2PA009

還元型チトクロム c_3 の NMR による構造解析

○原田英里砂,¹大村友章, 福西有間,²河合剛太,³渡辺公綱, 阿久津秀雄(横浜国大・工,¹三菱重工基盤研,²千葉工大,³東大・院工)

【緒言】硫酸還元菌 Miyazaki F 株のチトクロム c_3 は酸化還元電位が²300mV と非常に低く 1 分子中に 4 つの c 型ヘムを持つ分子量約 14000 の蛋白質である。我々はその電位と構造との関係を解明するため、完全還元型チトクロム c_3 の構造を溶液 NMR により解析した。

【実験】安定同位体 ¹⁵N 標識を行い、Bruker 600MHz, 500MHz, 400MHz の分光器で 2 次元 HSQC, HMQC-J, 3 次元 TOCSY-HSQC, NOESY-HSQC を測定した。

【結果・考察】連鎖帰属法により N 末・Pro を除く観測可能な主鎖の 102 残基のアミドプロトン全てを帰属し、ケミカルシフトインデックスを含む Sequential NOE パターンを作成した。その結果、完全酸化型結晶構造と比較して 2 次構造に大きな変化はなく、溶液中でも 2 次構造は保存されていることが分かった。ただし、局所的な変化が示唆された部分があり、現在、X-PLOR を使い構造計算を進めている段階である。また、8 つの軸配位子ヒスチジンイミダゾール NH プロトン全てが帰属できた。化学シフト異方性を定量的に求めた結果、イミダゾールの ¹H の化学シフトの異方性が主鎖のアミドプロトンよりもはるかに大きい値を示し、化学シフト異方性の値は水素結合と関係があることが知られており、イミダゾールの ¹H とアミドプロトンとの性質の違いが明らかになった。

E. Harada, T. Ohmura, A. Fukunishi, G. Kawai, K. Watanabe and H. Akutsu: Structure analysis of ferrocyanochrome c_3 by NMR

2PA011

線虫由来抗菌ペプチド ASABF の大量発現及びその NMR による立体構造解析

○相沢智康¹, 小金沢望¹, 松浦篤志¹, 鈴木政人¹, 星野宏和¹, 田谷内政人¹, 藤谷直樹¹, 宮澤光博², 加藤祐輔², 熊木康裕¹, 出村誠¹, 河野敬一³, 引地邦男¹, 新田勝利¹
(¹北大・理,²農水省・蚕糸昆虫研,³富山医薬大・薬)

様々な生物において、レクチンや抗菌ペプチドなどの抗菌物質は生体防御の上で重要な働きを果たしている。特に記憶免疫システムを持たない無脊椎動物においては、主要な生体防御機構であると考えられ、生体防御系の進化を考える上でも興味深い。本研究では、ブタの小腸に寄生する線虫 (*Ascaris suum*) の体液に含まれ、抗菌活性を持つ 71 残基から成るペプチド、ASABF (*Ascaris suum* antibacterial factor) の大量発現系の構築及び立体構造解析をおこなった。

ASABF の cDNA を、酵母 *Pichia pastoris* に組み込み、メタノール代謝酵素のプロモータを利用して、誘導をかけることで、ASABF を培地中に分泌させることに成功した。この培地から精製をおこない、培地 1L あたり数十 mg 程度の試料を得た。この試料の活性を測定したところ、天然の ASABF と同様の抗菌作用を持つという結果が得られた。そこで、この試料について NMR を用いて、2 次構造および 3 次構造を解析した結果、N 末端側に 1 つの α ヘリックス、C 末端側に 2 本鎖逆平行 β シートを持ち、これらをジスルフィド結合がつなぐ、Cysteine-Stabilized $\alpha\beta$ (CS $\alpha\beta$) モチーフを持つことが明らかになった。このモチーフは、抗菌ペプチド Insect defensin などにも見られる基本構造であるが、ASABF は、このスーパーファミリーと比較して、ジスルフィド結合が 1 本多く、その構造と機能の差異について検討中である。

T. Aizawa, N. Koganesawa, A. Matsuura, M. Suzuki, H. Hoshino, M. Tayauchi, N. Fujitani, M. Miyazawa, Y. Kato, Y. Kumaki, M. Demura, K. Kawano, K. Hikichi, K. Nitta : Overexpression and NMR structure of an antibacterial peptide from a nematode, ASABF

2PA010

EBIN の MPH ドメインの NMR による構造解析

○小柴生造^{1,2}, 木川隆則^{1,3}, 菊池章⁴, 横山茂之^{1,2,3}
(¹理研 細胞情報伝達,²東大 理,³理研 ゲノムセンター,⁴広島大 医)

EBIN(epsin)は、POB1 タンパク質の EH(Eps15 homology)ドメインに結合する分子として同定された、551 残基からなるタンパク質である。このタンパク質はクラスリン依存性のエンドサイトーシスに関与することが明らかになっており、C 末端領域で EH ドメインと、中央領域で α -adaptin と結合することが報告されているが、詳しい機能は不明である。このタンパク質の N 末端領域には、EBIN ファミリーの間で配列上のホモロジーの高い 144 残基からなる領域が存在し、MPH (ENTH) ドメインと命名された。その後、このドメインが EBIN ファミリー以外のタンパク質にも存在することが報告され、エンドサイトーシスや細胞骨格系で重要な役割を果たしていると考えられているが、その機能及び立体構造に関する研究はこれまで報告されていなかった。本研究では、EBIN の MPH ドメインの立体構造を NMR を用いて解明するため、その大量発現系及び精製方法を確立し、NMR 測定を行った。

まず、EBIN の MPH ドメイン(1-144 残基)を GST 融合タンパク質として大腸菌 BL21 で発現させ、アフィニティーカラムで精製後、Thrombin で切断し、さらに Resource S カラムで精製した。CD スペクトルを測定してバッファー条件を検討した後、¹⁵N 標識された試料を用いて 2D ¹⁵N-HSQC スペクトル等を測定した。現在、¹³C,¹⁵N 標識された試料を用いて各種多次元 NMR スペクトルを測定中で、今後シグナルを帰属し、構造計算を行って立体構造を決定する予定である。

S. Koshiba, T. Kigawa, A. Kikuchi, S. Yokoyama: NMR study of the MPH domain of the human EBIN protein

2PA012

プロテアーゼインヒビター POIA1 の溶液内立体構造

○吉永壮佐, 笹川拓明, 田村厚夫, 赤坂一之,
¹小島修一, ¹三浦謙一郎

(神戸大・自然科学, ¹学習院大・生命分子研)

Pleurotus ostreatus proteinase A inhibitor 1 (POIA1) は食用きのこヒラタケの産出する分子量 8267、残基数 76 のタンパク質で、同起源のセリンプロテアーゼ proteinase A を特異的に阻害する立体構造未知のインヒビターである。POIA1 と、枯草菌のセリンプロテアーゼ subtilisin をフォールディングさせる分子内シャペロン propeptide とを比較すると、アミノ酸配列に約 20% の相同性があり、また、同程度の大きさを持つこと、疎水性、親水性領域を共有していること、荷電性残基に富むこと、SS 結合がないこと等の共通性が見られる。

そこで POIA1 の立体構造を決定し、これより分子内シャペロンとの構造および機能の相同性、新規のインヒビターとしての阻害機構、タンパク質の分子進化を探ることにした。なお propeptide の立体構造に関しては、subtilisin との複合体が X 線構造解析によって決定されており、propeptide 部分は 2 本の α -helix と 5 本の β -strand を持つが、propeptide 単独では溶液中において立体構造をほとんど持たないことが知られている。

本研究では、標識なし、¹⁵N 標識、¹⁵N・¹³C 二重標識の 3 種類の POIA1 を大腸菌の発現系を用いて生合成し、異種核相関多次元 NMR 測定を行った。POIA1 には 2 本の α -helix と 4 本の β -strand が存在することが示され、現在 ¹H 核間の NOE から立体構造計算を行っており、その結果を propeptide の構造と比較して報告する。

S. Yoshinaga, H. Sasakawa, A. Tamura, K. Akasaka, S. Kojima, K. Miura : Solution structure of a proteinase inhibitor POIA1