

## 1P025

高圧<sup>1</sup>H-NMRと高圧蛍光測定法を用いて観測した鶏リゾチームの構造ゆらぎ

○前野 覚大<sup>1</sup>、鎌足 雄司<sup>2</sup>、横山 茂之<sup>3,4,5</sup>、赤坂 一之<sup>1,3</sup> (1 近大院・生物理工・生物工、<sup>2</sup>岐阜大・人獣感染防御研、<sup>3</sup>理研・播磨、<sup>4</sup>理研・GSC、<sup>5</sup>東大院・理)

蛋白質は結晶構造の様に決められた一つだけの構造を取り溶液中に存在しているのではなく、基底構造から変性構造の間で熱力学的平衡状態にある。この構造の揺らぎは、蛋白質の多様な機能の発現やアミロイド形成と密接な関係があると考えられる。通常、常圧下において溶液中の蛋白質の揺らいだ構造を観測しようとしても、基底構造の存在比が大き過ぎ、揺らいだ構造を捉える事ができない。しかし、圧力をかける事で変性構造の存在比が増え分光法を用いた構造揺らぎの観測が可能となる。本研究では鶏リゾチームを対象に、蛋白質の基底構造から変性構造への各アミノ酸残基レベルでの構造転移を800MHz高圧NMRで観測した。-5℃・pH2.0での高圧<sup>1</sup>H-NMR測定(3-400MPa)の結果、400MPaにおいてほぼ完全に変性したスペクトルを観測し、およそ二状態で構造転移が進む事が確認された。そこで、基底構造から変性構造への構造遷移は二状態で進むと仮定し、pH 2.0、幅広い圧力(3-400 Mpa)・温度(-10-42℃)域における高圧蛍光測定を行い、熱力学的安定性(ΔG)を調べた。ΔGの温度依存性の結果、最安定温度は約15℃である事が示された。また、ΔGの圧力依存性の結果から変性に伴う部分モル体積変化(ΔV)が強く温度に依存する事が示された(-13.2±0.2 ml/mol(42℃)、-89.1±1.5 ml/mol(-5℃))。この結果から、著者らはpH2.0における鶏リゾチームの温度-圧力の相図を作成した。過去の文献において4℃と35℃でのヒトリゾチームの構造を比較した結果、低温ではドメイン間のhinge部分に大きな構造変化が認められた。ヒトと鶏のリゾチームはアミノ酸配列で約60%の相同性があり、三次構造においても高い相同性を持つ(H. Kumeta et al, Bio chem., 2003)。この事から、今回のΔVの強い温度依存性は低温に伴う大きな構造の揺らぎを示したと考えられる。

A. Maeno, Y. O. Kamatari, S. Yokoyama and K. Akasaka : Conformational fluctuation of hen lysozyme studied by high-pressure <sup>1</sup>H-NMR and fluorescence spectroscopy

## 1P027

部位特異的スピンラベル法を用いたNADPH oxidaseのp47<sup>phox</sup>サブユニットのリン酸化による構造変化の解析

○鈴木 友子<sup>1</sup>、稲波 修<sup>2</sup>、桑原 幹典<sup>2</sup>、稲垣 冬彦<sup>3</sup>、平岡 和佳子<sup>1</sup> (1 明治大・理工・物理、<sup>2</sup>北大院・獣医・放射線、<sup>3</sup>北大院・薬学・構造生物)

生体防御において重要な役割を果たす食細胞NADPH oxidase複合体の細胞質因子の一つであるp47<sup>phox</sup>は2つのSrc homology 3 (SH3)ドメインを持っており、resting stateではC-末側リン酸化部位の上流にあるpoly-basic領域と結合して自己抑制型の立体構造をとりp22<sup>phox</sup>との結合からマスクされていると考えられている。本研究ではp47<sup>phox</sup>C-末側のSH3ドメイン中とpoly-basic領域近傍に部位特異的スピンラベル剤を導入し、近接した2つのニトロオキシド間に働く双極子-双極子相互作用によるline-broadeningを利用した分子間距離の算出を試み、p47<sup>phox</sup>のリン酸化に伴う構造変化を追跡した。実験は、ヒトp47<sup>phox</sup>における150-340のアミノ酸領域長を持つ組み換えタンパク質を作成し、SH3ドメインのT238とpoly-basic領域のA298の2箇所について、それぞれシステイン残基に改変したT238C、A298Cと両方を改変したT238C/A298Cの3種類の変異体を作成した。これらの変異タンパク質にmethanethiosulfonate スピンプローブを反応させ部位特異的スピンラベルを行い、室温でCW-ESRによる測定を行った。T238C/A298Cの変異体から得られたESRスペクトルにはline-broadeningが観察され、T238CとA298C単独変異体から得られたスペクトルと併せてFourier deconvolution法によって解析し、得られたbroadening functionより238と298間の距離は、16.2Åと算出された。リン酸化後には、このline-broadeningがやや抑制され2点間の距離は21.5Åとなった。-10℃でのESR測定においても、室温と同様の結果が得られた。これによりリン酸化に伴いSH3ドメインとpoly-basic領域の相互作用が減少することが示された。

T. Suzuki, O. Inanami, M. Kuwabara, F. Inagaki and W. Hiraoka : Phosphorylation-induced conformational change of NADPH oxidase subunit p47<sup>phox</sup>: A site-directed spin labeling (SDSL) study

## 1P026

## 水溶液環境下でのディスタンスジオメトリ法によるタンパク質の構造決定: simulated annealingによる構造精密化

○山根 努、池口 満徳、木寺 韶紀、岡村 英保、西村 善文 (横浜市大院・国際総合科学・生体超分子)

〔緒言〕NMRによるタンパク質の立体構造解析では、NOE情報の乏しい、溶媒領域に露出した部分や運動性の高い領域に関して、正確な構造決定が困難である。一方、近年計算機の性能向上に伴い水分子やイオンを含んだ現実に近い系でのシミュレーションが容易となってきた。そこで、現実の状況を正しく反映した水溶液中の環境を用いたディスタンスジオメトリの計算を行うことで、構造情報の少ない領域の情報を補償できると考えられる。特に、水を含んだ系でのsimulated annealingを行い、コンフォメーション探索を行うことにより、より精度の高い構造を得られることが期待される。以上の背景を踏まえ本研究では現実の状況を正しく反映した水溶液中の環境でのNOE情報に基づく拘束条件下での分子動力学シミュレーションおよびsimulated annealingを実行し、従来のディスタンスジオメトリの計算により得られた構造の精密化を試みた。〔方法〕NMRによるタンパク質の構造決定を行うプログラムCNS (Brunger et al.)において用いられている拘束関数を、われわれのグループで開発した生体高分子の分子動力学計算プログラムMARBLE (Ikeguchi et al.)に移植した。力場にはCHARMM22及びCHARMM27を用いた。そして、水及びイオン存在下での静電相互作用が支配的なDNA-タンパク質複合体の精密構造決定を試みた。そして、水溶液環境下でのNOE情報に基づく拘束条件下での構造の特徴とくに、DNA-タンパク質複合体のインターフェイスに関する構造及び水素結合及び、複合体近傍に存在する水の分布に関して詳細な検討を行った。詳細は当日の発表で報告する。

T. Yamane, M. Ikeguchi, A. Kidera, H. Okamura and Y. Nishimura : Structural analysis of proteins in aqueous solution by distance geometry method: structural refinement by simulated annealing.

## 1P028

## ヒト由来グリシン開裂酵素系Tタンパク質の結晶構造解析

池田 和子<sup>1</sup>、○保坂 晴美<sup>2</sup>、吉村 政人<sup>2</sup>、山下 栄樹<sup>2</sup>、藤間 祥子<sup>3</sup>、中川 敦史<sup>2</sup>、藤原 和子<sup>1</sup>、本川 雄太郎<sup>1</sup>、谷口 寿章<sup>1,4</sup> (1 徳島大分子酵素、<sup>2</sup> 阪大蛋白研、<sup>3</sup> 熊本大医薬、<sup>4</sup> 理研)

グリシン開裂酵素系は、生体内でのグリシン分解反応において重要な役割を担う複合酵素系で、4種類のタンパク質(P, H, TおよびLタンパク質)で構成される。先天性代謝異常症の一つである高グリシン血症患者では、この酵素系のPあるいはTタンパク質の遺伝子に変異が認められ、分解されなかったグリシンが体液中に高濃度に蓄積し、痙攣、無呼吸症などの様々な神経症状を呈する。今回、ヒトTタンパク質単体および補酵素誘導体(5-CH<sub>3</sub>-Hfolate)との複合体の結晶構造を2.0および2.6Å分解能で解析した。結晶化は25℃においてハンギングドロップ蒸気拡散法で行なった。タンパク質濃度10mg/ml, 2.2M硫酸アンモニウム, 0.1Mクエン酸ナトリウム(pH 5.6), 0.2M酒石酸ナトリウムカリウムの条件で良質な針状晶(0.02×0.03×0.72 mm)が得られた。大型放射光施設(SPring-8)のビームラインBL44XUにて測定を行ない、2.0Å分解能のデータを得た。1mM K<sub>2</sub>PtCl<sub>4</sub>の溶液に6時間ソーキングすることで白金の置換体を得、白金による異常分散効果を利用したSAD法により構造を決定した。5-CH<sub>3</sub>-Hfolateとの複合体は、2.1M硫酸アンモニウム, 0.1Mクエン酸ナトリウム(pH5.6), 0.2M酒石酸ナトリウムカリウム, 20%グリセロール, 2mM補酵素誘導体に24時間ソーキングすることで得た。ヒトTタンパク質は、3つのドメインがクローバー葉状配置された構造をしており、中央に5-CH<sub>3</sub>-Hfolateが結合する空洞を有する。この空洞はいくつかの張り巡らされた水素結合ネットワークで支えられており、高グリシン血症で変異が同定されたアミノ酸の多くが、これらネットワークに影響を及ぼすことが明らかになった。

K.Okamura-Ikeda, H.Hosaka, M.Yoshimura, E.Yamashita, S.Toma, A.Nakagawa, K.Fujiwara, Y.Motokawa and H.Taniguchi : Crystal Structure of Human T-protein of Glycine Cleavage System