2PA041

Delaunay 四面体分割を利用した局所構造の解析:
疎水コア
○輪湖 博 (早大・社会科学)

異なるタンパク質の立体構造間で共通に見出される局所構造モチーフを検出するため、Delaunay 四面体分割を利用する方法を昨年提案した[1]。この方法は、①それぞれの局所構造がコード番号で記述されるため、コンピュータで局所構造データを検索したり、統計的処理をするのに都合がよい、②局所構造が、Delaunay 四面体の辺(空間的に近接する残基間の相互作用を表わすと考えられる)のネットワークに注目して定義されるため、孤立した二次構造ではなく、その周囲にあるアミノ酸残基を含んだ構造要素として検出される、などの特徴をもち、昨年は、 α ヘリックスと β 構造について調べた結果を報告した[2]。

そこで本研究では新たに、4つの頂点がすべて疎水基で占められるような Delaunay 四面体を含む局所構造を、コード番号が付けられた局所構造を収集したデータベースから検索し、モチーフと呼べるような何か特徴的構造が浮かび上がって来るかどうか調べてみた。結果は、期待どおり、疎水コアを形成している特徴的なパターンがいくつか浮かび上がってきた。出現頻度の多かったものは次の3つの局所構造モチーフであった。

- α ヘリックスの疎水面を形成する残基からなる四面体。
- α/β 型構造をとる β シート上にある残基からなる四面体
- 2本の α ヘリックスの接触面にある残基からなる四面体。

具体的な構造や詳しい解析の結果については当日報告する。

[1] H. Wako & T. Yamato, *Protein Eng.* (1998) 11, 981-990.

[2] 輪湖 博、日本生物物理学会第 36 回年会 (1998); 第 5 回「タンパク質立体構造の構築原理」ワークショップ(1998)

H. Wako: Local-structure-motif analysis by Delaunay tessellation: Hydrophobic cores

2PA043

DNA 複製に作用するクランプローダーの電顕単粒子解析
○奥柳浩太¹、宮田知子¹、森川秋右¹、
Cann Isaac²、石野園子²、石野良純²
生物分子工研・¹構造解析研究部門、²機能解析プロジェクト部門

DNA 複製の伸長過程には、DNA ポリメラーゼに加えて、クランプ (大腸菌 Pol III β -subunit, Eukaryotic PCNA) 及びクランプローダー (Pol III γ -複合体, Eukaryotic RFC) と呼ばれる補助因子が必要である。クランプは、DNA ポリメラーゼを DNA 鎖上に保持することによって伸長反応を促進させる。ドーナツ型のクランプ環内に DNA 鎖を導入するために、クランプローダーがクランプを一時的に開環させると考えられている。クランプローダーの鋳型-ブライマーの認識及び、クランプの開環機構の解明は、DNA 複製を理解する上で大変重要である。古細菌にも、それぞれの機能に対応した真核生物のホモログが存在する。全ゲノム解析から古細菌の RFC は大小 2 種類の蛋白質で構成されていることが予想される。さらに真核生物の RFC の構成 (5 種類の相同性をもつ蛋白質) から類推して、古細菌の RFC は 4 分子の小サブユニット (RFCS) と 1 分子の大サブユニット (RFCL) から構成されると我々は予想している。

我々は *Pyrococcus furiosus* 由来の RFCS の分子形態を電子顕微鏡で観察した。はじめに RFCS を様々な pH のもとで重合させ、ウラニルアセテートで負染色し電子顕微鏡で film に記録、計算機により平均像を得た。pH 8.5 の条件では RFCS は主にリング状の形態をとり、その等高線マップで 6 つの非常に形の似たピークが確認されたことから 6 量体を形成していると推定できる。また pH 5.5 では 3 から 5 の subunit が重合し U 字型の形態をとることが確認できた。

次にリング状、U 字状の RFCS 重合体の立体構造を random conical tilt 法で解析した。試料ステージを電子顕微鏡内で傾けてとった像 (30°~60° 傾斜像) とそれと同じ視野の 0° 傾斜の像を pair で film に記録した。スキャナーで取り込んだ画像を単粒子解析用ソフト SPIDER で解析し、立体構造を back-projection 法で計算した。その結果リング状 RFCS の 30°~0° の対の電顕像から 3 次元再構成した 3D マップでは、6 つの subunit の密度のピークが明確に分離して見え、全体で外径約 110Å、内径約 45Å、高さ約 80Å のドーナツ状の構造をしていた。U 字状の RFCS に関しては、2 次元 projection マップ (0° 傾斜像) で個々の subunit が分離して確認できた。

K. Mayanagi, T. Miyata, K. Morikawa, I. Cann, S. Ishino, Y. Ishino: Single particle analysis of clamp loader by electron microscopy

2PA042

中性子結晶構造解析によるニワトリ卵白リゾチームの水素結合
○峯崎善章、新村信雄 (先端基礎研究センター、原研)

我々は中性子ラウエ回折計 (LADI) で収集したニワトリ卵白リゾチームの構造解析を行い、水素原子 960 個、水和水 157 個を決定した¹⁾。その後解析が進み、現在水和水 248 個を同定することが出来た。今回はこれらの結果を元にタンパク質内の水素原子を含めた水素結合の解析を報告する²⁾。

タンパク質の二次構造の形成・安定に重要な、N-H...O 型的主鎖間の水素結合について水素結合距離、水素結合角の解析を行ったところ、主に 2 つのグループに分類することが出来た。1 つは α ヘリックス内及び β ストランド間の水素結合で、もう一つはループ領域の水素結合である。

次に通常水素結合として議論される一重型水素結合 (X-H...Y) 以外の水素結合の解析を行った。二股及び三股水素結合の解析を行った結果、すでに報告されている低分子結晶内の二股及び三股水素結合の確率よりもタンパク質内でのそれは高いことがわかった。これは球状型タンパク質内では多くの水素結合アクセプターやドナーが密接して存在するので、二股及び三股水素結合を形成する可能性が低分子結晶より高いためと考えられる。 α ヘリックスや β シート内でもかなりの数の二股及び三股水素結合が見い出された。

さらに通常型ではない水素結合としてアロマテックリングの π 電子雲と水素結合のドナー間の水素結合であるアロマテック型水素結合³⁾も見つかった。今回の解析では、Trp62 のインドール環と水和水間に、同じタイプの水素結合が Trp123 で、また Phe3 の 6 員環と水和水間でも見つかった。

1) N.Niimura, Y.Minezaki, T.Nonaka, J.-C. Castagna, F.Cipriani, P.Høghøj, M.S. Lehmann & C. Wilkinson, *Nature Struct. Biol.* 4 (1997) 909-914

2) Y.Minezaki, T. Nonaka, N.Niimura, *J. Phys. & Chem. Solids* (1999) (to be published)

3) M. Levitt & M. F. Perutz, *J. Mol. Biol.* 201 (1988) 751-754

Y.Minezaki, N.Niimura : Hydrogen bonding study of HEW-lysozyme by neutron protein crystallography

2PA044

膜タンパク質内部の相互作用環境を基にした立体構造認識と分類 -- 7 本膜貫通ヘリックス型タンパク質 --
○諏訪牧子¹、Henrik. T. Yudate¹、増保安彦² (¹ヘリックス研究所) 美宅成樹² (²東京農工大・工)

膜タンパク質は、既知の立体構造が極めて限られるため、球状タンパク質で一般的な立体構造認識法を適用できず、配列情報だけから立体構造に直接結びつく情報を抽出する必要がある。膜内では、膜貫通ヘリックス間の相互作用環境が立体構造と直接相関を持つと考えられるので、ヘリックス周囲の相互作用領域の形で内部環境を記述すれば、実際の座標が無くても立体構造認識が可能はずである。

この考えを基に以下の手法を行った。(1)アミノ酸配列から膜貫通ヘリックス領域を予測し、ヘリックス周囲(N、C末端側)の相互作用領域を計算して、領域の形を特徴付ける3変数を抽出した。(2)タンパク質全体の立体構造を、6N個の座標(N本のヘリックス×2末端側×3変数)で記述した。そして2つのタンパク質の構造間の距離(SDS)を、6N個の座標の平均二乗距離として定義した。

この方法を、立体構造既知でヘリックスの本数が等しい膜タンパク質とその近縁ファミリーに適用したところ、同一構造ファミリー間では自己認識が可能であった。また、全く構造が異なるファミリー間では、配列Identityだけでは区別できないが、SDSで見ると実際の構造の違いの程度を認識できた。このことは、少なくとも非常に近い立体構造、または、全く異なる構造を認識するためのしきい値を決められることを示している。

さらに、立体構造は判らないが、実験的に関係が判っている7本膜貫通ヘリックス型の受容体ファミリーに適用したところ、立体構造既知の構造関係を確実に認識したSDS値を用いて、高感度、高選択性を保ったまま同種、別種のスーパーファミリーを認識できた。このことは、配列しか判らないファミリーに対して、信頼度が高い立体構造認識、および構造分類ができることを示唆している。

M. Suwa, H. T. Yudate, Y. Masuho, S. Mitaku

Classification of membrane proteins based on inner environment.

-- Proteins with seven transmembrane helices. --