The Biophysical Society of Japan General Incorporated Association

2A1645

超好熱菌トリプトファン合成酵素のサブユニット間相互作用と触媒機能

○小笠原 京子[1]、石田 真巳[2]、油谷 克英[1]（[1]阪大蛋白研、[2]東京水産大学）

バクテリアのトリプトファン合成酵素のαとβサブユニットはそれぞれ独自の触媒機能を有している。両サブユニットは四量体($\alpha_2\beta_2$)の複合体を形成したとき、それぞれのサブユニットの触媒活性は、約2桁増幅される。本研究では超好熱菌 *P. furiosus* 由来の同酵素(*Pf*TSase)の活性増幅機構ならびに温度適応機構を明らかにするために、αとβサブユニット間相互作用の熱力学的特性を求めた。まず、分析用超遠心分析法とゲル濾過法で *Pf*TSase の分子集合状態を調べたところ、大腸菌酵素(*Ec*TSase)と同様に4量体を形成することが分かった。過剰の *Pf*TSase αサブユニット存在下、pH 7.0, 40 °Cにおける *Pf*TSase βサブユニットの比活性は *Ec*TSase の4％であった。しかし、*Pf*TSase βサブユニットの活性は温度の上昇に伴って高くなった。αとβサブユニット間の相互作用に伴う熱量変化は、いろいろな温度で等温滴定型カロリメータ（OMEGA, MicroCal）を用いて測定した。pH 7.0, 40 °Cにおける *Pf*TSase の両サブユニット間相互作用の熱力学的パラメターは、β/α結合数:1.1、結合定数:1.6×10^8 M^{-1}、エンタルピー変化: -5.7 kcal/mol であった。これらの値を *Ec*TSase のものと比較すると、*Pf*TSase の結合定数は *Ec*TSase より2桁高く、エンタルピー変化は約1/5である。このことは、40 °Cにおいて *Pf*TSase の触媒活性は著しく低いけれども、αとβサブユニットの親和性は、*Ec*TSase よりも高いことを示している。*Pf*TSase の触媒機能の高温適応特性をサブユニット間相互作用の熱力学特性と関連させて討論する。

K. Ogasahara, M. Ishida, and K. Yutani : Subunit-subunit interaction of tryptophan synthase from hyperthermophile

2A1700

ポルフィリン集積型タンパク質の連続的な会合の解析

○牛山 正人、山村 剛士（東京理科大・理）

光合成活性中心，光捕獲アンテナ系，チトクロム c3 などのタンパク質において，ポルフィリン（クロロフィル）の近接した集積状態は機能中心としての重要な性質であると考えられている。このようなタンパク質を新規あるいは再設計するとき，ポルフィリンの集積能力は基本的な性質であるがその評価方法には確立されたものがない。我々は新規に構築した12ポルフィリン集積タンパク質について，スペクトルに基づく会合解析を行い熱力学的諸量を導出した。

新規合成タンパク質 $(PepA_{18})_4$-ZnTAPP (**A**)は，亜鉛ポルフィリン (ZnTAPP) と4つの18残基ペプチド ($PepA_{18}$) からなり8個の His を含んでいる。**A** とヘミン (**B**) の会合の様子を UV-visible 吸収スペクトル，CD スペクトル，超遠心沈降平衡，EPR で調べた結果，3個の**A** と9個の**B** からなる12ポルフィリン集積系 ($\mathbf{A_3B_9}$) の形成が明らかとなった。また**B** の会合様式から**A-B** 間に5つの連続的な平衡からなる平衡式 (**1**)： $(3/2)\mathbf{A_2} = \mathbf{A_3B} = \mathbf{A_3B_3} = \mathbf{A_3B_5} = \mathbf{A_3B_7} = \mathbf{A_3B_9}$ が導かれた。吸収スペクトル，CD スペクトルの温度変化測定によると **A-B** は温度に依存して (**1**) 式に従う結合・解離を示した。

この**A-B** 系におけるポルフィリンの集積能力を平衡式 (**1**) を使って解析した。滴定結果（吸収スペクトル，CD スペクトル）の解析から，5つの平衡定数 (K_i; i = 1 - 5) と各会合種のスペクトルを求めた。熱平衡解析では (**1**) 式で示される多状態遷移を各2状態遷移によって扱う必要がある。そこで平衡解析によって得られたスペクトルを用いて温度変化スペクトルの成分分解を行い，各会合種の濃度から各平衡定数の温度依存性 ($K_i(T)$; i = 1 - 5) を求め，次いで各平衡に対する熱力学的諸量 (ΔH_i, ΔS_i; i = 1 - 5) を算出した。本解析方法は会合種のスペクトルの差異を用いたもので，ポルフィリンのような色素の集積系の解析に有効であると考えられる。

M. Ushiyama and T. Yamamura : Analysis of successive binding of multiple porphyrins to proteins

2A1715

カルボニックアンヒドラーゼBとDMPCリポソームとの相互作用

○坂井 寛子、田中 美千子、今井 賢一郎、園山 正史、美宅 成樹（東京農工大・工・生命工）

水溶性タンパク質のモルテングロビュール (Molten Globule = MG) 状態のなかには脂質膜と相互作用するものがあり、特にタンパク質立体構造との関係からさまざまな研究が行われている。相互作用によって脂質膜のほうにあらわれる変化はよく知られていなかったが、私達は膜の動的構造変化をとらえることができる超音波測定が、タンパク質－脂質相互作用の研究に有効な手段であることを示してきた。

これまで水溶性タンパク質α-ラクトアルブミン (α-LA) と中性リン脂質ジミリストイルフォスファチジルコリン (dimyristoylphosphatidylcholine = DMPC) との相互作用について研究し、α-LA は DMPC リポソームを破壊し DMPC 二重層膜の構造ゆらぎを大きくするような強い相互作用をすることを示してきた。そこで本研究では水溶性タンパク質のウシカルボニックアンヒドラーゼ B (Carbonic Anhydrase B = CAB) を用い、DMPC との相互作用を検討した。

CAB は、蛍光プローブであるピレンの蛍光測定により、等電点近傍の pH 領域でモルテングロビュール状態を形成することがわかった。また、この pH 領域は CAB 同士で凝集しやすい状態であることが認められた。脂質膜と混合すると、超音波音速が減少するなどの超音波物性の変化が等電点付近の pH 領域 (pH 3.6 近傍) でのみみられた。このとき相互作用しており、膜が柔らかくなるなど脂質膜物性が変化することが示唆された。しかし α-LA の場合と異なり CAB は脂質膜を破壊しないことから相互作用機構は異なっていると考えられる。

H. Sakai, M. Tanaka, K. Imai, M. Sonoyama and S. Mitaku : Interaction between Bovine Carbonic Anhydrase B and DMPC Liposomes

2C1315

好熱菌 F1-ATPase $\alpha 3\beta 3\gamma\varepsilon$ 複合体の結晶化

○白木原 康雄[1]、鈴木 俊治[2]、白鳥 綾[1]、白木原 千佳子[1]、吉田 賢右[2]（[1]遺伝研、[2]東工大生命理学）

F1ATPase（F1：サブユニット組成 $\alpha 3\beta 3\gamma\varepsilon$）は、呼吸鎖が形成する膜を隔てた水素イオンの濃度差を ATP に変換する ATP 合成酵素の膜から突き出した部分である．私たちは回転触媒機構の詳細を知る目的で、γサブユニットを含む $\alpha 3\beta 3\gamma$ 複合体より上位の部分複合体の種々のヌクレオチド存在下での結晶化実験を行っている。今年度は、昨年度報告した $\alpha 3\beta 3\gamma$ 複合体の結晶よりも優れた結晶を与える $\alpha 3\beta 3\gamma\varepsilon$ 複合体の結晶化実験について報告する。

$\alpha 3\beta 3\gamma\varepsilon$ 複合体は大腸菌の大量生産系を用い、3種のカラムと極めて制御された熱処理によって高度に純化することができた（鈴木、未発表）。初期の実験で $\alpha 3\beta 3\gamma\varepsilon$ 複合体は $\alpha 3\beta 3\gamma$ 複合体の結晶化条件 (10%PEG6K,0.2MNaCl,pH6.6,0.5mMADP,25 度) で結晶になることがわかった。これを起点として最適結晶化条件の探索を行ったところ、pH に関しては 8、ATP,ADP などの各種のヌクレオチドが 0mM-5mM 存在しても結晶化する、Mg イオンはない方が良い、クライオプロテクタント（20%エチレングリコール）の導入は結晶化時に行う必要がある、ことがわかった．

現在 0.5mMADP 存在下でできた結晶を中心に解析を進めている。0.2x0.2x0.1mm 程度の中程度の大きさの結晶を液体プロパンで凍結後、100K の窒素ガスの on/off アニールにより、実験室では 7 Å分解能の反射を記録できる。この結晶を用いて、Spring8/阪大蛋白研ビームライン (BL44XU) では 4.5 Å分解能のデータを収集できた。格子定数は 225.3,225.7,224.6 Å,94.1,117.5,117.8 度 (P1) と決定された。単位格子中に 422 の回転対称で配置している 8 個の $\alpha 3\beta 3\gamma\varepsilon$ 複合体が存在する。分子置換法による解析が進行中である。

Y. Shirakihara, T. Suzuki, A. Shiratori, C. Shirakihara, & M.Yoshida : : Crystallization of F1-ATPase alpha3-beta3-gamma-delta subassembly

NII-Electronic Library Service