

タンパク質解析法 1

タンパク質の四次構造解析

～ゲルろ過クロマトグラフィーによる分析～

(タンパク質の構造と解析法)

タンパク質の構造階層としては一次、二次、三次および四次構造があり、このうち一次構造解析法としてはエドマン分解によるアミノ酸配列決定がよく用いられる。二次構造解析法としては円偏光二色性(CD)スペクトルや赤外吸収(IR)スペクトルなどが用いられる。三次構造解析法は、構造変化を追跡する方法として先述の蛍光スペクトルや吸収スペクトルが、三次元立体構造決定法としてはX線結晶構造解析や核磁気共鳴(NMR)などがある。さらにサブユニットを有するタンパク質については、四次構造を検討する必要がある、その解析法としては、ゲルろ過クロマトグラフィー、超遠心法、電気泳動法などがある。ここでは、ゲルろ過クロマトグラフィーと電気泳動による四次構造解析を二回にわたり行う。

(カラムクロマトグラフィー)

タンパク質のクロマトグラフィーは、担体とそれを貫流する水溶液との間の物質（タンパク質を含む）のやりとりとして展開される。担体は一般的に水不溶性の粒状の固体であり、円筒状の管に充填される（固定相）。この担体の間隙は水溶液で満たされ、タンパク質などの物質を含む溶液（移動相）がこの担体を貫流する。この固定相と移動相からなる円筒をカラムという。担体としてはいろいろな性質を持ったものが用いられ、目的タンパク質の性質にあった担体やクロマトグラフィーを選択する。カラムを用いたクロマトグラフィーとしては、下記のようなクロマトグラフィーがある。

(1)イオン交換（陽イオン、陰イオン）クロマトグラフィー

担体に荷電基が結合しており、タンパク質の電荷の差を利用して分離・溶出する。

(2)ゲルろ過（分子ふるい）クロマトグラフィー

タンパク質の分子量の差を利用して分離・溶出する。

(3)アフィニティークロマトグラフィー

特定の物質（リガンド）とタンパク質の特異的な結合を利用して分離・溶出する。

（渡部先生の実験：GST アフィニティークロマトグラフィー）

(4)疎水性クロマトグラフィー

タンパク質の疎水性相互作用の差を利用して分離・溶出する。

(5)逆相クロマトグラフィー

疎水性の差を利用して分離する。疎水性物質も分離することができる。

(5)その他

これらのクロマトグラフィーは、細胞抽出液から目的のタンパク質を分離する（精製する）際に用いられるが、このうち (2)ゲルろ過クロマトグラフィーは、タンパク質の分子量を決定する（分析する）際にも利用される。本実験では、ゲルろ過クロマトグラフィーを用いて、目的タンパク質の分子量を決定し、知られているポリペプチド鎖の分子量からその四次構造を推定する。

(ゲルろ過クロマトグラフィーについて)

ゲルろ過クロマトグラフィー(Gel filtration chromatography)は、サイズ排除クロマトグラフィー(Size exclusion chromatography(SEC))とも言われ、多孔性の不活性粒子(ゲル)を固定相として用い、種々の大きさのストークス半径を持つタンパク質分子を含む溶液を試料として添加し、さらに移動相を低速で流す。ゲルの穴のサイズより大きな分子はゲル穴に入ることができないため、ゲル粒子の間を通り抜けていく。一方、小さな分子はゲル穴に入り込み、溶媒の速度より遅れて移動する。このとき、より分子量の小さな分子ほどゲル穴に入り込む確率が高くなる(図1)。一般的に、カラムの長さが増すほど分離能が高くなり、流速が早いほど分離能は悪くなる。このゲルろ過クロマトグラフィーでは、タンパク質の溶出体積(タンパク質がカラムから溶出するのに要した溶媒の体積)とタンパク質の分子量は相関があり(図2)、分子量既知のタンパク質の溶出体積から、未知試料の分子量を推定することができる。ここで得られる分子量はタンパク質の四次構造の分子量であり、サブユニット個々の分子量ではない。ただし、タンパク質試料を変性後、このゲルろ過クロマトグラフィーを用いてサブユニット組成などを調べることもできる。また、種々の温度や pH などにおける四次構造組成(状態)の変化なども検出・分析することが可能である。

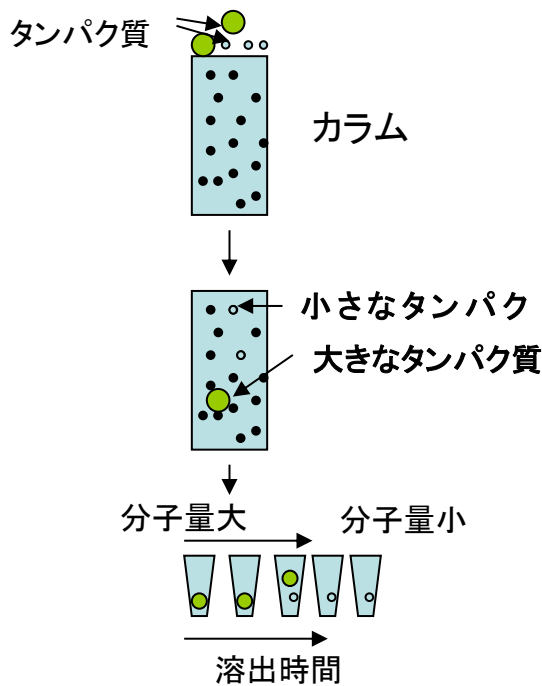


図1 ゲルろ過クロマトグラフィー概念図

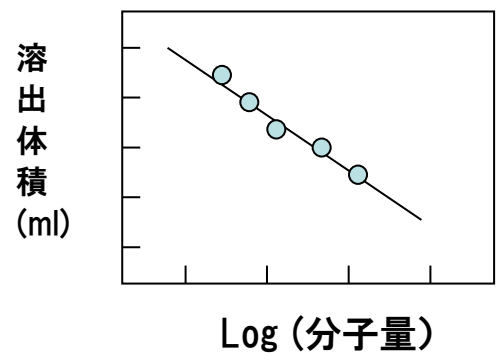


図2 溶出体積と分子量の関係

(高速液体クロマトグラフィー(HPLC)と中圧液体クロマトグラフィー(FPLC))
カラムクロマトグラフィーを再現・精度よく行うためには、溶媒の流速やカラムにかかる圧力など実施条件を制御するなんらかのシステムが必要となる。カラムクロマトグラフィーにおいて、タンパク質の分離や分析によく用いられるのが HPLC(High performance or pressure liquid chromatography: 高速液体クロマトグラフィー)および FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography: 中圧液体クロマトグラフィー)である。前者は高压、高流速条件下でクロマトグラフィーを行うことが可能であり、分離のほか分析にも用いられる。一方、後者はタンパク質の分離専用に開発されたシステムで、流速や圧力をより穏やかな条件(中圧)に制御してクロマトグラフィーを行うため、タンパク質の変性を避けやすい特徴がある。基本的なシステムはある程度共通している(下図)が、使用されるカラ

ムの特性が異なる。HPLC は高压に耐えられるように、担体の固相内核酸距離を短くしたり、充填剤を球形にしてかつ粒子径を小さく均一にするなどの工夫がなされている。基本的に HPLC や FPLC に用いられるカラムは既に一定条件で担体が充填されたもの（プレパックカラム）を用いることが多い。それに対し、筒に軟性担体（ゲル）を使用者が充填し、HPLC や FPLC などの制御システムを用いない（静水圧のみ）カラムはオープンカラムといわれる。

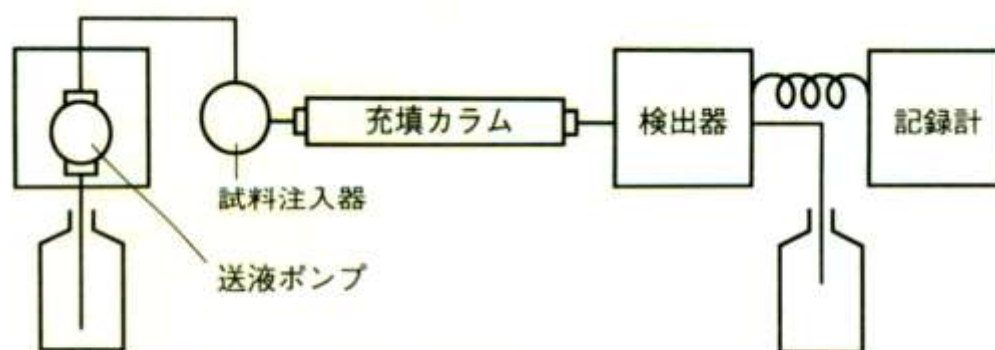


図 1・1 HPLC の基本的な装置構成図

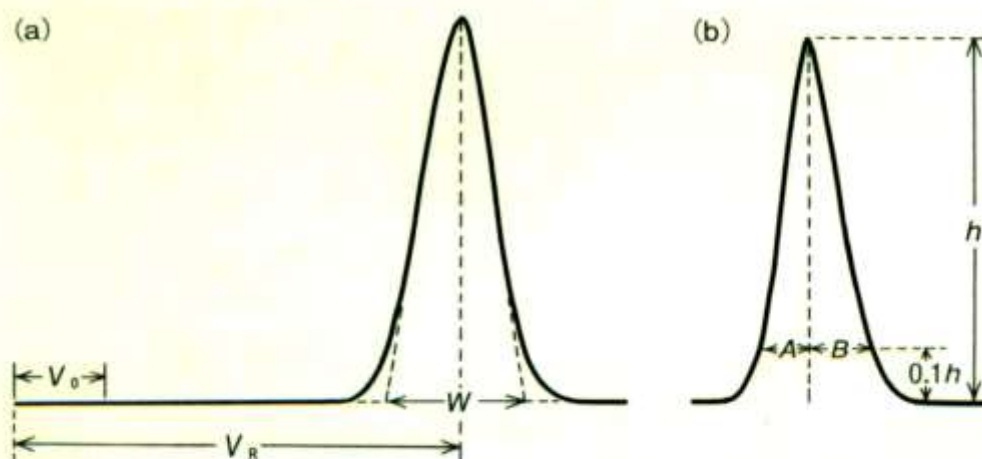


図 1・2 典型的なクロマトグラム。(a) 理想的なクロマトグラム、
(b) 非対称のクロマトグラム。

(実験)

酵素試料の四次構造を HPLC を用いて分析し、そのクロマトグラムを元に分子量を推定する。

(試薬・器具)

- (1) 0.1M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.6)
- (2) タンパク質試料 (0.1mg/ml)
- (3) HPLC システム (東ソー)、カラム : TSK-gel G3000SWXL 分画分子量 5000~500000

(実施)

(1)条件を担当者の指示に従い、設定する。

(2)標準タンパク質（分子量既知）を HPLC に接続したカラムに注入（injection）し、得られたクロマトグラムから検量線を作成する。

→横軸に $\log(\text{分子量})$ 、縦軸に溶出体積(ml)をプロットし、直線性の得られる分子量範囲について直線式を求める。

(3)試料を 0.1mg/ml に調製し、その 50ul~100ul を HPLC に接続したカラムに注入(injection)する。

(4)得られたクロマトグラムより、溶出体積を算出する。また、複数のピークが観察された場合には、その各々について溶出体積を算出する。溶出体積を(2)で求めた検量線の式に代入し、この試料の分子量を算出する。

(5)複数のピークが得られた場合には、各々の分子量を求める。また、ピークのエリア面積の比率から、各成分の組成比を算出する。

(6) 試料の四次構造（サブユニット組成）を推定する。

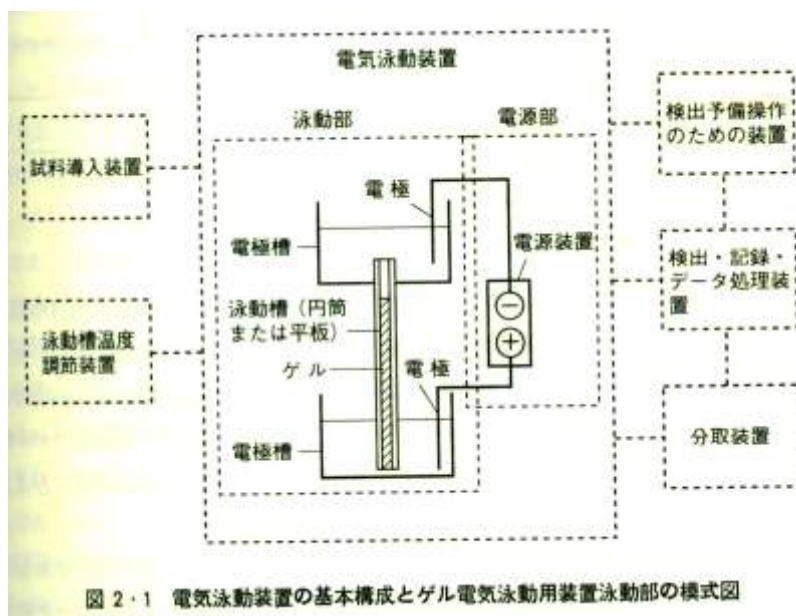
タンパク質解析法 2

タンパク質の四次構造解析

～電気泳動と画像解析～

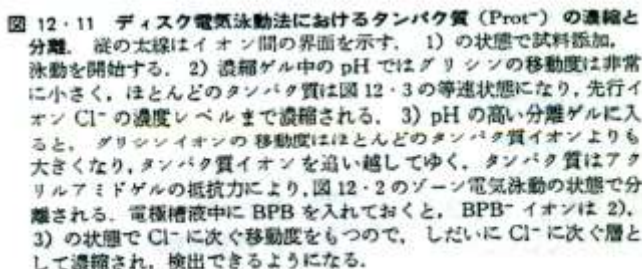
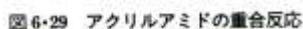
(電気泳動について)

電気泳動は、「電荷をもつ物質あるいは分子（イオン）を電場に置くと、その電荷と反対符号の電極方向に移動をはじめる」現象である。電気泳動法は、このときの移動速度の違いを利用してイオンを分離・分析しようという方法である。電気泳動には(1)ゲル電気泳動、(2)溶液電気泳動、(3)酢酸セルロース電気泳動、(4)キャピラリー電気泳動などの装置があり、それぞれ用途に応じて用いられる（下図）。電気泳動は、核酸やタンパク質など電荷を有する分子に適用されるが、電気泳動を行う目的は次のようなものがあげられる。(1)あるタンパク質の精製の程度（純度）を調べる。(2)部分配列決定のためにタンパク質を分離・精製する（普通の精製が困難な場合）。(3)タンパク質を同定するため、等電点、分子量、特異反応（酵素反応、抗体との反応）を調べる。(4)タンパク質の含量を定量する。(5)各細胞内タンパク質の発現変化の追跡など。ここでは電気泳動による応用例として、四次構造解析を電気泳動法(Native-PAGE, SDS-PAGE)により行い、先のゲルろ過クロマトグラフィーによる結果と対比して、考察を加える。



(ポリアクリルアミド・ゲル電気泳動(Native-PAGE) と SDS ポリアクリルアミド・ゲル電気泳動(SDS-PAGE))

支持体としてポリアクリルアミド・ゲル（下図）を用い、未変性条件下でタンパク質を電気泳動させる方法として、Davis と Ornstein らはディスクゲル電気泳動を開発した。この方法は図 2 に示した原理により、タンパク質を濃縮させながら、タンパク質の分子量と電荷により分離・電気泳動する方法である。サブユニットを有するタンパク質の場合、天然の四次構造を保ったまま泳動され、中性・酸性タンパク質ではある分子量範囲においては、



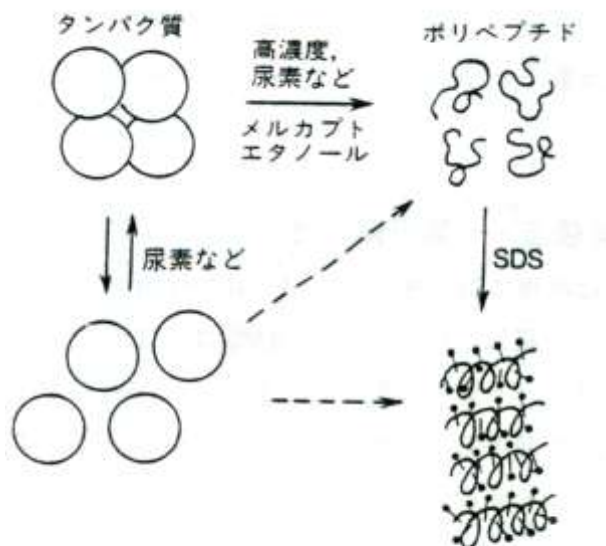


図 12・7 タンパク質の各種処理と構造変化¹⁾

(画像解析について)

電気泳動終了後、CBB 染色、酢酸-メタノール（エタノール）脱色を経て、ゲル内のタンパク質のみが染色される。得られたゲルから直接移動度を測定してもよいが、画像として PC に取り込み、そのバンド強度を数値化することによりグラフ化するほうが便利であり、精度も高い。電気泳動ゲルなどをスキャナーで取り込み、画像を bitmap, jpeg, TIFF など形式で保存することにより、データ保存はもとより画像解析やプレゼンテーションなど多方面への利用が可能となる。ここでは、フリーソフトである Scion image を用いて、泳動終了後のゲルの解析を行う。

(実験)

①Native-PAGE ゲルの作製と電気泳動

各試薬を下記の割合で混合する。ただし、TEMED を入れると重合が開始されるので、APS まで入れた段階でよく混合し、TEMED を加える。分離ゲルを先に作り、スラブ板に注入する。

(分離ゲル 10%)

30%アクリルアミド	1.7ml
1.5M Tris-HCl buffer (pH8.8)	1.25ml
蒸留水	2.0ml
10% APS	50ul
TEMED	8ul

(濃縮ゲル 3%)

30%アクリルアミド	0.25ml
0.5M Tris-HCl buffer (pH6.8)	0.64ml
蒸留水	1.6ml
10% APS	25ul

TEMED 4ul

試料を 5ul, 6×Dye(BPB を含む)を 1ul 混合し、レーンに apply する。マーカーも同様の混合比でレーンに apply する。泳動終了後、ゲルを取り出し、CBB を含む染色液で 1h 加温染色する。その後、脱色液で 1h 加温脱色する。

②SDS-PAGE ゲルの作製と電気泳動 (分離ゲル 15%)

30%アクリルアミド	2.6ml
1.5M Tris-HCl buffer(pH8.8)*	1.25ml
蒸留水	1.2ml
10% APS	50ul
TEMED	8ul

(濃縮ゲル 3%)	
30%アクリルアミド	0.25ml
0.5M Tris-HCl buffer(pH6.8)*	0.64ml
蒸留水	1.6ml
10% APS	25ul
TEMED	4ul

*1.5M Tris-HCl buffer(pH8.8) および 0.5M Tris-HCl buffer(pH6.8) はそれぞれ 0.4%(w/v)SDS を含む。

試料を 5ul, 試料処理液(BPB, β ME, SDS を含む)を 5ul 混合し、100℃, 5 分加熱する。軽く遠心後、レーンに apply する。マーカーはそのまま 5ul をレーンに apply する。泳動終了後、ゲルを取り出し、脱色液で 15 分振とうし、ゲル間の SDS を抜く。CBB を含む染色液で 1h 加温染色する。その後、脱色液で 1h 加温脱色する。

③画像解析

(1)Scion image の download

1. Scion Co. の HP (<http://www.scioncorp.com/index.htm>) にアクセスする。
2. 一番下の download scion imaging software をクリックする。必要事項を入力し、submit する。
3. 「Scion Image 1.63 for MacOS 7.5-9.2.2」もしくは「Scion Image Beta 4.03 for Windows 95 to XP」をクリックする。
4. ファイルを保存する。
5. exe. file を実行し、download する (4.9MB)。

(2)ゲル画像の保存

ゲルをスキャナーで取り込み、Windows bitmap 形式(.bit)で保存する。既に取り込んである画像を、「Paint」で開いて、別名で保存→保存形式を「24 ビット ビットマップ」で保存でもよい。

(3)Scion image で画像を開く

Scion image を開き、File→open で(2)の画像を選択する。画像が現れる。

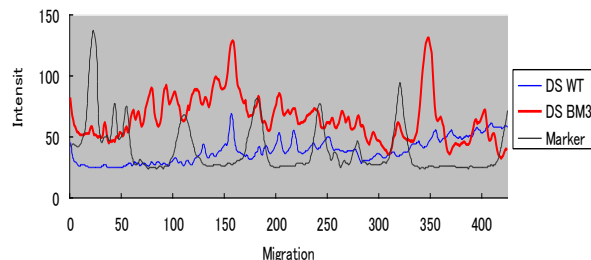
(4) 画像の解析と profile

1. 左のツールバーで点線の四角を選択する。
2. 画像上でレーンに相当するところを選択する。
3. 「Analyze」→「plot profile」を選択する。Profile が表示される。
4. 「file」→「Export」を選択し、「plot value」を save する。
5. MS excel で plot file を開く。Intensity がワークシート上に表示される。
6. 列を挿入し、X 軸（移動度）に相当する数値を入力（上から 1, 2…）
7. 各レーンにつき、1～5 の操作を繰り返す。

(5) 検量線の作成と分子量の算出

1. マーカーの各タンパク質の Rf 値を求める。Rf 値は、各タンパク質の移動度を、(4).6 で作成したワークシートの最後の X 軸の数値(例: 412)で割る。Rf は 0～1 の間の数値となる。
 2. マーカー各タンパク質の Rf と分子量をプロットする。ただし、横軸は Rf、縦軸は $\log(\text{分子量})$ とする。
 3. 直線の式を求める。その際、最も相関係数のよい点を選択する。ただし、目的のタンパク質の Rf 値が、マーカータンパク質各点の間に来るようにする。
 4. 目的タンパク質の Rf を、3. で求めた式に代入し、分子量を求める。
 5. SDS-PAGE で目的タンパク質のバンドが 1 本（1 成分）である場合には、Native-PAGE から求めた分子量(A)を SDS-PAGE から求めた分子量(B)で割れば、四次構造のサブユニット構成がわかる。
- 複数のサブユニット成分からなる場合には、各 profile の intensity 比率もしくは面積比率からサブユニット組成を計算する。

解析例



酵素活性測定法 1

乳酸脱水素酵素の酵素反応速度論

1. 酵素について

生体内のほとんどの化学変化は酵素(enzyme)というタンパク質によって触媒される。酵素と結びつき変化を受ける物質を基質(substrate)という。基質は酵素分子の表面の特定の部位(活性部位, active site)に結合し、酵素タンパク質が作り出す特殊な環境により、いったんエネルギーの高い状態の(ただし、触媒がない場合よりは低いエネルギーで済む)酵素-基質複合体を形成する。この状態から、基質は生成物(Product)へと化学形を変え、酵素から離れる。それと同時に、酵素は元の分子状態に戻り、再び次の基質と結合する。

酵素反応の一般的な表し方



E: 酵素 S: 基質 ES: 酵素-基質複合体 P: 生成物

酵素の触媒作用は、タンパク質だけでなく、しばしば他の分子を必要とする。その1つが補酵素である。近年、タンパク質以外の物質が生体内で触媒作用を発揮する例が見つかった。例えば、一部のRNA(リボ核酸)には、触媒作用がある。酵素には4つの数字からなる固有の番号(EC: Enzyme Code)がある。そのうち、一番目の数字は、下記の6分類の番号である(例: 酸化還元酵素なら、EC 1.x.x.x)。

(酵素の分類)

酵素は、その触媒反応の形式により、次の6つに分類される。

① 酸化還元酵素 (Oxidoreductase) 酸化還元反応を触媒する。

(例) デヒドロゲナーゼ、シトクロム、カタラーゼなど

② 転移酵素 (Transferase) 原子団転移反応を触媒する。

(例) アシル転移酵素、キナーゼ、アミノトランスフェラーゼなど

③ 加水分解酵素 (Hydrolase) 加水分解反応を触媒する。

(例) プロテアーゼ、リパーゼ、アミラーゼ、ヌクレアーゼなど

④ 脱離酵素 (Lyase) 付加および脱離反応を触媒する。

(例) 炭酸ヒドラーゼ、ピルビン酸デカルボキシラーゼなど

⑤ 異性化酵素 (Isomerase) 異性化反応を触媒する。

(例) ラセマーゼ、ホスホグリセリン酸ホスホターゼ、グルコース6-リン酸イソメラーゼなど

⑥ 合成酵素 (Ligase, Synthetase) C-C, C-O, C-N結合などの生成反応を触媒する(ATPを要求)

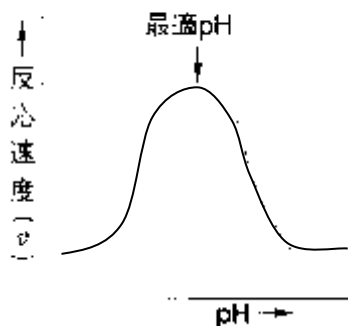
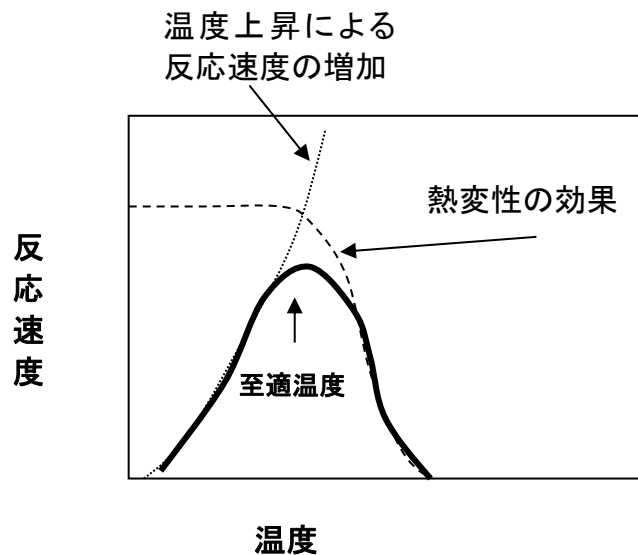
(例) DNAリガーゼ、アミノアシルtRNA合成酵素、アシルCoAシンテターゼ、カルボキシラーゼなど

2. 酵素反応の特徴

酵素はタンパク質であるため、タンパク質の特性を反映した性質が見られる。

至適温度(optimum temperature) 酵素が作用を発揮する最適の温度のこと。一般に、反応速度は温度とともに上昇するが、酵素はタンパク質であるから高温では変性するため、活性が逆に低下する。

至適pH (optimum pH) 酵素が作用を発揮する最適のpHのこと。酵素の活性には種々のアミノ酸の解離性原子団が関与する。酵素活性がpHに依存するのは、それらの原子団の解離がpHによって変化するためである。



基質特異性(substrate specificity)

酵素は特定の反応だけを触媒する。また、特定の化合物または一群の化合物にしか作用しない。この性質を酵素の基質特異性という。酵素の表面には基質が結合する溝状のくぼみがある。基質

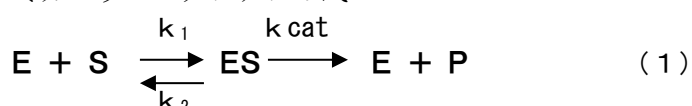
はこのくぼみに結合し、変化を受ける。このような酵素の立体構造の領域を活性部位または活性中心という。一般に、活性部位の立体構造は、鍵と鍵穴の関係のように特定の基質とぴったり合うようになっている。従って、酵素は基質の立体構造を認識することができる分子といえる。

ある酵素では、特定の基質と結合する時に活性部位の立体構造が少し変化する。このように、基質によって立体構造が変化する現象を誘導適合(induced fit)という。

3. 酵素反応速度論

酵素反応の速さは、酵素濃度や基質濃度に依存する。酵素反応を理論的に取り扱ったものとして、次のミカエリス・メンテンの式が有名である。

ミカエリス・メンテンの式



ESの生成速度は、

$$\frac{d[\text{ES}]}{dt} = k_1 [\text{E}][\text{S}] - (k_2 + k_{\text{cat}}) [\text{ES}] \quad (2)$$

酵素および基質の初濃度を $[\text{E}]_0$ 、 $[\text{S}]_0$ とすると、

$$[\text{E}]_0 = [\text{E}] + [\text{ES}] \quad (3)$$

$$[\text{S}]_0 = [\text{S}] + [\text{ES}] + [\text{P}] \quad (4)$$

通常の実験条件では $[\text{S}]_0 \gg [\text{E}]_0$ であり、反応の初期をとれば、加水分解率が10%以下の場合、 $[\text{P}]$ は無視できるから、

$$[\text{S}]_0 \div [\text{S}] \quad (5)$$

としてよい。

また、反応のごく初期以外は、 $[\text{ES}]$ の濃度変化はないと考えて良い (定常状態近似) ので、(2) 式、

$$\frac{d[\text{ES}]}{dt} = k_1 ([\text{E}]_0 - [\text{ES}]) [\text{S}]_0 - (k_2 + k_{\text{cat}}) [\text{ES}] = 0 \quad (6)$$

これをまとめると、

$$[\text{ES}] = \frac{k_1 [\text{E}]_0 [\text{S}]_0}{k_1 [\text{S}]_0 + k_2 + k_{\text{cat}}} = \frac{[\text{E}]_0 [\text{S}]_0}{[\text{S}]_0 + (k_2 + k_{\text{cat}})/k_1} \quad (7)$$

反応速度 v は、

$$v = k_{\text{cat}} [\text{ES}] \quad (8)$$

これを (7) 式に代入して、

$$v = \frac{k_{\text{cat}} [\text{E}]_0 [\text{S}]_0}{[\text{S}]_0 + K_m} \quad (9)$$

ここで K_m はミカエリス定数で、次式で与えられる。

$$K_m = \frac{k_2 + k_{\text{cat}}}{k_1} \quad (10)$$

いま、 $[\text{S}] \gg K_m$ の条件を考えると、(9) 式より、

$$v = k_{\text{cat}} [\text{E}]_0 \quad (11)$$

となり、反応速度は $[\text{S}]_0$ に依存せず0次反応となる。

この時の v を $V_{\max}$ とすると、

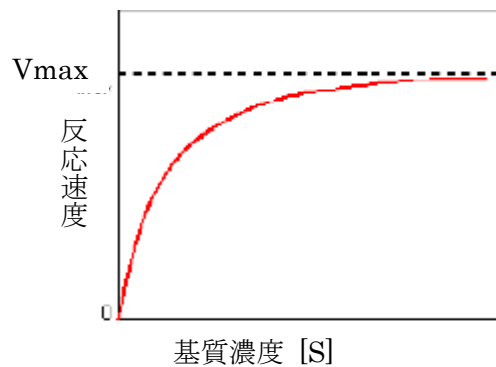
$$V_{\max} = k_{\text{cat}} [E]_0 \quad (12)$$

となる。酵素濃度が一定の条件で測定すれば、 $V_{\max}$ は定数となる。

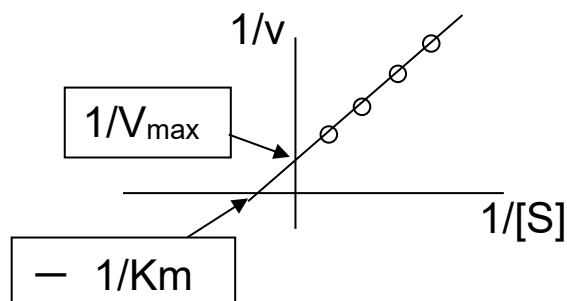
従って、(9)式は次のように書く事ができる。

$$v = \frac{V_{\max} [S]_0}{[S]_0 + K_m} \quad \boxed{\text{ミカエリス・メンテンの式}}$$

基質濃度と反応速度の関係を図で示すと、次のようになる。



このままでは、実験的に K_m および $V_{\max}$ を求めることができない。そこで、通常は下記の直線プロットを行い、速度論的パラメータを求める。



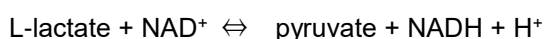
Lineweaver-Burk plot

$1/v$ を縦軸に、 $1/[S]$ を横軸にプロットし、この関係が直線となる場合、酵素反応はミカエリス・メンテン式に従う。

この場合、 x 切片は $-1/K_m$ 、 y 切片は $1/V_{\max}$ となる。直線式から各切片を求めることで、 K_m および $V_{\max}$ を求めることができる。

4. 実験

乳酸脱水素酵素(Lactate dehydrogenase, EC1.1.1.27)は、乳酸をピルビン酸に変換する反応を触媒する。しかし、この酵素反応は可逆的で(下記)、逆反応(ピルビン酸から乳酸を生成)に律速がある。ここでは、ウサギ骨格筋由来の乳酸脱水素酵素を使用し、基質としてピルビン酸を用いて補酵素である NADH の減少量を利用して、酵素の活性を求める。さらに、酵素反応における基質親和性を表すミカエリス定数(K_m)と酵素反応最大速度(V_{max})を求める。NADH は 340nm に吸収極大を示すが、 NAD^+ は吸収極大波長がシフトするため、この分光学的特性を利用して、酵素活性を検出することができる。



(試薬)

- (1) 0.1M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.6)
- (2) 乳酸脱水素酵素 (0.1mg/ml)
- (3) 3mM ピルビン酸
- (4) 2mM NADH

(実施)

- (1) 試験管を 5 本準備する
- (2) 各試験管に各溶液を入れる。(単位は ml)
*(4)液は入れると酵素反応が始まるので、それ以外の溶液 ((1)~(3)液と水) を入れる。
吸光度計で測定する直前に、(4)液を加える。

試験管	1	2	3	4	5
(1)液	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
(2)液	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
(3)液	0.05	0.1	0.15	0.2	0.3
水	1.2	1.15	1.1	1.05	0.95
(4)液	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
合計	3	3	3	3	3

- (3) 各液を石英セルに入れ、(4)液を 0.2ml 加え軽くかくはんする。吸光度計にセットして、340nm*における吸光度の減少を 1 分間測定する。

*この波長は NADH の吸収に由来するので、NADH の減少量を測定していることになる。上記の酵素反応式で NADH のモル数と基質のピルビン酸のモル数は等しいため、間接的にピルビン酸の減少量を測定している。

(計算)

- (1) 試験管 1~5 の各々について、横軸に時間(秒)、縦軸に 340nm における吸光度をプロットする。
- (2) 最小二乗法で処理した直線の式から、試験管 1~5 の各々について 1 分間に減少した吸

光度(ΔA)を求める。

- (3) ランベルト・ベールの法則 $A = \epsilon \times c \times \ell$ より、試験管 1～5 の各々で 1 分間に減少した NADH 濃度 ΔC を求める。ここで、 ϵ はモル吸光係数で、340nm における NADH の ϵ は 6.20mM^{-1} である。 A は(2)で求めた ΔA を、 ℓ は光路長(cm)でここでは 1 を用いる。したがって、各々の試験管で減少した NADH の濃度 ΔC は、
 $\Delta C = \Delta A / \epsilon \times \ell = \Delta A / 6.20 \cdot 1 \text{ (mM/min.)}$

- (4) (3)で求めた ΔC を、一秒あたりの濃度の減少量 C' に変換する。

$$C' = \Delta C / 60 \text{ (mM/sec.)}$$

- (5) (4)で求めた C' を、一秒あたりに減少した基質量 $Y \text{ (mmol/sec.)}$ に変換する。ピルビン酸の反応系内(3ml)での Y は、

$$Y = C' \times 3 / 1000 \text{ (mmol/sec.)}$$

- (6) 酵素 1mg あたりの反応速度 V を求める。

使用した酵素量は $0.1\text{mg/ml} \times 0.05\text{ml} = 0.005\text{mg}$ であるので、

$$V = Y / 0.005 \text{ (mmol/sec} \cdot \text{mg) もしくは } \mu\text{mol/sec} \cdot \text{mg)}$$

各試験管 1～5 について、各々反応速度 V を求める。

- (7) 各反応速度 V の逆数 $1/V$ を求める。

- (8) 各試験管 1～5 の基質濃度 S の逆数 $1/S$ を求める。

* 各試験管におけるピルビン酸濃度 S は、元のピルビン酸溶液が 3mM であるので、

$$S = 3 \times x / 3 \text{ (mM) ただし、} x \text{ は反応系内のピルビン酸量(ml)}$$

- (9) 各々の $1/S$ と $1/V$ を、Lineweaver-Burk plot を行い、 x 切片と y 切片からミカエリス定数(mM または μM)と V_{max} (mmol/sec $\cdot$ mg もしくは $\mu\text{mol/sec} \cdot \text{mg}$)を求める。

得られた値を下記の HP 等を参考に文献値と比較せよ。

(参考 HP と考察)

<http://www.brenda.uni-koeln.de/index.php4> を開き、「lactate dehydrogenase」と入力する。EC1.1.1.27 を選択する。左横の tag から「Km value」をクリックすると、種々の物質に対する Km 値がわかる。今回はピルビン酸に対する Km 値を参考にする。また、turnover は Kcat ともいわれ、一秒あたりに変換される基質分子数(濃度でも量でもないことに注意)である。求めた V_{max} をこれらの turnover 数と比較せよ。

(注)学内からのみ上記 web サイトにアクセス可能です。

酵素活性測定法 2

乳酸脱水素酵素の酵素活性の熱安定性

先の酵素活性測定法 I の測定法を利用して、乳酸脱水素酵素の熱失活について検討する。

1. タンパク質の安定性について

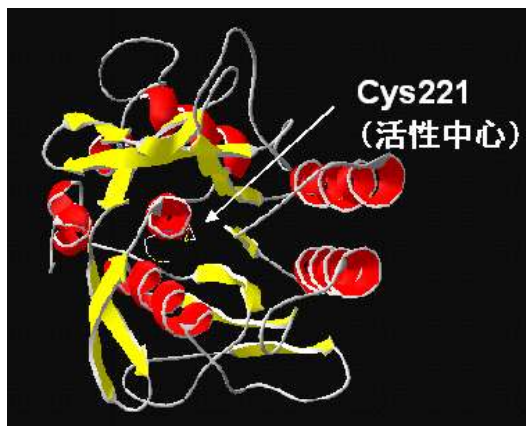
(タンパク質(酵素)の変性)

タンパク質は、加熱、極端なpH、強い攪拌、高濃度の塩や尿素、還元剤、強い光などで高次構造を支える結合が切れ、溶解度が低下（凝集）したり固有の機能（活性）の低下・消失（失活 inactivation）が起こる。これを変性(denaturation)という。



(酵素の活性部位と失活)

酵素は分子内に反応を触媒できるポケット(活性部位)を持っている。ただし、活性部位は必ずしも一つとは限らない。一分子で複数活性部位がある酵素も存在する。基本的に一分子の基質に対し、活性部位が一つの場合には、Iで述べたミカエリス-メンテン型の酵素反応速度論に従う場合が多い。酵素一分子内に複数活性部位がある場合には、アロステリック効果が観察され、ミカエリス-メンテン式に従わない場合が多い(この場合には Hill plot などが用いられる)。また、基質以外にも、補酵素、エフェクターなども酵素反応速度の様式に影響を与える。このように、酵素の種類により、活性部位の様式はさまざまである。ここでは、乳酸脱水素酵素の活性部位を形成する立体構造が熱変性を受けることで崩れ、酵素が触媒できなくなる(熱失活)ことを実験により学ぶ。



酵素の活性部位の例

Subtilisin BPN' の三次元立体構造と活性部位

* Subtilisin BPN' はタンパク質を分解する酵素（プロテアーゼ）で、洗剤などに含まれて市販されている。中央のポケットが活性部位で、Cys221 は活性中心である。

PDB code:1SUA

(タンパク質の立体構造形成要因)

タンパク質(酵素)は、基本的に 20 種のアミノ酸(正確にはイミノ酸であるプロリンを含む)が、ペプチド結合により多数結合した生体高分子である。しかし、アミノ酸がただ連結しただけでは、タンパク質は特定の機能を発現することができない。タンパク質が特定の機能を果たすためには、特異的な立体構造を形成する必要がある。タンパク質の立体構造形成要因としては、下記の結合や相互作用がある。

1. 共有結合

異なる原子間で電子を共有して形成される結合

(例) ペプチド結合、ジスルフィド結合

2. 疎水結合

水溶液中で非極性基(メチル基やメチレン基など)が水との接触を避ける結果生じる分子間結合

(例) $-\text{CH}_3 \cdots \text{CH}_3-$

3. イオン結合(イオンペア、静電結合、塩橋)

酸性アミノ酸(Glu, Asp)と塩基性アミノ酸(His, Lys, Arg)の間に生じる静電的相互作用

(例) $\text{Lys}^+ \cdots \text{Glu}^-$

4. 水素結合

OH 基や NH 基が電気陰性度の大きい N 原子や O 原子と静電的に相互作用する結果生じる分子間結合。(例) $\text{NH} \cdots \text{O}=\text{C}$

5. ファンデルワールス力(Van der Waals)

電気的に中性のカルボニル基、アミド基、メチル基などの間に双極子相互作用が働く結果生じる分子間結合

酵素の三次元立体構造はもとより、活性部位もこれらの相互作用により安定な構造を形成している。

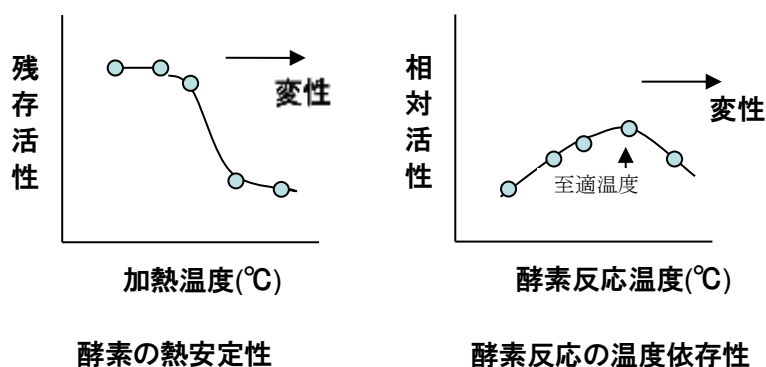
結合エネルギーは 1 から 5 の順に強い。(水中で共有結合は 90 kcal/mol, イオン結合は 3 kcal/mol, 水素結合は 1 kcal/mol, ファンデルワールス力は 0.1 kcal/mol)

(酵素の熱安定性と酵素反応の温度依存性)

酵素がどの程度熱に強いかを評価するにはいくつかの方法(下記)がある。酵素は特有の活性を持つので、これを指標とすると、活性部位の変性の様子が理解できる。

「酵素の熱安定性」は、酵素を $x^\circ\text{C}$ で加熱したあとに、どの程度活性を維持しているか(残存活性という)を評価するものである。基本的に酵素の立体構造や活性部位の強さに依存する。

「酵素反応の温度依存性」は、酵素と基質を $x^\circ\text{C}$ で反応させ、酵素反応の反応温度との相関を検討するものである。酵素反応も化学反応なので、基本的に反応温度を上昇させると酵素反応速度も上昇する。ところが、酵素はタンパク質であるため、ある温度以上で変性を受ける。したがって見かけ上、酵素反応はある温度で極大を示す(至適温度)ようになる。「酵素活性の温度依存性」では、酵素が基質や補酵素などと結合して熱変性から保護される現象が見られる。図示すると下記のようなになる。ここでは、「酵素の熱安定性」を検討する。



2. 実験

乳酸脱水素酵素(Lactate dehydrogenase, EC1.1.1.27)は、酵素活性測定法 I で述べたように、ピルビン酸から乳酸を生成する。ここでは、酵素活性測定法 I を利用して、ウサギ骨格筋由来の乳酸脱水素酵素の熱安定性を検討する。その際、指標として酵素活性を使用する。ある温度で加熱した酵素が何度まで酵素活性を維持できるか（何度から酵素活性を失う（失活）か）を検討する。酵素活性は I と同様に NADH の減少量を利用して求める。

（試薬）

- (1) 0.1M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.6)
- (2) 乳酸脱水素酵素 (0.1mg/ml)
- (3) 3mM ピルビン酸
- (4) 2mM NADH

（実施）

- (1) マイクロチューブを 5 本準備し、(2)液を 200 μ l ずつ分注する。
- (2) (1)の試料を 30, 40, 50, 60, 70°C で 10 分間加熱する。
- (3) (2)の試料を 10 分間氷冷する。
- (4) 試験管を 5 本準備する
- (5) 各試験管に下記の酵素反応溶液を入れる（単位は ml）。ただし、(2)液（酵素液）は各温度で加熱した酵素液を用いる。試験管 1 は 30°C、試験管 2 は 40°C、試験管 3 は 50°C、試験管 4 は 60°C、試験管 5 は 70°C で加熱後の酵素液を各々 50 μ l 用いる。
 *(4)液は入れると酵素反応が始まるので、それ以外の溶液（(1)~(3)液と水）を入れる。
 吸光度計で測定する直前に、(4)液を加える。

試験管	1	2	3	4	5
(1)液	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
(2)液	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
(3)液	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
水	1.05	1.05	1.05	1.05	1.05
(4)液	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
合計	3	3	3	3	3

- (6) 各液を石英セルに入れ、(4)液を 0.2ml 加え軽くかくはんする。吸光度計にセットして、340nm における吸光度の減少を 1 分間測定する。

(計算)

- (1) 試験管 1~5 の各々について、横軸に時間(秒)、縦軸に 340nm における吸光度をプロットする。
- (2) 最小二乗法で処理した直線の式から、試験管 1~5 の各々について 1 分間に減少した吸光度(ΔA)を求める。
- (3) ランベルト・ベールの法則 $A = \varepsilon \times c \times l$ より、試験管 1~5 の各々で 1 分間に減少した NADH 濃度 ΔC を求める。ここで、 ε はモル吸光係数で、340nm における NADH の ε は 6.20mM^{-1} である。 A は(2)で求めた ΔA を、 l は光路長(cm)でここでは 1 を用いる。したがって、各々の試験管で減少した NADH の濃度 ΔC は、
$$\Delta C = \Delta A / \varepsilon \times l = \Delta A / 6.20 \cdot 1 \text{ (mM/min.)}$$
- (4) (3)で求めた ΔC を、一秒あたりの濃度の減少量 C' に変換する。
$$C' = \Delta C / 60 \text{ (mM/sec.)}$$
- (5) (4)で求めた C' を、一秒あたりに減少した基質量 Y (mmol/sec.) に変換する。ピルビン酸の反応系内(3ml)での Y は、
$$Y = C' \times 3 / 1000 \text{ (mmol/sec.)}$$
- (6) 酵素 1mg あたりの反応速度 V を求める。
使用した酵素量は $0.1\text{mg/ml} \times 0.05\text{ml} = 0.005\text{mg}$ であるので、
$$V = Y / 0.005 \text{ (mmol/sec} \cdot \text{mg) もしくは } \mu\text{mol/sec} \cdot \text{mg)}$$
各試験管 1~5 について、各々反応速度 V を求める。
- (7) 各温度で加熱後の反応速度 V を、30°C で加熱後 (試験管 1) の反応速度 $V_{30^\circ\text{C}}$ を 100% として、残存活性に換算する。単位は%となる。
- (7) 横軸に加熱温度(°C)、縦軸に残存活性(%)をプロットする。乳酸脱水素酵素の熱安定性について、先に紹介した HP <http://www.brenda.uni-koeln.de/index.php4> を参考に、文献値と比較する。酵素の熱安定性の実験結果について考察を加える。

タンパク質の構造と機能 1

蛍光スペクトルを用いたタンパク質の熱変性による立体構造変化解析

タンパク質の構造には下記の 4 種の構造がある。二次構造以上の構造を立体構造と呼ぶ場合が多い。このタンパク質の立体構造形成には、先に述べた5つの相互作用(結合)がある。タンパク質の立体構造を決定もしくは立体構造変化を検出する方法は、1 次～4 次構造で異なる。ここでは、蛍光スペクトルを用いて、タンパク質の 3 次構造変化を検出する。

1.タンパク質の立体構造について

(タンパク質の構造)

タンパク質(protein)は、アミノ酸が多数ペプチド結合で鎖状につながった高分子化合物である。タンパク質の骨格であるポリペプチド鎖には方向がある(N末端とC末端)。アミノ酸の種類に無関係な-NH-CH-CO- のつながりを、**主鎖**(main chain)という。また、アミノ酸に固有の原子団部分を**側鎖**(side chain)という。主鎖はタンパク質の立体構造を支え、側鎖はそのタンパク質が固有の機能を発揮するために必要な原子団を供給する。

タンパク質は固有の立体構造をもち、立体構造はタンパク質の機能と密接に関連している。タンパク質の構造は、次のような4つの階層構造(1次～4次構造)に分けて理解することが出来る。

1次構造

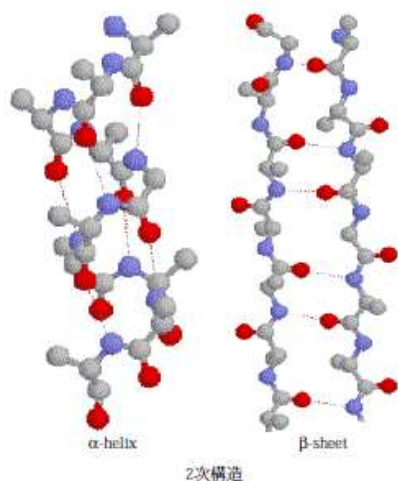
タンパク質を構成するアミノ酸の配列順序のこと。タンパク質の1次構造は遺伝情報(DNAのヌクレオチド配列)によって規定される。1次構造決定法としては、エドマン分解、質量分析法などがある。

```
1                                     60
AALKDQLIHN LLKEEHVPQN KITVVGVGAV GMACAI SILM KDLADELALV DV MEDK LKGE
MMDLQHGS LF L RTPKIVSGK DYSVTANSKL VIITAGARQQ EGESRLNLVQ RNVNIFKFII
PNVVKYSPHC KLLVVS NPVD ILTYVAWKIS GFPKNRVIGS GCNLD SARFR YLMGERLGVH
ALSCHG WILG EHGDS SVPVW SGMNVAGVSL KTLHPELGTD ADKEQWKQVH KQVVD SAYEV
IKLKG YTTWA IGLSVADLAE SIMKNLRRVH PISTMLKGLY GIKEDVFLSV PCVLGQNGIS
DVKVTLTSE EEHLKKSAD TLWGIQKELQ F
```

Rabbit muscle Lactate dehydrogenase の一次構造(331 A.A.)

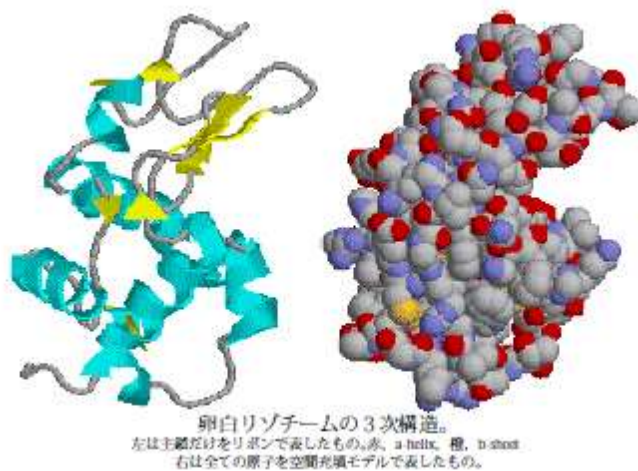
2次構造

主鎖間の水素結合により、タンパク質は部分的に折りたたまれた立体構造をとる。 α -helix, β -sheet, β -turnなどが代表的なものである。このようなペプチド主鎖の規則正しい折れ曲がり構造を2次構造という。二次構造分析法としては、円偏光二色性(CD)スペクトルや赤外吸収(IR)スペクトルなどがある。



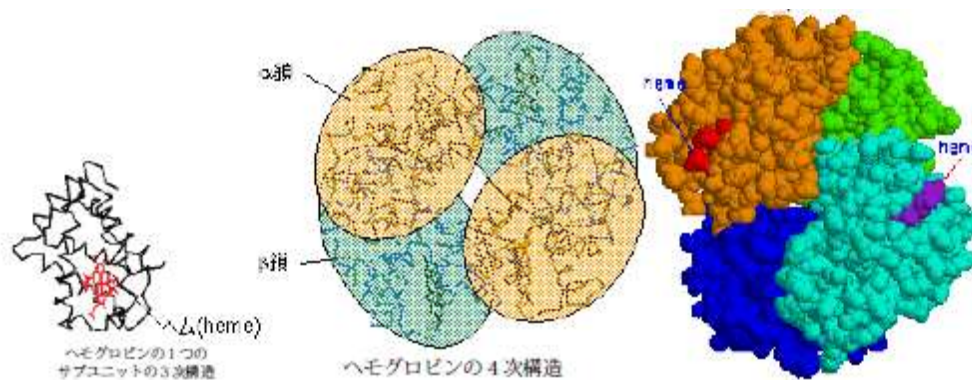
3次構造

タンパク質全体の三次元的な立体構造を3次構造という。3次構造には、主鎖や側鎖間の種々の相互作用が関与する。ペプチド鎖の折りたたみは、「油は中、水は外」の原理に従う。3次構造解析法としては、紫外吸収スペクトル、蛍光スペクトルなどがあり、3次元立体構造決定法としては、X線結晶構造解析や核磁気共鳴法（NMR）がある。下図のような3次元立体構造はX線やNMRで決定されたものである。



4次構造

タンパク質分子が複数集合して複合体を形成している場合がある。それぞれのタンパク質成分をサブユニット(subunit)と呼ぶ。例えば、血液中で酸素分子を運搬するヘモグロ빈は4つのサブユニットからなり、その構成は $\alpha 2 \beta 2$ の四量体である。四次構造分析法としては、ゲルろ過クロマトグラフィー、超遠心法などがあり、四次構造変化の検出にはNative-PAGEなどを用いることもある。



(蛍光スペクトルについて)

タンパク質は巨大分子であるため、その 3 次構造が変化した場合、構造変化を何らかの目印を指標として捉える必要がある。先に述べたように、タンパク質の 3 次構造変化を検出する方法として、紫外吸収スペクトルや蛍光スペクトルなどの分光学的手法を用いる場合が多い。吸収スペクトルは光を照射した際、分子が基底一重項状態から励起一重項状態へエネルギーが移動することによる。分子の官能基により、どの波長の光を吸収するかは異なる(図1)。蛍光スペクトルは吸収が起こった分子が、励起一重項状態から基底状態に戻るときに発する光である。したがって、蛍光スペクトルは、分子をいったん「励起」させる必要がある。この励起の波長は、芳香族アミノ酸に固有であることから、紫外吸収法よりもより特異的かつ鋭敏に分子の変化を捉えることができる。蛍光スペクトルには、蛍光発光スペクトルと蛍光励起スペクトルがあり(図2)、前者は特定の波長で励起させた分子が、その励起波長より長波長側で蛍光が見られることに由来している。後者は励起波長を変化させて、分子の特性を検出するものである。ここでは、蛍光発光スペクトルを使用し、分子内 Trp に特有な 295nm を励起波長とする。これにより、分子内 Trp 残基周辺の環境変化(相互作用の変化、溶媒への露出)を検出することができる。

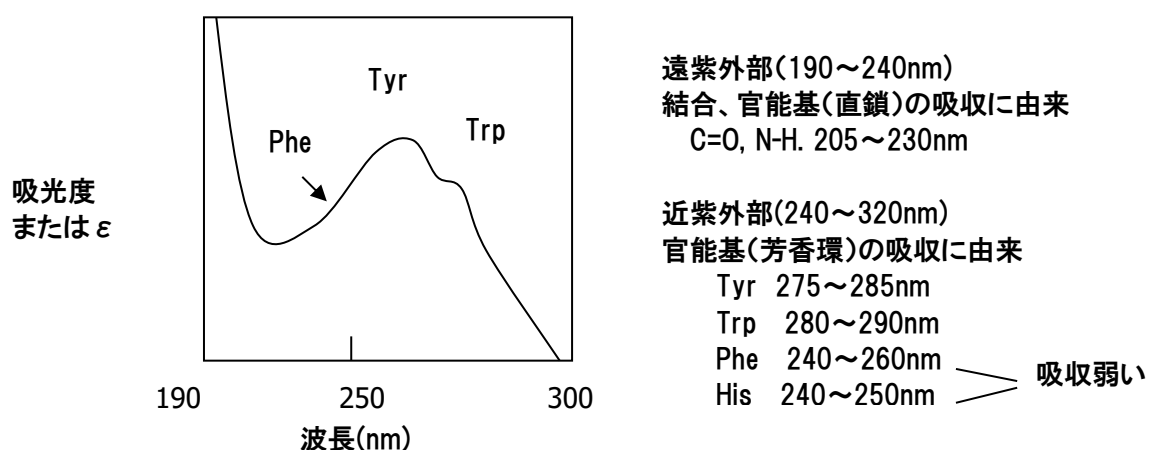
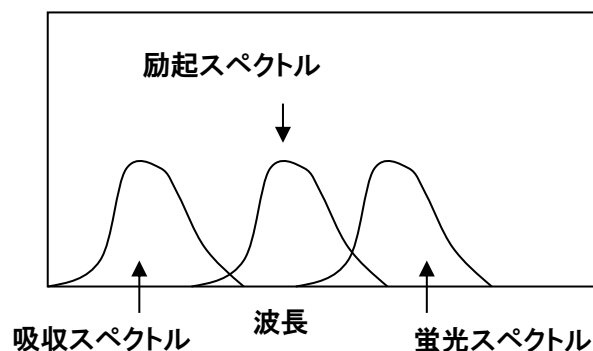


図1. 一般的なタンパク質の紫外部吸収スペクトル



励起スペクトルより、蛍光スペクトルは長波長側に検出される

図 2 吸収スペクトル、励起スペクトル、蛍光スペクトルの概念図

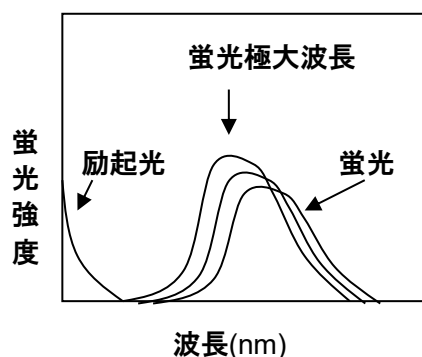


図 3 一般的な蛍光スペクトル

2. 実験

乳酸脱水素酵素(Lactate dehydrogenase, EC1.1.1.27)の酵素活性の熱安定性については、前実験で検討した。ここでは、加熱により乳酸脱水素酵素の立体構造が崩れることを、蛍光スペクトルを用いて検出するとともに、先の加熱による酵素活性の減少が、立体構造変化に起因するものであるかを考察する。

(試薬)

- (1) 0.1M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.6)
- (2) 乳酸脱水素酵素 (0.1mg/ml)

(実施)

- (1) マイクロチューブを 5 本準備し、(2)液を 700 μ l ずつ分注する。
- (2) (1)の試料を 30, 40, 50, 60, 70℃で 10 分間加熱する。
- (3) (2)の試料を 10 分間氷冷する。
- (4) 各加熱後の試料を蛍光セル(四面透過セル、光路長 1cm)に入れ、下記の条件で蛍光スペクトルを測定する。

*機器の使用方法は、実験の際に説明する。試薬(1)の 0.1M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.6)も別途測定する。

測定機器:Hitachi F-2500 形分光蛍光光度計

装置条件

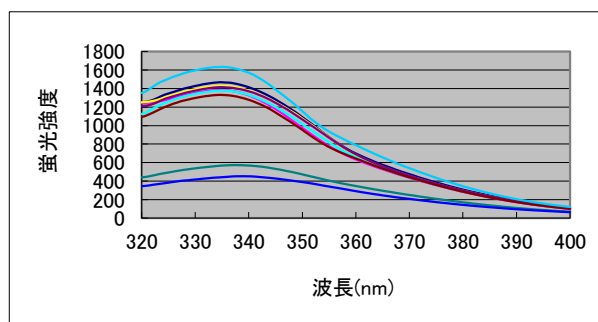
測定モード: 波長スキャン
スキャンモード: 蛍光スペクトル
データモード: 蛍光
励起波長: 295.0 nm
蛍光開始波長: 320.0 nm
蛍光終了波長: 400.0 nm
スキャンスピード: 60 nm/min
初期待ち時間: 0 s
励起側スリット: 10.0 nm
蛍光側スリット: 2.5 nm
ホトマル電圧: 700 V
レスポンス: 自動
スペクトル補正: Off

(計算)

- (1) デスクトップ上に保存した 30℃加熱後試料の測定データ(text, **.txt)を開く。データ部分(波長と蛍光強度)をコピーする。
- (2) 「Microsoft Excel」を開き、セルにデータをペーストする。さらに、buffer のデータもコピー・ペーストする。
- (3) 「試料の測定データ(蛍光強度)」－「buffer の測定データ(蛍光強度)」を計算する。(補正データ)
- (4) 各温度で加熱した試料のデータも(1)－(3)の手順でデータを補正する。
- (5) ワークシートの列(便宜上 A)に波長を、隣の列(B,C,D..)に各加熱後の補正データをペーストする。

波長(nm)	蛍光強度(補正)
320	1388
320.5	1399
321	1415
321.5	1437
322	1459
322.5	1482
323	1502
323.5	1523
324	1539
324.5	1555
325	1571

- (6) これらのデータをもとに、グラフを作成する。



(7) (4)で作成した補正データにおいて、蛍光強度が最大の測定点を探す。

(例) 30℃: 波長 335.0nm, 蛍光強度 1581

(8) 各加熱温度における最大蛍光強度を、30℃加熱後の最大蛍光強度を 100%とした相対蛍光強度(%)で表す。

(9) 横軸に加熱温度、縦軸に相対蛍光強度(%)をプロットする。

(10) (9)で作成したグラフを、「酵素活性測定法 II」で作成した酵素活性の熱安定性のグラフと比較し、構造—活性相関について考察する。Rabbit muscle Lactate dehydrogenase の一次構造を参考に、Trp の位置を見つける。次の実験項目「タンパク質の構造と機能 2」で解析する乳酸脱水素酵素の三次元立体構造を参考に、分子内 Trp 残基が立体構造上どのような環境にあり、どのような構造変化を生じたと考えられるか、レポートに記載する。

タンパク質の構造と機能 2

タンパク質の立体構造変化の解釈

～データベースとフリーソフトの利用法～

タンパク質の 3 次元立体構造は、先に述べたように X 線結晶構造解析や NMR により決定される。ただし、NMR で決定された構造は溶液中での構造（動的構造）であるのに対し、X 線結晶構造解析は結晶構造（静的構造）である点に注意しなくてはならない。これまで用いたウサギ骨格筋由来乳酸脱水素酵素は、三次元立体構造が解明されていないため、ここでは一次構造上相同性のある（94%）ヒト由来乳酸脱水素酵素の三次元立体構造をモデルとして、立体構造データベースの利用法、フリーソフトによる立体構造解析法と分子科学的考察法について学ぶ。

（Protein Data Bank(PDB)について）

タンパク質の立体構造データベースとしては、米国の Protein Data Bank(PDB)が代表的で、X 線結晶構造解析や NMR で得られた 3 次元構造情報を収めている (<http://www.rcsb.org/pdb/>)。この HP で、キーワードに基づく検索や立体構造の描画、座標データのダウンロードなどができる。ただし、キーワード検索の場合、多数ヒットする可能性があるため、キーワードを絞り込むか、PDB code(各立体構造に固有の番号)がわかる場合にはその番号を入力することで、検索の手間を省くことができる。先に紹介した酵素データベースの BRENDA では、その酵素で解明されている立体構造の PDB code を簡便に探すことができる。酵素以外のタンパク質では、そのほかのデータベースからのリンクが検索しやすい場合もあるので、データベースリンク集 IDEAS (<http://www.genome.ad.jp/ideas/ideas.html>) を参考にしてください。

（[Swiss-PdbViewer](http://www.expasy.org/spdbv/) について）

PDB viewer は、タンパク質の立体構造 (Ball and Stick, Stick, Ribbon など) を表示できるだけでなく、原子間距離、結合角、人工的な変異導入など立体構造に関するデータの詳細な解析ツールである。このソフトは、EXPASY (**Expert Protein Analysis System**) の HP (<http://us.expasy.org/spdbv/>) から Windows, Mac, Linux 版などをダウンロードすることができる。現在のバージョンは 3.7 である。ソフトを手持ちの PC にダウンロードしてあり、かつインターネットに接続してあれば、PDB code のみで構造データをダウンロードできる (PDB のデータをいちいちダウンロードする必要がない)。このソフトを用いて、タンパク質の立体構造における相互作用や、変異導入に伴う相互作用の変化を予測・考察することができる。

ここでは、PDB に登録されている乳酸脱水素酵素の立体構造について検索し、既知の立体構造を表示、解析することにより、これまでの実験結果の解釈に用いる。

1. PDB による乳酸脱水素酵素の立体構造の検索

- (1) PDB (<http://www.rcsb.org/pdb/>) にアクセスする。
- (2) 「Search the Archive」で「lactate dehydrogenase」と入力し、search をクリック
- (3) ヒットした立体構造リストが表示される。
- (4) このなかで、「Human muscle」由来の乳酸脱水素酵素の立体構造を探す。PDB code

を記録しておく。

- (5) リスト中で、目的の立体構造の ID か「目」のアイコンをクリックする。ID をクリックした場合は、左のカラムの「View structure」をクリックし、一番下の「Still Image」の Ribbon(500×500)をクリックすると立体構造が表示される。「目」アイコンをクリックした場合には、一番下に「Still Image」が表示されるので、Ribbon(500×500)をクリックすると立体構造が表示される。
- (6) 同じ画面上で、「Interactive 3D Display」の Swiss-PdbViewer をクリックし、「*.pdb」というファイルでデータをダウンロードする。
- (7) 他の由来の乳酸脱水素酵素の立体構造のうち一つを選び（哺乳類に限る）、同様に行う。

2. Swiss-PdbViewer を利用したタンパク質の立体構造の解析

(1) Swiss-PdbViewer を開く。

- (2)-1 「File」タグの「Import」を選択する。1. の作業で選択した PDB code を入力する。「PDB file」をクリックする。インターネットにつながっていれば、データがダウンロードされる。
- (2)-2 「File」タグの「Open pdb file」を選択し、1. (6) の作業でダウンロードしたファイルを開く。

この方法の場合、Pdb のファイルが既にダウンロードできていれば、インターネットに接続していなくてもよい。

- (3) (2)-1 または 2 の方法でファイルを開くと、立体構造が図示される。

(4) ツールの使用

- ①画面上部にある「手」のアイコンは、表示されている構造を画面上で移動させることができる。
手のアイコンをクリック→構造をドラックする。
- ②その横の□のアイコンは、表示されている構造を拡大・縮小する。
□のアイコンをクリック→左右にドラックする
- ③その横の「」アイコンは、表示されている構造を回転できる。
 アイコンをクリック→左右にドラックする

(5) コントロールパネルの使用と構造の色分け

チェックされているアミノ酸が現在表示されているものである。普通は「stick model」で主鎖と側鎖が表示されている。これを「Ribbon model」で表示し、種々に色分けすることで視覚的に理解しやすくする。

- ① すべて「Ribbon model」で表示するには、「Shift」を押しながら、「Show」「Side」の下をクリックする（チェックをすべてはずす）。現在表示されている構造が画面に表示されなくなる。
「Shift」を押しながら、「Ribn」(Ribbon) の下をクリックする。構造が Ribbon model で表示される。
- ② コントロールパネルの一番右に BS タグがあるので、そこから「Ribbon」を選択する。
- ③ pdb viewer 画面の color タグから「by secondary structure」を選択する。
二次構造に応じて、構造が色分けされる。コントロールパネル上でも色分けされるので、どのアミノ酸がどの二次構造をとっているかがわかる。各二次構造が、一次構造上どのアミノ酸で形成されているか、記録しなさい。
- ④ 次に、pdb viewer 画面の color タグから「by Chain」を選択する。Chain (Subunit) ごとに色分けされる。この酵素の四次構造はどのようなものか、記録しなさい。

- ⑤ 次に、pdb viewer 画面の color タグから「by B-factor」を選択する。B-factor は温度因子とも呼ばれ、タンパク質の立体構造で揺らぎの大きい部分と小さい部分を表すパラメータである。ここでは、寒色系（青）は揺らぎの小さい部分、暖色系（赤）は揺らぎの大きい部分である。揺らぎの大きい部分は一般的に分子表面に位置する。B-factor の大きい(揺らぎの大きい)領域は一次構造上どこか、記録しなさい。
- (6) アミノ酸の側鎖の表示
「タンパク質の構造と機能 1」で取り上げた Trp の位置や環境を知るために、pdb viewer の機能を利用する。
- ① 再度、「Ribbon model」で構造を表示する。(5)④の表示にする。
- ② pdb viewer 画面の select タグから「group kind」「Trp(W)」を選択する。コントロールパネルで Trp の文字のみが赤くなる。Trp の数とアミノ酸番号を記録する。
- ③ Trp 残基の「show」「side」をクリックして、チェックする。側鎖が「stick model」で表示される。
- ④ 乳酸脱水素酵素の場合サブユニットが複数あるので、Chain A-D について、③の操作を行う。
- ⑤ Trp 残基の立体構造（特に二次構造）上の位置について、特徴を考察する。
- (7) そのほかのツール
- ① 画面中央上部にあるツールは、左から、結合距離、結合角、二面角、アミノ酸の表示、選択した原子から一定距離以内にある原子の表示などがある。これらのツールにより、(6)③の要領で選択したアミノ酸同士の距離などを表示することができる。
- ② (4)-(7)①の操作で表示された構造は、「Display」タグの「Render in solid 3D」を選択するときれいに表示される。
- ③ 「file」タグの「save」「image」を選択すると、表示されている画面が保存される。ただし、TGA file 形式なので、他のソフトで読めない場合には、JPEG file などに変換する必要がある。
「file」タグの「save」「Layer」を選択すると、作業中の画面が pdb viewer 形式で保存される。作業途中の場合などに有効である。

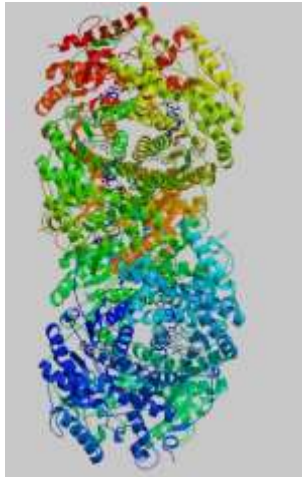
3. そのほかのデータベースから情報を集める

本来、そのタンパク質に関する既知の情報を集めるためには、論文検索などの方法によることが多い。しかし、データベースの中には、その酵素の活性部位や二次～四次構造が決定されていなくても、相同性などから推定されるこれらに関する情報を記載している場合も多い。信憑性は基の文献などで確認するべきであるが、根拠のあるものであれば、情報を検索する上で大いに便利である。ここでは、一次構造データベースである Swiss-plot を利用して、乳酸脱水素酵素に関する付加的な情報を集める。

(1) ウサギ骨格筋由来乳酸脱水素酵素に関する一次構造情報

- ① 先に述べたデータベースリンク集 IDEAS (<http://www.genome.ad.jp/ideas/ideas.html>) にアクセスし、Swiss-plot を選択する。
- ② キーワードに「lactate dehydrogenase muscle」と入力する。
- ③ Rabbit と記載されているものをクリックする。
- ④ 由来、参考文献、一次構造、分子量などとともに、活性部位（基質や補酵素結合部位）や四次構造、反応様式など付加的な情報を得ることができる。
- ⑤ 乳酸脱水素酵素の基質、補酵素結合部位と推定されるアミノ酸について調べる。

(2) 得た情報を基に、立体構造で活性部位のアミノ酸を表示してみる。ウサギ由来の酵素の立体構造は未解明のため、ヒトの乳酸脱水素酵素で相同性のある部位があれば、2. で行った pdb viewer を用いて、ヒト乳酸脱水素酵素の立体構造上に表示させる。Trp との位置関係により、立体構造変化と活性の相関について考察する。



Human LDH の三次元立体構造

【ワークシートについて】

- ・タンパク質解析法 I, II については、それぞれレポートを提出。
- ・酵素活性測定法 I, II とタンパク質の構造と機能 I, II については、4 回分をまとめてレポートにして提出。提出期限は授業中に指示します。

【各実習項目における手法とキーワード】

- ・タンパク質解析法 I, II
HPLC, FPLC, 四次構造解析、分子量決定法、Native-PAGE, SDS-PAGE, 画像解析
- ・酵素活性測定法 I, II
補酵素を指標とした活性測定法、酵素反応速度論、ミカエリス定数、最大反応速度、酵素の熱安定性、熱失活、変性、データ変換およびデータ解析法
- ・タンパク質の構造と機能 I, II
蛍光スペクトル、一次構造、二次構造、三次構造、構造安定性、スペクトル解析法、データベース利用法、三次元立体構造、構造情報、活性部位

【参考文献】

- ・新生化学実験講座 1 タンパク質 I 分離・精製・性質 東京化学同人
- ・新生化学実験講座 1 タンパク質 III 高次構造 東京化学同人
- ・新生化学実験講座 1 タンパク質 V 酵素・その他機能タンパク質 東京化学同人
- ・新生化学実験講座 20 機器分析概論 東京化学同人
- ・生体高分子の高速液体クロマトグラフィー 廣川書店
- ・蛋白質・酵素の基礎実験法 南江堂

【教員の連絡先】

佐藤高則 総合科学部 3 号館北棟 3 階 生物化学研究室

e-mail tsatoh@tokushima-u.ac.jp

HP : <http://www.geocities.jp/satokichi2004jp/syllabus/jyugyou.htm>