1C1615

好熱性古細菌由来転写延長因子 NusA 蛋白質二量体の立体構造

○山崎 和彦^{1,2}、Allen Mark D.^{1,2}、鈴木 理^{1,2}（¹ 生命工研・構造生物、² 科技団・戦略基礎）

NusA 蛋白質は、 λ ファージ N 蛋白質による坑転写終結に必要な因子として大腸菌より発見された転写延長因子である。RNA ポリメラーゼや転写終結因子 Rho と相互作用して、転写の延長や終結において重要な役割を果たす。古細菌の転写延長・終結機構はほとんど未解明であるが、NusA ホモログがゲノム DNA 配列の決定された古細菌の全てより見いだされており、真正細菌の NusA 蛋白質と類似の必須機能をもつと考えられる。本研究では、好熱性古細菌 *Thermoplasma volcanium* 由来の NusA 蛋白質二量体（分子量 33kDa）の立体構造を NMR 分光法を用いて決定した。PCR 法によりゲノム DNA から NusA 遺伝子を単離し、大腸菌を用いて蛋白質を大量発現した。必要に応じて、¹³C および ¹⁵N の安定同位体標識を行った。750MHz および 500MHz の NMR 分光計を用い、サンプル温度 50 度で、立体構造決定に必要なスペクトルを測定した。得られた距離情報および角度情報をもとに simulated annealing 計算を行い、立体構造を決定した。単量体の構造は、3 本の α ヘリックスと 1 枚の 3 鎖 β シートからなる構造ドメインが、2 つ繰り返して構成されており、N 末端側ドメインの β シートと C 末端側ドメインの α ヘリックス 2 本が疎水性相互作用によりパッキングしていた。分子間接合面では、C 末端側ドメインの 3 鎖 β シートどうしが逆平行に繋がって 6 鎖 β シートを形成することにより、回転対称な二量体となっていた。

K. Yamasaki, M.D. Allen and M. Suzuki : Solution structure of a transcriptional elongation factor NusA of thermophilic archaeal origin in a dimeric form

1C1645

チオール基修飾 β ラクトグロブリンの NMR による構造解析

○柏井 宏之、坂井 和子、櫻井 一正、星野 大、後藤 祐児（阪大 蛋白研）

【目的】 ウシ β ラクトグロブリン (β LG) は中性で会合して二量体を形成しているが、遊離のチオール基 (Cys121) をチオール基修飾試薬で修飾することにより単量体へと解離することが知られている。そこで 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) で修飾した TNB- β LG を作製し、その二量体形成について分光学的、物理化学的手法を用いて研究を行った。

【方法】 β LG を 1M 塩酸グアニジン、30mM Tris-HCl (pH 7.5) 溶液の下で DTNB と反応させ、ゲル濾過カラムである G-25 に通して TNB- β LG を作製した。また、NMR 測定のために、¹⁵N の安定同位体で標識した β LG をメタノール資化酵母 *Pichia Pastoris* を用いて発現させ、同様の方法で修飾して使用した。

【結果・考察】 沈降平衡法を用いて酸性および中性における、未修飾の β LG および TNB- β LG の分子量や解離会合の平衡定数を求めた。その結果から未修飾の β LG に比べて TNB- β LG は中性においても、単量体の状態で存在する傾向が強いことが示唆された。また、CD および ¹H NMR スペクトルから TNB- β LG は酸性では天然構造に似た状態で存在するが、中性では、より構造が崩れた、中間的な立体構造をとることが明らかになった。また、¹⁵N 標識した TNB- β LG を用いて酸性において二次元 ¹H-¹⁵N HSQC スペクトルを測定した結果、幾つかの残基において、Cys 残基の修飾に伴い、化学シフトの変化が観測された。これらの残基は修飾部位を中心に二量体の会合面にまで及んでおり、二量体形成に影響を与えていることが示唆された。一方、重水素交換反応実験から、 β LG のコアの部分 (F、G、H ストランド) は、修飾後も高いプロテクションファクターが観測された。

H. Kashiwai, K. Sakai, K. Sakurai, M. Hoshino, Y. Goto : Structural analysis of thiol modified beta-lactoglobulin by using NMR

1C1630

SMN(Survival Motor Neuron) 蛋白質 Tudor domain の構造解析

○赤木 謙一¹、児玉 高志²、辻本 賀英²、京極 好正⁴、阿久津 秀雄^{1,3}（¹ 阪大・蛋白研、² 阪大・医学部、³ 横浜国立大、⁴ 福井工大）

SMN(Survival Motor Neuron) 蛋白質は 294 アミノ酸残基からなり、アポトーシス抑制経路で機能することや、RNA スプライシングに関与していることが報告されている。N 末端側の exon2、exon3 領域のアミノ酸配列（以下 Ex2、Ex3 と記す）には RNA 結合ドメインと考えられている Tudor domain と呼ばれるモチーフと一次構造上高い相同性のある配列が見られる。しかし Tudor domain を持つ蛋白質の立体構造は現在まで報告されておらず、機能の詳細についても不明な点が多い。Ex2、Ex3 は、一次配列から推定される性質などから、それぞれが独立な構造上のドメインを形成すると予想されたので、Ex2(64 残基) と Ex3(67 残基) の立体構造上の関係と機能との相関を明らかにするため、Ex2、Ex3 を独立に含むフラグメントと、両者が連続したフラグメントをそれぞれ核磁気共鳴法（高分解能 NMR）と円偏光二色性 (CD) 測定により解析した。試料調製は、それぞれのフラグメントの遺伝子をサブクローニングし、大腸菌を用いて大量発現、精製することにより行った。まず Ex3 部分の立体構造決定のため ¹⁵N 及び ¹⁵N、¹³C 安定同位体標識化試料を調製し、種々の異核種多次元測定法 (HNCA, HN(CO)CA, etc.) による測定を行った。その結果 Ex3 は、比較のリジッドな構造を持つことが分かった。CD 測定の結果からは、Ex2 はヘリックス部分とフレキシブルな部分からなることが予想され、また、Ex2、Ex3 共存下では、両者の相互作用による構造変化がみられた。これらの結果から、Ex3 は Tudor domain の構造的土台となっており、Ex2 がフレキシブルな領域を介して Ex3 と相互作用しているものと考えられる。

K.Akagi T.S.Kodama Y.Tsujimoto Y.Kyoungoku and H.Akutsu : Structure analysis of SMN protein

1C1700

マジック角試料回転 NMR を利用した溶液中蛋白質の残余双極子効果および化学シフト 異方性効果の観測

○天谷 哲康、島原 秀登、栗田 順一、楯 真一（北陸先端大・新素材センター）

近年、ディスク状のリン脂質膜 (bicelle) 共存下において弱く蛋白質分子を配向させることで、等方的な分子回転運動をしている溶液中蛋白質では通常観測できない異方的なスピン間相互作用の観測が可能となってきた。異方的なスピン間双極子相互作用は、bicelle 共存下では残余双極子効果として現れる。残余双極子効果の大きさは、相互作用するスピン間を結ぶ結合軸の静磁場に対する向きに依存する。また、¹⁵N 核などの大きな異方性化学シフトを持つ核の化学シフトは、通常の溶液条件下では、すべての異方性成分が平均化された等方的な化学シフトを示すが、分子配向した状態では化学シフトテンソル軸の静磁場に対する向き依存して、等方的化学シフトから観測される化学シフトの値が変化をする。残余双極子効果および化学シフト異方性効果の観測は、従来の NMR 構造情報では得られない長距離の構造情報を得ることができるために NMR 構造の精密化のために必要不可欠な NMR 情報である。しかしながら、残余双極子効果の観測および化学シフト異方性効果の観測においては、bicelle 共存下のデータと非共存下のデータを比較するか、あるいはリン脂質が液晶状態となる温度で観測したデータと、低温で等方相となった時のデータを比較するなど、明らかに異なるサンプルの状態で観測されたデータを用いるために、精密な観測値を得ることは容易ではない。我々は、溶液中での異方性相互作用の精密な観測を目的として溶液試料にたいするマジック角高速試料回転の利用を考えた。発表では、マジック角高速試料回転利用による異方性相互作用観測の詳細と具体的な観測結果を示す。謝辞：本研究は平成 11 年度 住友財団基礎科学研究助成により行いました。

T.Amaya, H.Shimahara, J.Kurita and S.Tate : Application of magic angle rotation to liquid sample to obtain NMR parameters through anisotropic spin interactions