2PA025

分子置換法によるタンパク質解析のための初期モデルの構築
 ○木下賢吾 1,2、楠木正巳 1、菅原肇 1,2、栗栖源嗣 1、小佐田高史 1、広瀬雷太 3、田中信夫 3
 1 阪大・蛋白研、2 科学技術振興事業団、3 東工大・生命理工

X線結晶解析によるタンパク質立体構造の決定は、タンパク質の機能を理解する上で重要な手段である。近年その手法は洗練され数多くの立体構造が解明されてきたが、まだ構造決定にはさまざまな困難がともなう。特に位相決定問題は、結晶化を別にすれば、もともと困難な問題である。通常、位相の決定は同形置換法、多波長異常分散法、分子置換法でなされるが、今後より多くの立体構造を解明するためにできるだけ自動化したいという要請と、すでに数多くの立体構造が明らかにされてきたことを受けて、分子置換法の重要性が高まってきている。分子置換法では、解析したい構造と似ていると思われる構造を初期モデルとし位相未知のX線回折データの解析を行う。通常、このための初期モデルとしては、最も配列が似た構造を採用するか、あるいはその類似構造に試行錯誤で変更を加えたものが用いられてきた。これに対して本研究では、分子置換法を利用した自動結晶解析手法の開発を目指して、配列のみから初期モデルを構築する方法の開発を行った。

すでに行われている様々な分子置換法の適用例を見ると、分子置換法のための初期モデルに求められる条件は、できるだけ多くの原子をモデル内に含める一方で、構造変化が予想される部位はできるだけモデルから取り除くことである。この要請をみたくモデルを以下のようにして構築した。PDB 中にある相同配列をもつ構造をできるだけ多く拾い出す。次にこれらの構造を総当りで比較(この比較は全原子種を考慮する)を行い、立体構造のマルチプルアライメントを作る。このアライメントをもとに、構造保存部位を特定し、その保存部位の平均構造をモデルとする。このようにして、構造変化が予想される部位を自動的に特定する。ポスターでは、構築法の詳細と実際にいくつかのケースで分子置換法に適用した結果と、このモデル構築法を組み込んだ自動結晶解析システムのプロトタイプについて報告する。

kinosita@protein.osaka-u.ac.jp

2PA027

ヒト低分子量G蛋白質RhoA^{V14}-GDPにおけるスイッチ領域の柔軟性についての結晶学的研究
 ○伊原健太郎、清水敏之、前崎綾子、黒田真也、貝淵弘三、箱崎敏雄(奈良先端大学院・バイオ)

低分子量G蛋白質はRas, Rho, Ran, Rab, Arfなどのファミリーに分類され、Rhoファミリーは主に細胞骨格と細胞接着の制御に携わっている。これらは標的蛋白質との結合能を有するGTP結合型(活性型)と、結合能のないGDP結合型(不活性型)の2つの異なるコンフォメーションを有する分子スイッチであり、いずれの場合もマグネシウムイオンを介してヌクレオチドと強く結合する。活性型から不活性型への変換は、自らのGTPase活性とGTPase活性促進蛋白質(GAP)によって行われ、逆の変換はGDP/GTP交換蛋白質(GEP)によって行われる。すでに活性型RhoA (RhoA^{V14}-GTPγS: 1A2B)の構造解析は完了しており、不活性型RhoA (RhoA^{N25}-GDP: 1FTN)との構造比較により、スイッチIは28番目から44番目、スイッチ2は62番目から69番目のアミノ酸残基であることを明らかにしている。我々の使用する変異体の不活性型における立体構造も明らかにするため、RhoA^{V14}-GDPの結晶化を試みたところ、蛋白質溶液(5 mg/ml RhoA^{V14}-GDP, 5 mM DTT, 1 mM MgCl₂, 100 mM KCl, 10 mM HEPES pH7.5)に、等量のリザーバ溶液(1.2 M Li₂SO₄, 100 mM Citrate pH5.5)を混合した蒸気平衡法を行うことによって結晶が得られた。初期位相の決定には、RhoA^{N25}-GDPの結晶構造を用いた分子置換法を適用し、構造の精密化の後、2.0 Å分解能、 $R = 21\%$ 、 $R_{\text{free}} = 26\%$ のモデルを得た。今回の解析における最大の特徴はマグネシウムイオンに相当する電子密度が観測されなかったことであり、その原因として、比較的低pHと高い硫酸イオン濃度によるマグネシウムイオンの結合阻害が考えられる。マグネシウムイオンの不在は、大過剰のEDTA存在下で結晶化することからも確認された。マグネシウムイオンが無いためにGDPとスイッチIの相互作用は行われず、スイッチIはRhoA^{N25}-GDPに比べて大きく開いていた。その結果、GDPは溶媒領域に露出しており、GDPは容易に蛋白質から遊離できると予想された。実際、GEPはマグネシウムイオンの結合を妨げることによって、GDP/GTPの交換反応を触媒していると考えられている。今回の構造はGDP/GTP交換反応の中間体に類似している可能性がある。

K.Ihara, T.Shimizu, R.Maesaki, S.Kuroda, K.Kaibuchi, T.Hakoshima: Crystal structure of human RhoA^{V14} complexed with GDP.

2PA026

His-Aspリン酸リレーにおけるヒスチジン蛋白質ホスファターゼSixAとリン酸アナログ、タングステン酸(WO₄)との複合体の結晶構造
 ○浜田恵輔¹、加藤昌人²、清水敏之¹、水野猛³、箱崎敏雄¹
 (奈良先端大・バイオ¹、ハーバード大・医²、名古屋大・農³)

原核生物の細胞内情報伝達系の一つである二成分系において、環境変化のシグナルはセンサー蛋白質のヒスチジンキナーゼドメインに保存されるヒスチジン残基から、レギュレーター蛋白質のレシーバードメインに保存されるアスパラギン酸残基へのHis-Aspリン酸転移反応により伝えられる。この機構は酵母や植物などの真核生物にも見つかった。大腸菌嫌気性センサー蛋白質であるArcBは、これらドメイン間のリン酸転移反応を中継するリン酸転移ドメイン(HPTドメイン)を有しており、その立体構造は既に決定されている(1)。ヒスチジン蛋白質ホスファターゼSixAは、ArcBのHPTドメインのリン酸化ヒスチジンを脱リン酸化して、情報の流れを制御する因子で、機能及び構造的に新規の蛋白質である(2)。我々は、SixAの分子機能を立体構造に基づき考察するため、SixA単体のX線結晶構造解析に続いて、リン酸類似体であるタングステン酸(WO₄³⁻)との複合体の立体構造を決定した。

SixAの単体構造を初期モデルに用いて、10.0-2.2 Å分解能でSixA-WO₄³⁻複合体構造の精密化を行い、その過程で観測データと構造モデルとの差の電子密度マップからWO₄³⁻に相当する電子密度を確認した。現在までに、精密化プログラムX-PLORを使用し、R値16.0%、freeR値22.6%のモデルを得ている。SixAの全体構造は、中心部に6本のβストランドからなるβシート構造と、それを囲む5本のαヘリックスと2本の3₁₀ヘリックスから成り立っていた。WO₄³⁻は活性部位のポケット内で、触媒残基であるHis8やArg7, Arg55, His108といった塩基性のアミノ酸の側鎖と水素結合を形成していた。この結果に基づき、これらのアミノ酸残基が関与する脱リン酸化の触媒反応機構を考察できる。

1)Kato, M. *et al.*, Cell 88, 717-723 (1997)

2)Ogino, T. *et al.*, Molecular Microbiology 27, 573-585 (1998)

K. Hamada, M. Kato, T. Shimizu, T. Mizuno, T. Hakoshima: Crystal structure of protein histidine phosphatase SixA complexed with tungstate.

2PA028

ヒト低分子量G蛋白質Rhoとタンパク質キナーゼPKNのRho結合ドメインとの複合体の結晶構造
 ○前崎綾子、伊原健太郎、清水敏之、黒田真也、貝淵弘三、箱崎敏雄(奈良先端大学院・バイオ)

低分子量G蛋白質のRhoファミリーはRho, Rac, Cdc42などのサブファミリーから構成され、主として細胞骨格と細胞接着の制御に特異的に携わっている。その作用機構としては、他のGTP結合蛋白質と同様にGDP型からGTP型への変換によって活性化され、さらに下流のエフェクター蛋白質にシグナルを伝達することによる制御であることが明らかにされてきた。RhoAの標的蛋白質としては、PKNに代表されるRhoA結合領域にロイシンジッパー様モチーフを持つタイプIの蛋白質、RhoキナーゼなどのタイプIIの蛋白質、その他に属するmDiaなどの蛋白質が単離されている。このうち、PKN (Protein kinase N) はC末端側の触媒領域の配列がPKC (Protein kinaseC)に良く類似したセリン/スレオニンキナーゼである。そのN末端側には塩基性領域と、互いに類似したロイシンジッパー様モチーフの繰り返しがあり、このN末端側付近がRhoA結合領域であると考えられている。PKNの機能については、中間系フィラメントの動的制御、リン脂質による細胞骨格制御、dorsal closure などに関わっている可能性などが示唆されている。我々は、Rhoファミリーの標的蛋白質認識機構を立体構造学的に解明するために活性化状態にあるRhoAとPKNの複合体のX線結晶構造解析を試みた。構造解析には、活性型の状態を保持するために14番目のグリシンをバリンに置換してGTP加水分解活性を低下させたヒト由来の活性型RhoAを用い、PKNはRhoA結合領域である塩基性領域と、一つのロイシンジッパー様モチーフを含む7-155残基を用いた。結晶の非対称単位中には、RhoAとPKNが分子づつ存在し、PKNはRhoAのスイッチI領域、ストランドB2,B3、及びヘリックスA5でRhoAと静電的相互作用していた。PKNの構造は一本の短いαヘリックス(α1)と二本の長い逆平行αヘリックス(α2, α3)から構成されており、α3におけるロイシンの繰り返しは、α2-α3間の相互作用に関与しロイシンジッパー様モチーフを形成していた。我々は、その特徴的な逆平行ヘリックス構造をACC (Antiparallel Coiled-Coil) フィンガーと名付けた。また、結晶中でRhoAは結晶学的対称分子のPKNとも相互作用しており、前述の相互作用であるコンタクト1に対応してコンタクト2と名付けた。PKN上でのコンタクト2はコンタクト1の裏側に相当し、RhoAのスイッチIIと主に疎水的な相互作用を行っていた。これらの2つのコンタクト領域の存在の可能性についての考察を行う予定である。

R.Maesaki, K.Ihara, T.Shimizu, S.Kuroda, K.Kaibuchi, T.Hakoshima: Crystal Structure of Human RhoA Complex with the Effector Domain of PKN