1D1730

リボゾーム不活化蛋白質 Momordin Trp 残基の分光学的挙動

○加藤 吾朗¹、平田 孝治¹、西本 悦子²、山下 昭二¹ (¹ 九大院・農、² 久留米大・医)

生体防御蛋白質 Momordin は、リシン等と同様に真核生物のリボゾームに作用しこれを不活性化することが知られている。A 鎖、B 鎖のヘテロ二量体から構成されるリシンに比較して A 鎖に対応する Momordin の細胞毒活性は著しく低いが、T-Cell. Macrophage に特異的に作用することから特にその構造及び作用機構について興味をもたれている。最近、決定された X 線構造解析の結果によれば、Momordin の構造は A-H の 6 個のヘリックスと β -シートとから構成され、活性部位はヘリックス部分が基質分子を取り囲むのに適した配置をとっている。特に、これらのヘリックス中の、Tyr⁷⁰、Trp¹⁹²、Glu¹⁶⁰、Arg¹⁶³ が基質との結合及び活性に直接関わると考えられている。中でも、Trp 残基の側鎖であるインドール環の二つの配向状態及びこれに隣接する Tyr 残基との相互作用がこの生体防御蛋白質の活性を左右する。Momordin は 2 6 3 個のアミノ酸残基からなる直鎖状ポリペプチドであるが、Trp 残基は唯一活性部位に位置する Trp¹⁹² のみが観測される。Momordin のこの Single Trp Protein としての特徴は活性部位近傍のコンフォメーション及びリガンドとの相互作用により誘起される微細な変化を蛍光法により定量的に解析することを可能にする。本研究では、ニガウリ (Momordica charantia) 種子より単離精製した Momordin 中の Trp¹⁹² の挙動を定常光励起及びレーザー励起超高速時間分割蛍光法を用いて解析した結果を主に活性部位近傍のコンフォメーション変化に焦点をあて報告する。

G.Kato,K.Hirata,N.Nishimoto,S.Yamashita : Spectroscopic Properties of Trp Residue in Momordin

1D1800

ATP 依存性タンパク質分解酵素 Clp(Chaperonin-linked-protease) の構造と機能

○石川 尚¹、Beuron Fabienne¹、Belnap David¹、Kessel Martin¹、Wickner Sue³、Maurizi Michael²、Steven Alasdair¹ (¹ 米 NIH・NIAMS・LSBR、² 米 NIH・NCI・LCB、³ 米 NIH・NCI・LMB)

Clp(Chaperonin-linked-protease) は原核生物と真核生物のミトコンドリア、葉緑体に存在し、ATP の加水分解にともなうエネルギーを利用して不要なタンパク質を分解するタンパク質複合体ファミリーである。真核生物の細胞質で同様の機能を担っている 26S プロテオソームと異なり、基質のユビキチン化は必要としない。Clp ファミリーに属するタンパク質複合体はそれぞれ 2 つのドメインからなる。ATPase ドメインは基質を認識し、ATP を加水分解しながら変性させ、プロテアーゼドメインに送りこむ。プロテアーゼドメインは変性した基質を 8 アミノ酸程度のペプチド鎖に分解する。本研究では、Clp ファミリーのうち大腸菌由来の 2 つのタンパク質複合体、ClpAP と ClpYQ について、クライオ電子顕微鏡法により、構造解析と基質の移動の可視化を行った。ClpYQ はともに六量体の ClpY (別名 HslU、ATPase) と ClpQ (別名 HslV、プロテアーゼ) からなる。最近、Huber らの X 線結晶構造解析による原子モデルが発表されたが、我々のクライオ電子顕微鏡像からの画像解析によると、溶液中では ClpY が、X 線結晶構造解析による原子モデルとは異なり、N 端、C 端付近で ClpQ に結合していることが分かった。ClpAP は ATPase として六量体の ClpA を、プロテアーゼとして七量体の ClpP を持つ。我々は、non-hydrolyzable ATP analogue である ATPγS を使い、基質 (バクテリオファージ P1 由来の RepA) の移動を可視化することに成功した。ATPγS が ClpA に結合している時には、基質は ClpA の外壁に結合している。ATPγS が ATP に置き換わると、基質 RepA は ClpP に移動するのがクライオ電子顕微鏡像で確認された。現在、三次元再構成を目指した解析を行っている。

T.Ishikawa, F.Beuron, D.Belnap, M.Kessel, S.Wickner, M.R.Maurizi and A.C.Steven : Structure and function of ATP-dependent protease Clp(Chaperonin-linked-protease)

1D1745

T4 ファージ基盤中心部の分子間相互作用

○武田 洋子¹、金丸 周司²、有坂 文雄¹ (¹ 東工大院・生命理工、² Dept. of Biological Sciences, Purdue Univ.)

T4 ファージの基盤中心部は“ものさし蛋白質”(gp29)、テイルリゾチーム(gp5)など、特異な機能を持つ蛋白質を含むばかりでなく、触媒的に働く蛋白質など機能不明の必須蛋白質も存在する。Gp5 は 63kD の前駆体蛋白質として発現し、その後、39kD の成熟型 gp5* と 23kD の C 末端断片に切断されるが、両断片は会合状態を保ち、そのままテイルに取り込まれる。分子集合の過程で gp5 と最初に結合するのは 44kD の gp27 である。本研究では、C 末端断片に His-Tag を付した gp5 及びこれに結合する gp27 を大量発現させ、前者を Ni カラムに結合させ、これをアフィニティー担体として後者を結合させることによって gp5、gp5/gp27 及び、gp5*/gp27 複合体を調製した。この複合体を超遠心分析等によって解析した結果、以下のことが明らかになった。1) gp5 及びニックの入った gp5 は三量体であるが、後者は 37 度で保温すると gp5* と C 末端断片に解離する。2) gp5* は単量体であるが、C 末端断片は三量体である。3) gp5 はニックの有無に関わらずリゾチーム活性は極めて低く、単量体 gp5* の高い活性を持つ。4) C 末端断片は SDS で処理しても解離しない極めて安定な三量体を形成している。5) C 末端断片は gp5* のリゾチーム活性を抑制するが、一旦 gp5* から解離すると、再び結合することはない。6) gp27/gp5* 複合体は (gp27)₂(gp5*) のヘテロ三量体であるが、各単量体と平衡状態にあり、pH を下げるにつれて、(gp27)(gp5) ヘテロ二量体を介して、各単量体に解離する。7) gp27/gp5 複合体は (gp27)₆(gp5)₃ ヘテロ 9 量体である。

*) S. Kanamaru, et al., J Bacteriol. 181 (9) : 2739-44 (1999)

Y Takeda, S Kanamaru and F Arisaka : Protein-protein Interactions in the assembly of the Baseplate of Bacteriophage T4

1D1815

Structural analysis of the connector complex, P15, of bacteriophage T4 by analytical ultracentrifugation and electron microscopy

○Zhao Li, Chaidirek Chartree'chalem, Takeda Yoko, Kanamaru Shuji, Arisaka Fumio (Department of Molecular and Cellular Assembly, Tokyo Institute of Technology, Tokyo, Japan)

Completion of the tail assembly of bacteriophage T4 involves two gene products, gp3 and gp15. Gp3 is considered to interact both with gp19 and with gp29, the ruler molecule, and stop the polymerization of the tube. On the other hand, gp15 with the molecular weight of 31,429 has been reported to form the connector, P15, on top of the tube, which eventually binds to the neck of the head. In the absence of gp15, the sheath protein, gp18, tends to dissociate from the tube-baseplate and the 15 - tail is blocked to bind the head. In the present study, an expression vector, pET29-3, was constructed to express gene 15 in Escherichia coli BL21(DE3) and gp15 was purified to homogeneity by ammonium sulfate fractionation, DEAE-Toyopearl and Bio-gel A-5m column chromatography. The purified P15 was examined by SDS-PAGE, analytical ultracentrifugation and electron microscopy. SDS-PAGE showed a single band with the molecular weight of about 35,000. On the other hand, the molecular weight of 196,200 ± 4,300 was obtained from sedimentation equilibrium which gave the stoichiometry of gp15 to be 6.24 ± 0.14 based on the molecular weight expected from the nucleotide sequence. We concluded from this result that the number of gp15 subunits in the complex, P15, is 6. The sedimentation coefficient, s_{20,w}, of the complex was 7.76 S. The hexameric complex of P15 was negatively stained and examined by electron microscopy. As a standard for dimension, tube-baseplates were included. Numerous ring structures with the diameter equal to that of the tube were observed, which is consistent with our notion that gp15 forms the connector and stabilizes the tail sheath. We are currently overexpressing gp3 to look at the structure and interaction of the gene product in association with the completion of the tail.

Li Zhao, Chartree'chalem Chaidirek, Yoko Takeda, Shuji Kanamaru and Fumio Arisaka : Structural analysis of the connector complex, P15, of bacteriophage T4 by analytical ultracentrifugation and electron microscopy