2D1430

X線散乱シミュレーションによるカルモデュリン／標的酵素複合体の構造解析

○三保 信之、神保 雄次、和泉 義信（山形大・院理工・生体セ）

【目的】希薄単分散溶液の散乱プロファイルは良く知られている Debye の散乱式で記述できる。この散乱式は分子の原子座標が決定されると X 線散乱プロファイルを計算することができるというものである。これを利用して、Protein data bank より得られるカルモデュリン／標的ペプチド複合体の原子配置からコンピューターを用いて X 線散乱プロファイル $I(q)$ および距離分布関数 $P(r)$ を計算し、その結果と実験によって得られた $I(q)$ および $P(r)$ と比較することで溶液中のカルモデュリン／標的ペプチド複合体の構造を予測することが本研究の目的である。

【シミュレーション手法】Debye の散乱式は真空中の分子を対象としている。そこで、溶液中の分子の構造を論ずるために cube 法⁽¹⁾を用いた。cube 法とは分子の存在する空間を一辺 1 Å 以下の小さな立方体の組み合わせとみなし、その立方体を Van der Waals 領域、第一水和層、溶媒の近づけない領域の 3 種類に分け、それぞれの cube と原子の相互作用より X 線散乱プロファイルを計算する手法である。

【結果】sk-MLCK M13 をサンプルとした Protein data bank の原子座標データ⁽²⁾を基に cube 法を用いて計算した X 線散乱プロファイルと実験(高エネルギー加速器研究機構放射光実験施設 BL-10C を利用)で得られた X 線散乱プロファイルが小角領域でよく一致した。これは cube 法を用いたシミュレーションが信頼できるものであることを示している。現在数種類の異なる標的ペプチドを用いたシミュレーションが進行中であり、当日は Apo-calmodulin-sm-MLCK RS20,PK2 などのデータを示し考察を行う予定である。

⁽¹⁾S.R.Hubbard:Ph.D.,Stanford Univ.,No.88/02(1982)

⁽²⁾M.Ikura et al:SCIENCE,V.256,p.632(1992)

N.Miho,Y.Jinbo,Y.Izumi : Structural analysis for calmodulin/target peptide by means of SAXS simulation

2D1500

JNK カスケード調節タンパク質 JSAP1 の構造機能関連の解明

○平山 幸司¹、小寺 義男¹、米山 操¹、須貝 真理子²、佐藤一紀^{2,3}、河野 俊之²、伊藤 道彦⁴、柴 忠義⁴、前田 忠計¹（¹北里大・理・生体分子動力学、²三菱生命研、³福岡女子大・人間環境、⁴北里大・理・生物情報科学）

JNK3 (c-Jun N-terminal Kinase 3) は、MAP (Mitogen-Activated Protein) キナーゼスーパーファミリーに属し、様々な物理化学的ストレスやサイトカインによって強く活性化される細胞内シグナル伝達分子である。この JNK3 を含むシグナル伝達系 (JNK カスケード) は脳神経細胞の選択的細胞死 (アポトーシス) に密接に関与している。JSAP1 (JNK/SAPK-associated protein 1) は JNK3 と特異的に結合するタンパク質として初めてマウスから単離・同定された新規タンパク質である [1]。リン酸化していない JNK3 とは結合するがリン酸化した JNK3 とは結合しない。また、JNK3 上流シグナル伝達分子である SEK1/MKK4、MKK7 も相互作用する。これらのことから JSAP1 は JNK カスケードにおいて効率的にシグナルを伝えるための足場を提供するタンパク質 (スキファールドタンパク質) と考えられている。本研究では物理化学的、構造生物学的な方法で JSAP1 と JNK3 の相互作用を解析し、複雑なシグナル伝達系における JSAP1 の働き及びそのメカニズムを解明することを目的としている。

これまでの解析から JSAP1 と JNK3 の結合には疎水性相互作用が関わっていると推測された。現在、分析用遠心機を使って様々な JSAP1 部分ペプチドと JNK3 の解離定数の測定を行っている。発表では、この結果をもとに JSAP1 と JNK3 の結合様式について議論する。

[1]M. Ito, K. Yoshioka, M. Akechi, S. Yamashita, N. Takamatsu, K. Sugiyama, M. Hibi, Y. Nakabeppu, T. Shiba and K Yamamoto. Mol. Cell Biol. **19**, 7539-7548, 1999.

K. Hirayama, Y. Koderia, M. Yoneyama, M. sugai, K. Sato, T. Kohno, M. Ito, T. Shiba, T. Maeda : Structure and function of the Jun N-terminal Protein Kinase (JNK)-Binding Protein JSAP1

2D1445

鉄型ニトリルヒドラーゼの反応機構解析

○辻村 昌也¹、尾高 雅文¹、星野 幹雄²、Il-seok Lee¹、小林 義男³、大河内 丈彰⁴、遠藤 勲¹（¹理研・生化学システム、²理研・有機合成化学、³理研・応用原子核物理、⁴東京理科大・工）

ニトリルヒドラーゼ (NHase) は、単核低スピンの非ヘム鉄またはコバルトを活性中心にもつ唯一の酵素である。アクリルアミドやニコチンアミド等の工業生産に利用されていることからその反応機構の解明が注目されている。近年、鉄型酵素の結晶構造解析、質量分析等の結果から、活性中心の配位子はシステインスルフェン酸 (Cys-SOH) システインスルフィン酸 (Cys-SO₂H) を含む全く新規な構造を持つことが判明した。したがってその立体構造からは反応機構を予測することは難しい。そこで、本研究では、脂肪酸ニトリルの一つであるイソブチロニトリル (IBN; CH₃CH(CH₃)CN) を用いて反応機構を解析した。他の脂肪族ニトリルと異なり IBN はメタクリロニトリルに対して 5-6micro M の阻害定数で働く競争阻害剤であることが解った。この基質を高濃度で添加するとシステインの硫黄原子から非ヘム鉄への電荷移動とみられる 680nm の吸収が消失し、新たに短波長側で吸収の増大が起こった。また ESR スペクトルを測定したところ、IBN の結合によって低スピン鉄 (III) のシグナルが消失し、有機ラジカルと思われるシグナルが生じた。このことは、IBN は NHase の反応中心に結合して複合体を形成し、その電子状態に大きく影響することを示唆している。この NHase・IBN 複合体中の鉄イオンの状態を解析するため、⁵⁷Fe を含む培地で培養した菌体から酵 2 素を精製し、メスバウアー分光法で解析した。試料を IBN 存在下、非存在下で調製し、それぞれメスバウアー分光法で測定した。IBN 非存在下では、低スピン 3 価と思われるシグナルを生じたが、IBN 存在下では 0.45 以上の同位体シフトを示す新たなシグナルを生じた。これらの結果から、予想される反応機構について検討した。

M.Tsujimura, M.Odaka, M.Hoshino, Lee Il-seok, Y.Kobayashi, T.Ohkouchi and I.Endo : Reaction mechanism of iron-type nitrile hydratase

2D1515

抗 NP 抗体の親和性成熟に伴う抗原認識能改変の方向性

○佐川 琢麻¹、織田 昌幸¹、石村 美雪²、森井 尚之²、古川 功治^{1,3}、東 隆親¹（¹東京理科大・生命研、²工技院・生命研、³東医歯大・難研）

抗体は、生体内で体細胞突然変異により、抗原への親和性を 1000 倍以上増大させている。我々はこれまでにハプテン抗原である 4-hydroxy-3-nitrophenylacetyl (NP) 誘導体に対する免疫応答の研究を行ってきた。その中で免疫後期 (9 週目) に産生された 4 種類の抗体は明らかに同じクローンから成熟したと考えられ、しかも親和性成熟の方向は、エンタルピー変化をほとんど変えずにエントロピー変化を大きくするものであった (Immunity,11,329,1999)。我々はこの結果に基づき生体の持つ親和性成熟の過程と抗原認識機構の変化に着目して研究を行った。

抗原・抗体間相互作用解析は主に BIAcore と滴定型熱量計 (ITC) を用いて行った。BIAcore のセンサーチップに NP 化したキャリアタンパク質を固定化し、アナライトとして 4 種類の抗 NP モノクローナル抗体の Fab フラグメントを流してそれぞれの速度論的解析を行った。その結果、成熟前 ($K_a \approx 10^7 \text{ M}^{-1}$) の抗体に比べて成熟後 ($K_a \approx 10^8 \text{ M}^{-1}$) の抗体は結合速度、解離速度ともに小さくなっていた。また ITC 測定により各相互作用の温度依存性を調べたところ熱容量変化 (ΔC_p) に差異はほとんど見られなかった。本発表では、抗体の親和性成熟という進化の過程において、抗原認識機構を変化させる生物学的意義についても議論したい。

T.Sagawa, M.Oda, M.Ishimura, H.Morii, K.Furukawa, T.Azuma : Kinetic and thermodynamic aspects of antigen recognition during affinity maturation of anti NP antibodies.