2PA069

バクテリオロドプシンにおけるAsp85のプロトン化に誘起されるArg82およびVal49の構造変化
 ○谷生道一、辻 暁、山口 悟、河南るり子、内藤 晶、Richard Needleman¹、Janos K. Lanyi²、斉藤 肇（姫路工大・理、¹Wayne州立大、²California大）

バクテリオロドプシン (bR) のプロトン放出はAsp85のプロトン化によって誘起される。昨年の年会ではAsp85の電荷の消失が、Arg82、Glu204およびGlu194の側鎖間の相互作用を変化させることによって細胞外側膜表面部位 (Ala196およびAla126) の構造変化を誘起することを示した。しかしAla126の構造変化は、Asp85の電荷が失われている条件でのR82Qにおいては誘起されないことが分かり、その理由が不明なままであった。本研究では、特にこの問題を解析するため、固体高分解能¹³C NMRを用いて、プロトンポンプに関わる残基を部位特異的に変異導入した[3-¹³C]Alaおよび[1-¹³C]Val標識bRと野生株 (WT) の構造の比較を行い、これらの残基のbR高次構造への寄与を解析した。

[3-¹³C]Ala標識D85Nの¹³C CP-MASスペクトルでは、WTに比べ著しい構造変化が観測され、特に細胞外側膜表面部位のAla126および196が構造変化している。しかし、さらにR82Qの変異を加えると、Ala126の構造変化は起こらなかった (図)。一方Y83Fの解析から、Ala126の構造変化には近傍のTyr83の側鎖の変化が必要であることが示唆された。これらの結果は、D85NにおけるAla126の構造変化は、Arg82側鎖がTyr83近傍へと向くことで誘起されることを強く示唆する。また[1-¹³C]Val標識bRの解析から、Asp85-Val49間の相互作用についての知見も得られたので報告する。

M. Tanio, S. Tuzi, S. Yamaguchi, R. Kawaminami, A. Naito, N. Needleman, J. K. Lanyi, H. Saito : Conformational change of Arg 82 and Val 49 induced by protonation of Asp 85 in bacteriorhodopsin

2PA070

βラクトグロブリンのリガンド結合機構
 ○田口正弥、星野大、相本三郎、後藤祐児（阪大蛋白研）

βラクトグロブリン (βLG) は、リポカリンファミリーに属し、βバレル内の空洞に脂溶性物質を結合する。しかし、溶液中におけるリガンドの結合について詳細は不明である。そこで、βLG に対するリガンドの結合機構や結合様式、そして結合が構造に及ぼす影響を原子レベルで解明することを試みた。

まず、一定量のβLG に、レチノールを添加したところ、レチノール濃度の増加に伴い Trp の蛍光強度の減少が見られた。これは、βLG に存在する2個の Trp 蛍光が、空洞に結合したレチノールにより、消光されるためと考えられる。βLG 一分子につきレチノール一分子が結合すると仮定し、得られた滴定曲線を解析した結果、結合定数にして10⁶という値が得られた。次に、等温滴定型熱量計を用いて一定量のβLG に対しレチノールを添加した際の熱の出入りを観測し、それを指標として両者の結合を解析することを試みた。レチノールは水に難溶の為、メタノールを溶媒として用いた。そのため、レチノールの添加に伴いメタノールの希釈熱が発生し、解析が困難であることがわかった。現在様々な溶媒を用いて検討を行なっている。さらに、レチノールの結合が構造に及ぼす影響を調べるために、チオール(SH)反応試薬であるDTNB(5,5'-dithiobis(2-nitro benzoic acid))に対する反応性を調べた。βLG に存在する遊離のSH基はタンパク内部に埋もれており、ネイティブ状態ではほとんど反応しない。2M 尿素存在下、レチノール有無で、反応性を見たところ、レチノールの結合により、反応速度が大きく低下した。βLG には2つの結合部位が推定されており、そのうち1つはSHの傍にあると考えられている。レチノール添加によるDTNB反応性の低下はここに結合したレチノールが、DTNBの接近をさまたげている可能性がある。また、βバレル内部にレチノールが結合することによって、構造がより強固になっている可能性もある。これらのことを、原子レベルで明らかにするためにレチノール存在下、非存在下におけるβLG の¹⁵N-H HSQC測定を行った。この結果、いくつかの残基のピーク位置に変化が見られた。これらの残基は結合部位近傍に位置すると考えられる。

M.Taguchi, M.Hoshino, S.Aimoto, Y.Goto : Ligand binding mechanism of β-lactoglobulin

2PA071

CystatinA G4V 変異体は何故阻害活性を失うか？

○狩谷英里¹、須田真輔¹、楯 真一¹、梶 裕之¹、鮫島達也²、甲斐荘正恒¹

(¹都立大・理、²青学大・理工)

cystatinA はアミノ酸 98 残基からなるシステインプロテアーゼ阻害蛋白である。cystatin superfamily と呼ばれる一群のシステインプロテアーゼ阻害蛋白の family I に属しており、パパインなどと可逆的に複合体を形成することで、それらのプロテアーゼ活性を阻害する。しかしながら、その阻害機構の詳細に関しては未だに解明されておらず、様々なアミノ酸置換変異体を用いた生化学的な実験から阻害活性変化とアミノ酸置換に関する事実が集積されているが、それらの統一的な説明は困難であった。本研究では、cystatinA のアミノ酸配列のうち family1 における保存アミノ酸とされている Gly4 を Val に置換することにより、阻害活性を完全に失った G4V 変異体の NMR による立体構造解析を行った。得られた立体構造を野生型 cystatinA と比較することにより、G4V 変異体の不活性化の機構に関してより詳しい知見が得られるものと期待される。

cystatinA G4V 変異体の立体構造決定は、均一同位体標識体を試料とする通常の多次元 NMR 法を用いて行った。1803 個の距離情報と 93 個の 2 面角情報から得られた立体構造は、全体としては野生型の立体構造と大きく異なるものではないことは予想通りであったが、N 末端ペプチド鎖の向きに顕著な違いがみられた。このような N 末端近傍の立体構造が、いかにして cystatinA の活性発現と関わっているかに関しては、現在のところ推定の域をでないが、本発表においては、第一活性ループ周辺に見られる僅かな構造変化を中心に、N 末端の立体構造変化が阻害機構にどのように関わってくるのかを議論する予定である。

E.Kariya, S.Suda, S.Tate, H.Kaji, T.Samejima, M.Kainosho ; Relationship between three dimensional structure and the function for a CystatinA Variant,G4V

2PA072

システインプロテアーゼ阻害蛋白 CystatinA の P25S 変異体の立体構造解析-αヘリックスに存在する Pro 残基の役割について-

○榊原信久、橋真一、狩谷英里、須田真輔、梶裕之、鮫島達也、甲斐荘正恒（都立大・理、青学大・理工）

CystatinA はアミノ酸 98 残基からなるシステインプロテアーゼ阻害蛋白である。野生型 CystatinA の立体構造はすでに報告されており、αヘリックスの真中に位置する Pro 残基を境にαヘリックスが緩やかに湾曲していることが明らかになっている。Pro 残基の特徴としてヘリックスブレイカーとして働くことが知られているが、必ずしも Pro 残基の存在がヘリックスの折れ曲がりに結びつかず、その役割について統一された見解が得られていない。そこで、本研究では、αヘリックスに位置している Pro 残基を Ser へと置換した変異体の構造解析を行うことにより、CystatinA のαヘリックスに存在する Pro 残基の役割を明らかにすることを目的とした。

安定同位体標識した P25S 変異体の立体構造を 1871 個の距離情報と 90 個の 2 面角情報をもとに決定し、野生型と比較した。その結果、αヘリックスの真中に存在する Pro 残基を Ser へと置換しても湾曲が抑制できないことが判明した。CyatatinA では、広範囲にわたる相互作用によってαヘリックスの湾曲が規定されていることが示された。

N. Shimba, S. Tate, E. Kariya, S. Suda, H. Kaji, T. Samejima, M. Kainosho : Three dimensional structure of a cysteine proteinase inhibitor, Cystatin A, variant P25S. - a role for the Pro residue in the middle of an α helix-