S1H03

NMRによるH⁺-ATP合成酵素の機能構造解析

○八木 宏昌、藤原 敏道、阿久津 秀雄（阪大・蛋白研）

膜タンパク質の多くは分子量が大きく、また水に溶けないことなどから構造を議論するには向いていなかった。今回取り上げるH⁺-ATP合成酵素は分子量約50万の膜タンパク質である。この酵素は膜に埋まっている疎水性のF₀部と膜から飛び出ている親水性のF₁部からなっている。バクテリアの場合、F₀にはa=1、b=2、c=9~14の3種12~17個のサブユニットが存在し水素イオンのポンピングを行っている。一方F₁にはα=3、β=3、γ=1、δ=1、ε=1の5種9個のサブユニットが存在し実際の触媒作用はβサブユニットである。水素イオンがF₀を通過することと共役してF₁部でATPを合成する。このタンパク質の大きな特徴の一つはF₁とF₀の解離、再構成が容易なことである。つまりそれぞれを別々な状態で解析できる。われわれはF₁のβサブユニット、F₀のcサブユニットに注目し、NMRで構造情報を得ようと試みている。βサブユニットは親水性であるため溶液NMRでの測定が可能である。ところがβサブユニットはモノマーでも分子量が5万を越えているためそう単純ではない。そこでインテンを用いた選択的安定同位体標識の手法を用いてATPに対する構造変化を追ってみた。具体的には1-124、1-270、270-473、390-473残基をそれぞれ選択的に標識した4種のタンパク質を作製し、主鎖の帰属を行った。結晶構造と比較構造変化のメカニズムを議論する。cサブユニットは不溶性のため溶液状態では本来の構造を保持しているかが疑問である。したがって固体NMRで解析を行っている。化学合成で選択的にラベルを導入したcサブユニットを合成し、膜に再構成させてNMRシグナルを観測した。NMRでの膜タンパク質の解析の展望もふまえて議論したい。

H. Yagi, T. Fujiwara and H. Akutsu : Functional structure analysis of H⁺-ATP synthase by NMR

S1H05

膜タンパク質のトポロジー形成過程の多様性とトポロジー形成配列

○阪口 雅郎（九大院・医・機能高分子）

膜タンパク質の多くは小胞体に結合したりリボソームで合成され、合成と同時に膜内に組み込まれる。小胞体上では、ポリペプチド膜透過チャネル（トランスロコン）の寄与によって多彩なトポロジーが形成される。この過程で、膜タンパク質の精巧な膜貫通構造はどうやって形成されるのか？同じような疎水的特性をもつセグメントがどうやって特異的な配向を形成できるのか？チャネルタンパク質に見られる電荷の密集したセグメントが、どうやって膜貫通トポロジーを形成できるのか？これらの疑問に向けた研究の結果下記のような多様な様式が見出された。

【様式1】疎水性セグメントがリボソームから出た順に組み込まれる様式。

【様式2】内在性SA-Iが主導となる様式。SA-I [1型シグナルアンカー配列]はアミノ末端側を膜透過させるシグナル配列であり、かつ膜アンカー領域となり、C-末端側のドメインを細胞質側に配置したトポロジーを形成する。マルチスパン膜タンパク質でも、強力な配向規定機能をもったSA-Iの疎水性セグメントがその強い個性を発揮し、前（アミノ末端側）にある疎水性度が不十分なセグメントを引き込むと、結果的に二本の膜貫通セグメントが出来上がる。前のセグメントは親水性でもこのトポロジーを形成できる。

【様式3】セグメント間の疎水性相互作用による様式。疎水性度の低いセグメントが前の疎水性セグメントに近接している場合、トランスロコン内部で相互作用し、透過してしまうのを免れ、膜貫通配向を形成することができる。

【様式4】極性相互作用が主導となる様式。荷電アミノ酸残基どうしの相互作用で膜内セグメントが形成される様式が明らかになってきた。この場合、小胞体内腔に露出した後、膜ドメイン内に収納されるセグメントも見出されている。

M. Sakaguchi : Membrane topogenesis and topogenic sequences of membrane proteins

S1H04

膜タンパク質の立体構造を形成する相互作用

○美宅 成樹（農工大工）

膜タンパク質の立体構造をゲノムスケールで議論するには、いくつかの問題点がある。構造が解明された膜タンパク質が少ないこと、膜への組み込みに色々な例外が見出されており、単純なルールでは高精度の予測が難しいことなどがその原因となっているのである。そこで私たちは、膜タンパク質で見られる分子間（内）相互作用に立ち戻って、膜タンパク質の構造分類と構造予測を行っている。すでにSOSUIという膜タンパク質予測システムを開発済であるが、これは3つの物理化学的要因を用いている。疎水性インデックス（K-Dインデックス）、両親媒性インデックス、それにタンパク質の大きさである。このうち疎水性インデックスは膜たんぱく質の予測に従来から用いられてきた最も重要なパラメータで、膜の中は非極性でそれに適合する疎水性のアミノ酸がセグメントの中心に多く存在しているということを反映している。次に両親媒性インデックスは、脂質膜の極性基に対応する極性のアミノ酸が膜貫通領域の両端に多く存在しているということに対応している。最後にタンパク質の大きさが重要なパラメータとなっているのであるが、これは疎水性のセグメントがどういう非極性環境に存在しやすいかということがタンパク質の大きさによって変わると考えられる。SOSUIシステムはかなり良い予測ツールとなっていて、任意のアミノ酸配列に対して、水溶性タンパク質と膜タンパク質の判別能力では非常に高い精度を示している。しかし、弱点もあり、親水的な膜貫通ヘリックスの予測が難しいことがある。これは他の膜タンパク質予測システムと共通の問題であるが、そのためにはより長距離の効果を取り込んで予測ツールを構成することが必要で、それを今取り組んでいるところである。

S. Mitaku : Physical interaction which form membrane protein structure

S1H06

配列解析で迫る低疎水性膜貫通部位の形成メカニズム

○中井 謙太（東大・医科研・ヒトゲノム）

プロテオームに含まれる膜タンパク質の大半はいわゆるα型と考えられている。α型の膜貫通部位は、ある程度の長さの疎水性アミノ酸残基の集まりからなるため、その存在をアミノ酸配列から検出しやすい。Kleinらが1985年に発表したKKD (ALOM)法はこの原理をごく単純に利用したものだが、当時は最も優秀な膜貫通部位予測プログラムといわれていた。これに対し、筆者らはKKD法が多数の膜貫通部位をもつタンパク質を扱うときに比較的平均疎水性の低い領域を見落としがちであったので、貫通領域を判定する基準値を二種類用意して改良を図った。そのアルゴリズムはPSORTプログラムで用いられ、後にALOM2という名前で配付されるようになった。ALOM2は最近のMoellerらの客観テストではあまり良い成績を示していないが、これはfalse negative/ false positiveがアンバランスになっているため、基準値を新しいデータで調整すれば、すぐにもばん回可能と思われる。もっとも、そのような小手先の改良だけでなく、もっと本質的な改良が必要なことは明らかであり、それは実際の膜タンパク質構造形成メカニズムを反映させた予測の実現であろう。すなわち、膜タンパク質の構造形成は通常、チャンネル型膜タンパク質装置を通して行われるので、単純な物理化学的考察だけで構造形成を論じるのは不適当かもしれず、何らかの配列シグナル情報を介して構造形成が制御されている可能性さえある。そのような状況で筆者らが重要だと考えているのは、なぜ平均疎水性の低い配列セグメントがあるときは貫通部位になり、またあるときはそうならないのかという問題である。筆者らは配列データの統計解析により、まわりの貫通部位のもつトポロジー親和性が影響しているという結果を得たので報告する。

K. Nakai : Why some of relatively low hydrophobic segments become transmembrane segments while others are not?