2C1545

Clostridium Perfringens Ia-アクチン特異的ADPリボシルトランスフェラーゼの結晶構造

○津下 英明¹、永浜 政博²、糸川 泰弘¹、阪口 義彦²、勝沼 信彦¹、櫻井 純² (¹徳島文理・健康科学研、²徳島文理・薬学)

Clostridium Perfringens は食中毒やガスエス菌の原因となりこの菌が産生する Iota 毒素はボツリヌス C2 毒素と同様にアクチンの 177 番アルギニン特異的な ADP リボシルトランスフェラーゼである。すでに構造と機能の解析が進んでいるジフテリア毒素、コレラ毒素、百日咳毒素とは ADP リボシル化する標的およびその構造は異なる。A 鎖 B 鎖のサブユニットからなり、Ia は ADP リボシルトランスフェラーゼ活性を持ち、非筋肉細胞 β/γ アクチンおよび骨格筋由来のアクチンの Arg177 を特異的に ADP リボシル化する。G アクチンの ADP リボシル化はアクチンの重合を阻害し、細胞のラウンディングをおこす。Ib は細胞への侵入に関わると考えられている。我々は Iota 毒素 A 鎖と NADPH および NADH の複合体の結晶構造を明らかにした。重原子同型誘導体調整のため 5 つの Cys を導入した点変異体を作成し、発現精製および結晶化を行った。NADPH との共結晶化で得られた結晶を用いて、DIP2030 にてインハウスでデータ測定をし、2.8 Å の Native データ、および水銀、プラチナ誘導体データで位相を取り、トレースを行った。最終的には高エネ研の BL18B において 2.1 Å 分解能データに対し精密化を行った。また別の結晶系で NADPH および NADH の共結晶を得て構造決定その比較を行った。全体構造は二つの似たり返しドメインからなり、C 末端のドメインに NADH を結合している。また N 末端ドメインの空のクレフトは何らかの重要な機能に関係していると思われる。この構造解析の結果、(1) アクチン特異的な Binary Toxin の共通構造が明らかにされた。(2) 構造相関がないと思われたジフテリア毒素との折れ畳み構造の共通点が明らかになった。(3) 通常の基質である NADH と NADPH とのその結合の違いを明らかにした。今後アクチンとの複合体解析に発展できると考えている。

H.Tsuge, M.Nagahama, Y. Itogawa, Y. Sakaguchi, N. Katunuma, and J. Sakurai : Crystal structure of Clostridium Perfringens Ia

2C1615

硫酸還元菌由来高分子量チトクロム c の X 線結晶構造解析

○須藤 恭子¹、柴田 直樹¹、森本 幸生¹、樋口 芳樹²、安岡 則武¹ (¹姫工大・理、²京大院・理)

硫酸還元菌 (Desulfovibrio) には c タイプのヘムをもつ電子伝達タンパク質として cytochrome c553, cytochrome c3 (tetra-heme), cytochrome c3 (dimeric octa-heme), nine-haem cytochrome c3, high-molecular-weight cytochrome c (HMC, hexa deca-heme) の存在が報告されている。このうち HMC 以外は既に立体構造も解明され、多ヘムのものについては cytochrome c3 との相関が議論されている。本研究では、これらの中で最も多い 16 個のヘムをもつ Desulfovibrio vulgaris Miyazaki F 由来の HMC の立体構造解析を行った。培養した硫酸還元菌の菌体を破砕し、タンパク質を抽出、精製した。結晶化条件の探索の結果、0.2mm × 0.02mm × 0.03mm 程度の柱状結晶が得られた。この結晶の X 線回折実験を 100K の低温条件下で行ったところ、2.7 Å 分解能の回折が観測された。そこで 3 波長のデータ測定を SPring-8 のビームライン BL44B2 で行った。これから $\alpha=60.1^\circ$, $\beta=84.1^\circ$, $\gamma=142.7^\circ$, $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$, P 212121 であることがわかり、非対称単位中 1 分子を含むことが示唆された。位相は、ヘムに含まれる鉄原子の異常分散効果を利用した多波長異常分散法 (MAD 法) により計算した。プログラム CNS を用いて鉄原子 16 個の位置を決め、位相を計算したところ十分有意なものだったので、さらに位相の改良を行って、分子モデルを構築できる電子密度図を得た。分子には、4 個のヘムを含む c3-like なドメインが 3 つと 3 個のヘムをもつ小さなドメインが 1 つ、また c3-like なドメインを繋ぐかたちでヘムが 1 個存在しており、一次構造からのドメイン構造予測と一致している。

K. Suto, N. Shibata, Y. Morimoto, Y. Higuchi, N. Yasuoka : Structure determination of High Molecular Weight Cytochrome with Multiwavelength anomalous diffraction method

2C1600

大腸菌トリプトファン合成酵素 β サブユニットの結晶構造解析

○森本 幸生¹、西尾 和也¹、柴田 直樹¹、小笠原 京子²、油谷 克英²、安岡 則武¹ (¹姫路工大・理・生命、²阪大・蛋白研)

大腸菌トリプトファン合成酵素は α と β サブユニット各 2 分子からなり $\alpha 2 \beta 2$ 複合体を形成し、L-トリプトファン生合成の最終段階を触媒する多機能酵素である。本酵素の特徴は、複合体を形成したとき各サブユニット単独の時よりもそれぞれ 100 倍、50 倍に増幅されることである。このことはタンパク質の立体構造がその機能の制御に大きく関わっていることを示している。N I H のグループによりサルモネラ菌由来 $\alpha 2 \beta 2$ 複合体の結晶構造が報告され、この立体構造から反応中間体であるインドールがサブユニットを越えて輸送される機構が示唆された。しかしながら活性増幅機構の解明には至っていない。従って本研究では大腸菌トリプトファン合成酵素の α 、 β サブユニット単独での構造解析を行い、複合体との立体構造の比較によりこの活性増幅機構の解明を目的とした。本年度では β サブユニットの構造解析について報告する。 β サブユニット発現系大腸菌より大量精製、結晶化を行った。結晶は六角板状、針状結晶が得られ、SPring-8 BL41XU および BL44B2 において X 線回折実験を行った。針状晶については分解能 2.5 Å までのデータを集めることができた。このデータから結晶中では β サブユニットが結晶学的な 2 回軸で関係づけられる 2 量体を形成していることがわかった。この 2 量体は複合体形成時の溶液中での 2 量体と同じ関係であった。しかし β サブユニットの立体構造は、複合体形成時の β サブユニット構造とは、その N あるいは C 末端ドメインの相対配置に大きな差があった。ドメイン内のペプチドフォールディングはほぼ同じである。従って複合体形成時の活性増幅は、この β サブユニット内の 2 つのドメインの相対的な位置変化によるものと考えられる。

Y.Morimoto, K.Nishio, N.Shibata, K.Ogasawara, K.Yutani and N.Yasuoka : Crystal structure of Tryptophan synthase beta-subunit from E.coli

2C1630

フェレドキシンとフェレドキシン-NADP+還元酵素複合体の結晶構造と電子伝達機構

○栗栖 源嗣¹、楠木 正巳¹、恩田 弥生²、有賀 洋子²、長谷 俊治² (¹阪大・蛋白研・センター、²阪大・蛋白研・酵素反応)

高等植物の葉緑体で光励起された電子は無機物の還元同化反応に利用され、種々の還元酵素に伝達される。この電子を伝達する役割は、フェレドキシン (Fd) と呼ばれる [2Fe-2S] クラスタを有する電子キャリアー蛋白質が担っており、葉緑体中では Fd:NADP+還元酵素 (FNR)、亜硫酸還元酵素やグルタミン酸合成酵素などの Fd 依存性酵素に電子を供給している。Fd を介した電子伝達の際には、Fd と Fd 依存酵素は静電的に安定な複合体を形成することが知られており、種々の Fd 依存酵素と Fd に部位特異的に変異を導入した改変体を使って、その相互作用部位の特定が進められている。今回、我々は FNR がどのようにしてパートナー分子である Fd を認識しているのかという点に注目して、Fd と FNR について単体・複合体双方の結晶化と構造解析を行った。Fd:FNR 複合体の構造解析は SPring-8 において収集した回折強度データをもとに 2.68 Å 分解能で行った (図)。FNR 単体の構造解析は KEK-PF において収集した回折強度データをもとに行った。得られた構造を詳細に検討したところ、Fd の D66、D65、R40 と FNR の K88、K91、E154 による塩橋の形成が複合体を安定化していることが確認された。また、Fd の [2Fe-2S] クラスタと FNR の酸化還元中心である FAD の周辺は疎水的環境で直接電子の授受が行われていると考えられる。さらに Fd、FNR とともに複合体を形成することによって構造変化を起し、電子伝達や酵素反応に有利な構造をとる事を初めて明らかにした。

G.Kurisu, M.Kusunoki, Y.Onda, A.Kimata-Ariga and T.Hase : Crystal structure of the photosynthetic electron transfer complex between Ferredoxin and Ferredoxin-NADP+ reductase from maize