することによってCDスペクトルは元のGlycerolのない状態に可逆的に戻る。つまり、30%Glycerol中で生じているj状態変化は可逆的な分子内反応であると考えられる。

Material and Method of H-D exchange reaction

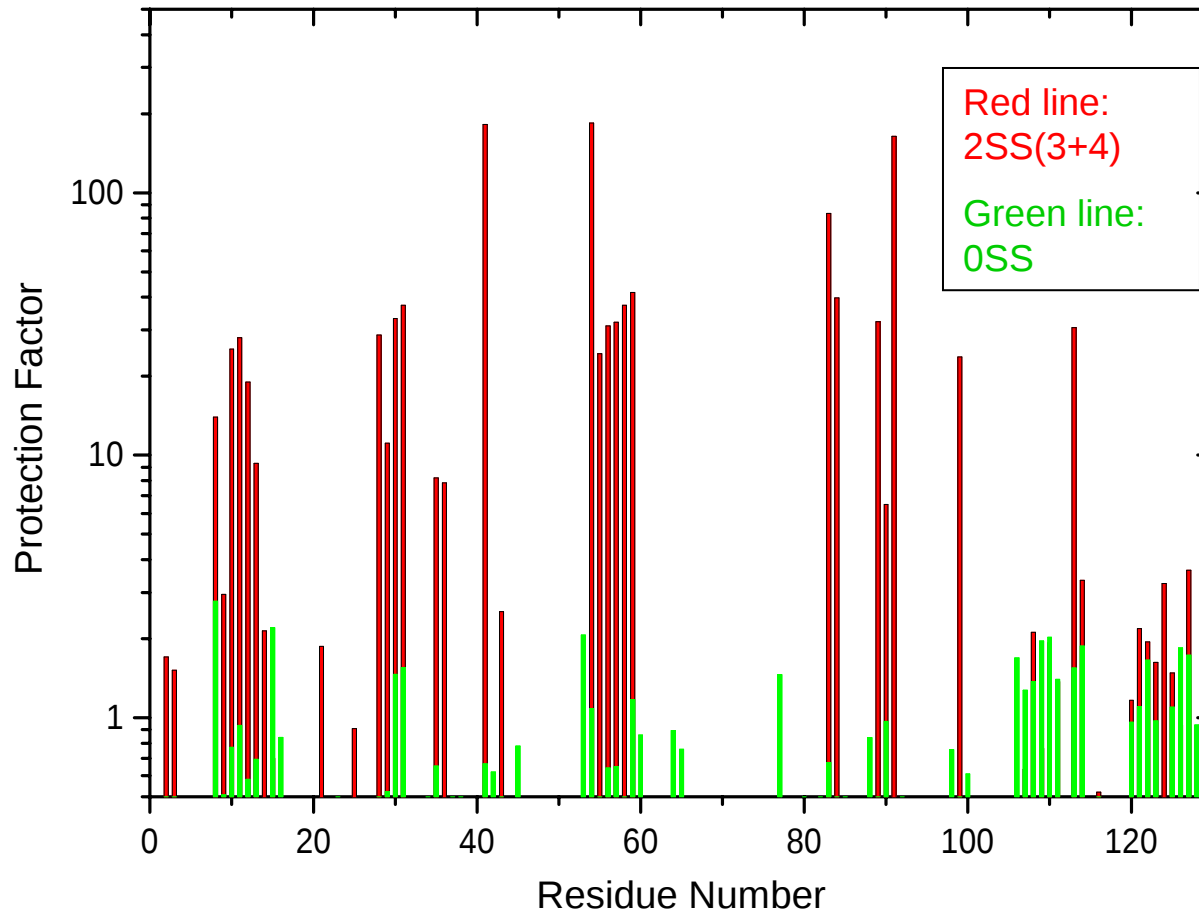


Change in peak volume of HSQC spectra



β 1、2領域残基のピーク体積の反応時間変化を示した。4 M GuHClでランダムコイル化したサンプルでも、30% Glycerol状態にすると遅い交換反応相が依然観測され、2つの分子状態が存在している。

Difference in protection factors between 2SS(3+4) and 0SS-variants



0SS変異体ではP.F.がほとんど1.0であった。Glycerolの効果はほとんどない。それに対して、2SS(3+4)変異体では、I55、L56の周りとA、BヘリックスのP.F.が大きく増大している。B3₁₀ヘリックスからCヘリックスのN端領域もP.F.が増大している。