2C1430

高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 由来のクエン酸シンターゼの X 線結晶構造解析

○金森 英司¹、河口 真一²、都築 千鶴²、中川 紀子⁴、増井 良治^{2,4}、倉光 成紀^{2,3,4}、柴田 武彦⁵、井上 頼直²、横山 茂之^{2,3,6}、神山 勉¹ (¹ 名大・院理・物理、² 理研・播磨研、³ 理研・ゲノム科学総合研究センター、⁴ 阪大・理、⁵ 理研・遺伝生化、⁶ 東大・院理)

序論 クエン酸シンターゼはクエン酸回路において、最初に働く酵素で、オキサロ酢酸とアセチル補酵素 A からクエン酸と補酵素 A を生成する反応を触媒する。今回、高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 由来のクエン酸シンターゼ (以下 TtCS) の X 線結晶構造解析を行い、1.7 Å の分解能で立体構造を求めた。

結晶化・回折実験 TtCS を大腸菌で発現し、熱安定性を利用して精製した。沈殿剤として硫酸リチウムを用いて蒸気拡散法による結晶化を行い、正八面体の結晶 (0.2x0.2x0.2mm³) を得た。SPRing8・BL44B2 にて低温 X 線回折実験を行い分解能 1.7 Å のデータを収集した。

解析 空間群 P4₃2₁2、格子定数 a=b=84.10 Å、c=153.02 Å、 $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ を決定し、分子置換法による構造解析を行った。初期位相の決定には超好熱菌 *Pyrococcus furiosus* 由来の CS の構造モデル (以下 PfCS) の一部を用いた。

考察 TtCS (最適生育温度 75 °C) の構造を、これまでに決定されている PfCS (同 100 °C)、ChickenCS (同 37 °C) 等の構造と比較したところ、熱不安定性残基 (Asn, Gln, Met, Cys) の数、サブユニット間に存在するイオンペアの数、および疎水性コアの構造に顕著な差が見いだされた。これらは蛋白質の熱安定性を決めるファクターとして重要であると推察される。

TtCS の構造 (dimer)

E.Kanamori, S.Kawaguchi, C.Tsuzuki, N.Nakagawa, R.Masui, S.Kuramitsu, T.Shibata, Y.Inoue, S.Yokoyama, T.Kouyama : Crystal structure of citrate synthase from *Thermus thermophilus* HB8

2C1500

超好熱菌由来 Thermosome α サブユニット複合体の結晶構造

○庄村 康人¹、吉田 尊雄²、丸山 正²、養王田 正文³、三木 邦夫^{1,4} (¹ 京大・院理、² 海洋バイオ研、³ 東京農工大・工、⁴ 理研・播磨)

シャペロニンは構造上の違いにより大きく二つのグループに分類される。この中で Thermosome は始原菌由来のシャペロニンの総称でありグループ II に属しているが、大腸菌由来の GroEL (グループ I) と比較しても、その構造と機能には大きな違いがあり不明点が多い。Thermosome の多くは、2 種類のサブユニット (α 、 β) が交互に並んだ 8 量体のリング 2 つが背中合わせで会合し、計 16 量体として存在している。また *in vitro* においては、 α 、 β 一方のみでも 16 量体を形成し、それぞれがシャペロニンとしての機能を有している。

今回我々は α サブユニットのみからなる thermosome の結晶構造をヌクレオチド (ADP) 結合下および、非結合下で決定した。結晶化は沈殿剤として硫酸アンモニウムを用いて行い、空間群は P4₂12、格子定数は a=b=209 Å、c=157 Å であった。データ測定はシンクロトン放射光施設 (SPRING-8, PF) で行った。位相決定には分子置換法を適用し、2.4 Å 分解能の反射に対して結晶学的精密化を行った結果、結晶学的 R 値 (R_{free}) はヌクレオチド結合型、非結合型、それぞれ 23.1 (26.6) %、24.2 (27.6) % となった。GroEL に関してはヌクレオチドの結合により、自身の構造や基質との親和性が大きく変化する事が知られており、グループ II シャペロニンについてもそれは同様であると考えられている。しかし、今回決定した二つの構造は一部のアミノ酸側鎖が移動しているだけで、ヌクレオチド結合による大きな構造変化は確認できなかった。さらに、ヌクレオチド非結合型構造において β 位の磷酸が結合するべき部位に硫酸イオンらしき電子密度が見られた。よって、この結晶化条件に含まれていた硫酸イオンにより、ヌクレオチド非結合型から結合型への構造変化が起きた可能性があると思われる。

Y.Shomura, T.Yoshida, T.Maruyama, M.Yohda, K.Miki : Crystal Structure of alpha-subunit Homo-oligomer from hyperthermophilic thermosome

2C1445

好熱菌リボソームタンパク質の高分解能 X 線結晶構造解析

○中島 崇¹、田中 麻衣¹、姚 関¹、木村 誠²、田中 勲¹ (¹ 北大・院理、² 九大院・生資環)

リボソームタンパク質はすべての生物細胞においてタンパク質合成に関わるリボソームを構成するタンパク質である。大腸菌の場合、50 種類のリボソームタンパク質が知られている。これまでの研究で、我々自身によるものも含め、この内の約 4 割の立体構造が決定され、そのユニークな特徴が明らかにされてきた。こうした研究から、リボソームタンパク質は核酸結合タンパク質の共通の祖先であるとの説も提唱されるに至っている。

本研究ではさらに、中度好熱菌 *Bacillus stearothermophilus* 由来 5S rRNA 結合リボソームタンパク質 L5 および超高度好熱古細菌 *Pyrococcus horikoshii* 由来 23S rRNA 結合リボソームタンパク質 L13 の結晶構造解析を試みた。

好熱菌由来のリボソームタンパク質は大腸菌内で大量発現させて調製した。目的タンパク質の精製および結晶化の後、シンクロトン放射光による回折強度データ収集の結果、L5 と L13 の結晶からそれぞれ 1.8 Å および 1.6 Å の高分解能データを収集した。いずれもリボソームタンパク質としては非常に高分解能の回折を与えている。L5 に関してはセレノメチオニンを用いた多波長異常分散法により位相を決定し、現在、初期電子密度マップからモデルを構築して構造の精密化を進めているところである。

これらの高分解能の構造解析に基づいて、L5 と L13 の機能解析およびこれまで構造決定されてきたリボソームタンパク質のフォールディングトポロジーとの関連について考察する。

T.Nakashima, M.Tanaka, M.Yao, M.Kimura, I.Tanaka : High-resolution structure analysis of ribosomal proteins from thermophilic organisms

2C1530

細胞接着分子とアクチン繊維とのリンカー蛋白質 radixin の FERM ドメインの結晶構造・細胞膜との相互作用

○浜田 恵輔¹、清水 敏之¹、松井 毅^{2,3}、月田 承一郎²、月田 早智子^{2,4}、箱嶋 敏雄¹ (¹ 奈良先端大・バイオ、² 京都大・院医、³ KAN 研究所、⁴ 京都大・医療技短大)

Radixin は細胞膜 (および接着分子) とアクチンフィラメントを架橋する ERM (Ezrin/ Radixin/ Moesin) 蛋白質の 1 つであり、広く真核生物に保存される。Radixin はその N 末端半分の細胞膜会合ドメイン (FERM ドメイン) で細胞膜リン脂質のホスファチジルイノシトール (4,5) ビスリン酸 (PIP₂) に結合するとともに、CD44、CD43、ICAM-2 といった膜貫通蛋白質の細胞質部位と結合する。通常、Radixin は C 末ドメインと FERM ドメインが分子内会合することにより、膜にアクチンフィラメントにも結合できない状態で細胞質に存在する。活性型への変換機構の一つとして PIP₂ の FERM ドメインへの結合が示されている。本研究は、Radixin の FERM ドメインの立体構造の解明と、ERM 分子がいかなる認識に基づいて PIP₂ と結合するか明らかにするため、そのリン脂質頭部であるイノシトール (1,4,5)3 リン酸 (IP₃) との複合体について、X 線結晶構造解析を行った。Radixin の FERM ドメインを精製・結晶化、そして重原子同型置換法で三次元構造 (分解能 2.8 Å) を決定して、3 つのサブドメイン (ユビキチン様構造、アシル CoA 結合蛋白質様構造、PTB ドメイン様構造) からなる新規の膜結合ドメイン構造をしていることを明らかにした。また、PIP₂ の IP₃ との複合体を結晶化し、その結晶構造 (分解能 2.9 Å) を分子置換法で決定して、IP₃ がユビキチン様構造と PTB ドメイン様構造の間のクレフトにより認識されることを明らかにした。

K.Hamada, T.Shimizu, T.Matsui, S.Tsukita, S.Tsukita, T.Hakoshima : Structural basis of membrane targeting function of ERM proteins revealed by the crystal structures of the radixin FERM domain