

提出日：平成 28 年 5 月 16 日

平成 27 年度 大阪大学蛋白質研究所 拠点事業

(2) 研究成果の概要

課題名	蛋白質の高エネルギー状態の立体構造解析		
研究代表者	氏名	北原亮	
	所属機関名・部局名	立命館大学・薬学部	
	職名	准教授	
事業名 (該当の事業名の右欄に○)		<input type="checkbox"/>	共同研究員
		<input type="checkbox"/>	国際共同研究課題
		<input checked="" type="checkbox"/>	超高磁場NMR 共同利用研究課題
		<input type="checkbox"/>	客員フェロー
蛋白研受入担当教員名	藤原敏道		
<p>高圧力 NMR 法と高圧力蛍光法を用いてタンパク質の変性中間体についての構造研究を行った。高圧、低温、酸性条件下でユビキチンの局所変性状態の構造研究を行った。特定の領域の構造揺らぎのために NMR 信号の顕著な減弱がみられた。原子間距離情報を収集するために、ユビキチンの一部にシステイン変異を施し、常磁性プローブ MTSL (<i>S</i>-(1-oxyl-2,2,5,5-tetramethyl-2,5-dihydro-1H-pyrrol-3-yl)methyl methanesulfonothioate)を化学結合させ、常磁性緩和促進(PRE)により常磁性プローブと他の領域との距離情報を得た。NOE と PRE に基づく原子間距離情報、主鎖二面角情報を用いて、立体構造計算プログラム CYANA により、局所変性状態の立体構造決定を行った。報告時点では、構造精密化段階である。</p> <p>また局所変性状態の主鎖ダイナミクスを研究するために、¹⁵N 核のスピン緩和測定 (T_1, T_2, hNOE)を行った。NMR 信号が顕著に減弱する残基では、スピン緩和解析が不可能であった。一部の領域では、加圧により横緩和速度定数 R_2 値 ($=1/T_2$)の増加が観測されたことから、NMR 化学シフトタイムスケール (=ミリ秒) での構造揺らぎの存在が示唆された。いっぽう、ピコ秒-ナノ秒スケールでの構造揺らぎを強く反映する縦緩和速度定数 R_1($=1/T_1$)や hNOE については、最安定状態と局所変性状態で明確な変化が見られなかった。この結果は、局所変性状態においては、NMR 信号の著しい減弱を示した領域を除いては、二次構造に大きな変化が生じていないことを示唆する。</p> <p>トリプトファン蛍光をプローブとして 0.1-500 MPa の範囲で高圧力蛍光測定を行った。野生型 OspA の 25 °Cにおいて、0.1-500 MPa で蛍光強度や最大蛍光波長にシグモイド状の変化が観測された。高圧力蛍光と高圧力 NMR による結果から、トリプトファンを含む領域で水和が進んだ変性中間体に転移したものと判断した。構造転移に伴うギブズエネルギー変化 (ΔG)と部分モル体積変化 (ΔV)を算出した。</p>			

※本様式は、“拠点事業成果報告”として、拠点ホームページにて公開させていただく予定です。

※必ず A4 用紙 1 枚におさめて下さい。 ※提出期限：平成 28 年 5 月 20 日 (金) ※提出の際は PDF 変換して下さい。

※提出先：大阪大学蛋白質研究所拠点プロジェクト班 E-mail: tanpakuken-kyoten@office.osaka-u.ac.jp