2PA013

プリオン蛋白質(PrP)タンデムリピートの立体構造
— NMR法を用いたモデルペプチドの構造解析○吉田均¹、熊木康裕¹、松嶋範男²、引地邦男¹、中田充夫¹
(¹北大・理・生物科学、²札幌医大 保健医療)

プリオン蛋白質(PrP)は主に脳・神経組織で発現する約200残基からなる蛋白質である。この蛋白質の構造変化により生じる変異型蛋白質が、クロイツフェルト・ヤコブ病、スクレイピー、牛スポンジ状脳症などの致死性の脳症を引き起こすという仮説が提案され、広く受け入れられている。PrP蛋白質の生体内での本来の機能についての研究は遅れていたが、1997年に正常なPrPは銅イオンに結合し脳内での銅イオン濃度調整に関与している可能性が高いことが指摘された。PrPのN末端側には8残基PHGGGWGQが5回繰り返したタンデムリピートが存在する。この配列のモデルペプチドに銅イオンが結合することが報告され、この領域がPrPの生理的機能を発現することが示唆されている。また、このタンデムリピート領域を含むPrP全長の立体構造が、1997年にK. WuthrichらはマウスPrP、P. E. WrightらはハムスターPrPを用いてNMR法により解析されている。しかし、タンデムリピート領域はピークの重なりにより距離情報や角度情報が現在まで得られていない。

タンデムリピート領域の構造をより詳細に明らかにすることは、銅イオンとの結合の機構等を理解する上で重要である。本研究の目的は、このタンデムリピート領域の構造を明らかにすることである。ピークの重なりによるピークの帰属のあいまさを解消するために、我々は1回及び2回単位配列を繰り返したモデルペプチドを作成した。さらに、立体構造の自由度を減少させることを期待して環状化ペプチドも作成した。鎖状および環状のペプチドを低温下で測定することにより安定な構造の形成を促進した。測定に用いた全ペプチドにおいて、PHGGGWGQ単位配列由来のピークの完全帰属に成功した。ケミカルシフトの温度係数、NOEなどの構造パラメーターから、GWGQでターンを形成していることが示唆された。モデルペプチドから得られた構造情報をもとにプリオン蛋白質のタンデムリピートの構造を検討中である。

H. Yoshida, Y. Kumaki, N. Matsushima, K. Hikichi, M. Nakata: Structural study of tandem repeat sequences within prion protein(PrP) - NMR analysis of the model peptides

2PA015

NMRによるCa²⁺チャネルアクチベーターImperatoxin Aの立体構造決定

○竹内 恒²、金 載一¹、高橋栄夫³、佐藤一紀¹、嶋田一夫¹
(¹東大・院薬系、²光科学技術院、³三菱化学生命研)

[目的] Imperatoxin A (Iptx A)は *Pandus imperator* から得られた、アミノ酸33残基からなるペプチド毒である。Iptx Aは、筋小胞体のリアノジンレセプター (RyR) に作用し、RyRをsubconductance stateに安定化することで活性化することが知られている。Iptx Aは塩基性アミノ酸残基に富み、3本のジスルフィド結合(C3-C17、C10-C21、C16-C32)を持つ。Iptx Aの変異体を用いた活性測定の結果より、塩基性アミノ酸残基のうちR23は活性発現に重要な残基であるのに対し、K8は活性に関与しないことが明らかになっている。本研究ではIptx Aの立体構造をもとに、Iptx AのRyRに対する結合部位を明らかにすることを目的とした。

[方法] 固相合成法によりIptx Aを化学合成した。常法に従い、¹H NMRにより、Iptx Aの立体構造を決定した。

[結果、考察] Iptx Aはジスルフィド結合で架橋、安定化された3本のβストランド(K8-C10、K20-R23、K30-R33)から構成されるシステンノットモチーフを持つことが明らかとなった。このモチーフはω-agatoxin、ω-conotoxin類に代表されるペプチド性チャネルブロッカーと共通であるものの、βストランド間を結ぶセグメント(C10-K20)の立体構造は大きく異なっていた。またIptx Aの表面において、活性に重要であったR23と、活性に無関係だったK8とは、お互いに分子の反対面に存在することが判明した。R23を含む表面はRyRとの結合面であると考えた。ここにはD13、K19、K20、K22、R23、R24、K30が存在し、正・負電荷による特徴的な電荷のパッチを形成している。この電荷分布によりIptx AはRyRに結合し活性を示すものと結論した。

K. Takeuchi, J. I. Kim, H. Takahashi, K. Sato, I. Shimada: Three-dimensional structure of calcium channel activator Imperatoxin A determined by NMR spectroscopy.

2PA014

サイトカイン LECT2 のリフォールディングと NMR による高次構造解析

○伊藤三恵¹、永田宏次²、山越智³、鈴木和男³、田之倉優¹(¹東大・院農生科・応生化、²同・生物生産工学研究セ、³国立感染研・生物活性物質部)

[目的] LECT2は好中球走化因子であり、ヒト好中球の機能を制御するタンパク質として造血系腫瘍細胞株から単離精製され、遺伝子もクローニングされた。LECT2はアミノ酸133残基、分子量約16Kの塩基性タンパク質で、肝臓に特異的に発現している。その作用機構は明らかになっていない。本研究は、LECT2の作用機構解明のために高次構造を明らかにすることを目的としている。今回、NMRによる構造解析を行うために、大腸菌による大量発現系の構築と発現タンパク質のリフォールディングと各種分析を行った。

[方法と結果] NMRを用いた高次構造解析に向けて、測定に十分な量を得るために、LECT2の大腸菌を用いた大量生産系の構築を試みた。LECT2のN末端に(His)₆-tagを付加し、これをT7プロモーターを持つpET-21(a)ベクターに挿入して発現プラスミドを作成した。生産された(His)₆-LECT2はインクルージョンボディを形成し、大部分が不溶性画分となった。可溶性タンパク質として生産させるために様々な培養条件や発現プラスミドの改良を試みたが、可溶性画分への発現の増加は見られなかった。そこで、インクルージョンボディからの可溶化、リフォールディングを試みた。不溶性タンパク質に8M尿素を添加して可溶化し、Ni-NTA-agaroseカラムに結合させた後、尿素濃度をゆっくり落とすことにより、リフォールディングした。精製は、逆相HPLC、ゲル濾過クロマトグラフィーで行った。Ni-NTA-agarose上に固定したまま巻き戻すという手法を取り入れたことで巻き戻し過程のタンパク質間相互作用を減少させることができ、効率の良い巻き戻しに成功した。こうして得た再生(His)₆-LECT2の円二色性(CD)スペクトル及び核磁気共鳴(NMR)スペクトルを、CHO細胞から発現・精製したLECT2のものと比較した。CDスペクトルは230nmにβ構造を示唆する特有の山を持つCDパターンを示すことで一致した。さらに、NMRスペクトル(¹H-¹H NOESY)においてもシグナルが一致したことから、大腸菌由来の(His)₆-LECT2はCHO細胞由来のLECT2と同じコンフォメーションを持つことが示された。こうして確立した系を用いて、¹⁵Nおよび¹³C¹⁵Nで標識した(His)₆-LECT2を調製し、3核3次元NMRの測定と解析を進めている。非常に分離の良いスペクトルが得られており、今後は、NMRデータに基づく二次構造・三次構造解析を行う。

M. Ito, K. Nagata, S. Yamagoe, K. Suzuki, M. Tanokura: Refolding and structural analysis of the cytokine LECT2

2PA016

好熱菌F1-ATPase α3β3γ複合体の結晶化

○¹白木原康雄、²神原稔、³天野豊己、³角田聡、³宗行英朗、¹白木原千佳子、¹白鳥綾、³吉田賢右 (¹国立遺伝学研究所、²兵庫教育大、³東工大生命理学)

F1ATPase (F1:サブユニット組成α3β3γδε)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。私たちがコア複合体α3β3複合体のヌクレオチド非存在下の結晶構造を解いた。その後、同複合体のヌクレオチド結合型の構造を決定する試みを行ってきたが、同時にγサブユニットを含むα3β3γ複合体の結晶化実験も並行して行ってきた。この結晶化実験の結果について述べる。なおα3β3γ複合体はα3β3複合体とは異なり、F1とほぼ同様な酵素的な性質を示す。

α3β3γ複合体の結晶化条件の探索はα3β3複合体の結晶化条件を起点として行った。初期の実験から、添加塩はNaClが、pHはα3β3複合体の場合よりも0.7pH単位低く、ヌクレオチドが存在する方が良く、精製に付加的に使用したBlueBカラムはタンパク質を純化するが結晶化には影響を与えないことがわかった。

その後結合ヌクレオチドの制御、標品の保存条件の改善など蛋白質がわの検討と同時に結晶化条件の検討も加えたが、ときおり大きな結晶ができるものの、再現性に乏しい、結晶が融解しやすいなどの問題が残った。更に精製、結晶化条件を検討し、精製に関しては熱処理をする、硫酸分画を併用する、などの手段をこうじると結晶化再現性が向上すること、結晶化に関しては添加ヌクレオチドとしてATPγSが有効なこと、結晶の融解を防ぐために従来の15度での結晶化を25度で行うようにすると沈殿剤の種類、最適pHが変わることなどをみだし、これらは全体として結晶化の再現性、形状、大きさの向上、結晶の扱いやすさの向上に大きく寄与した。

Y. Shirakihara, M. Kambara, T. Amano, S. Tsunoda, E. Muneyuki, C. Shirakihara, A. Shiratori & M. Yoshida: Crystallization of F1-ATPase α3β3γ sub-assembly