1P001

結晶構造に基づくグループ II シャペロニンの分子機構の解明

○庄村 康人¹、吉田 尊雄²、丸山 正²、飯塚 怜³、養王田 正文³、三木 邦夫^{1,4} (¹京大理工、²海洋バイオテクノロジー研、³東京農工大、⁴理研播磨)

タンパク質の折れたたみ反応を促進するシャペロニンは、アミノ酸配列の相同性から二つのグループに分類されている。真正細菌、細胞内小器官由来のグループ I、および細胞質、古細菌由来のグループ II とでは構造上に大きな違いがある。グループ I ではその機能に補因子の存在が重要であるのに対し、グループ II ではもともとシャペロニン自身にその補因子に相当する部分が含まれている。グループ I シャペロニンは、補因子・ヌクレオチドの結合・加水分解（ヌクレオチドのみ）・解離を密接に連動させることによって、(変性タンパク質の折れたたみ反応のための) 大きな構造変化をおこすとされている。その詳細なメカニズムについては、生化学的手法や電顕、X 線を用いた構造解析による研究が進められているが、グループ II シャペロニンについてはまだ不明な点が多い。

我々のグループでは、これまでに古細菌由来シャペロニンの closed 型の結晶構造決定している。また、このシャペロニンのタンパク質の折れたたみ反応活性が失われている変異体の結晶構造 (closed 型) も決定したが、構造上に著しい違いは見られなかった。部位特異的な変異と折れたたみ反応の失活との関連を明らかにするため、あるいはグループ II シャペロニンの構造機能相関を解明するためには、ほかのコンフォメーション (open 型, bullet 型など) の構造の情報が不可欠である。しかし、残念ながら今のところ原子レベルでのこれらの構造は明らかでない。そこで、これまでに得られているシャペロニンの構造と比較することによって、グループ II シャペロニンにおける種々のコンフォメーションの安定性を検証した。今回はその結果に基づいて、ヌクレオチド、および変性タンパク質の相互作用によるグループ II シャペロニンの動的変化のモデルを提案する。

Y.Shomura, T.Yoshida, T.Maruyama, R.Iizuka, M.Yohda, K.Miki : Study on Molecular Mechanism of Group II Chaperonin on the Basis of Its Crystal Structure

1P003

シス型プロリン及び歪んだトランス型プロリン異性体と結合した大腸菌由来膜結合型シクロフィリン B

○奥平 香代子¹、佐野 友美¹、川口 洋子¹、山岸 陽子¹、伏信 進矢²、松沢 洋²、今野 美智子^{1,3} (¹お茶大院・人間文化・物質科学、²東大院・農・生命科学、³お茶大・理・化学)

シクロフィリン (CyP) は、これまでに調べられた全ての細胞に大量に存在し、細胞質型 CyPA と膜結合型 CyPB、その他がある。CyP は免疫抑制剤シクロスポリン A に結合する蛋白質として知られているが生体内での機能は未だ明らかでない。私達は、CyPA, B は生命の維持に必須であり、異なるリガンドに結合するとの予測の基に、真のリガンドを探索することを目的としてそれぞれの結合方式を調べている。これまで、ペプチド Suc-Ala-Pro-Ala-pNA は、*E. coli* CyPA とは Ala-Pro 間が *cis* 型で、*E. coli* CyPB (K187T 変異体) とは歪んだ *trans* 型で結合することを報告した。今回、テトラペプチド Suc(OMe)-Ala-Ala-Pro-Val-AMC との複合体及び単独の CyPB の X 線構造解析を行った。反射データは、PF を利用して、複合体結晶では 298K 及び 100K (不凍剤:グリセロール 15%) で CCD カメラにより、単独結晶では 298K で巨大ワイセンプルカメラにより得た。X-PLOR を用いて分子置換法により解析した。単独結晶は $P3_221, Z=6$, 非対称単位に独立な分子は 1 分子であり、対称性が高い。複合体結晶は、298K では $P3_212, Z=18$ で独立な 3 分子があるのに対し、100K では $P3_2, Z=6$, 独立な分子は 2 分子である。CyPB 分子がペプチドを介して螺旋状にパッキングしているが単独結晶でも同様にパッキングする。100K では 3 回螺旋で関係付けられる 3 分子が 298K では独立な 3 分子として存在する。レセプティングサイトに *cis* 型 Pro に対応する電子密度がみられた。Val を含むこのペプチドは、溶液中では *cis* 型の割合が高く、それが複合体を形成しパッキングする。他方、ペプチド Suc-Ala-Pro-Ala-pNA は歪んだ *trans* 型と *cis* 型が溶液中で半々に存在し、CyPB とは前者が、CyPA とは後者が複合体を形成すると考えられる。

K.Okudaira, Y.Sano, Y.Kawaguchi, Y.Yamagishi, S.Fushinobu, H.Matsuzawa and M.Konno : Membrane cyclophilin isotype B from *E. coli* bound to a cis-proline isomer and a distorted trans-proline isomer.

1P002

新規細胞成長因子 Epieregulin の NMR による立体構造解析

○佐藤 勝治¹、三浦 和紀¹、多田 雅人¹、相沢 智康¹、宮本 薫²、河野 敬一¹ (¹富山医薬大・薬・構造生物、²福井医大・医・生化学)

Epieregulin はヒト子宮頸癌由来の HeLa 細胞の形態変化を指標に、マウス fibroblast 由来癌細胞株 NIH3T3/T7 の conditioned medium から単離された、epidermal growth factor (EGF) ファミリーに属する増殖因子である。Epieregulin は正常組織においてマクロファージや胎盤で主に発現しており、いくつかの癌細胞株の中では上皮癌細胞株で最も多く発現している事が知られている。また、Epieregulin は fibroblast (繊維芽細胞)、smooth muscle cell (平滑筋細胞)、hepatocyte (肝細胞) 等の増殖を促進する反面、腫瘍由来上皮癌細胞株の増殖を抑制するという二重の生物学的機能を示す。Epieregulin はアミノ酸 4 6 残基からなり、他の EGF ファミリーと同様 3 つの S-S 結合が存在し、約 25~50 % のホモロジーを有する。また、epieregulin は 4 種類の ErbB ファミリーの中では、EGFR と ErbB 4 に結合することが明らかとなっており、その受容体選択性は EGF ファミリーの betacellulin (BTC) に類似している。現在、EGF ファミリーでは EGF を初め、transforming growth factor- α (TGF- α)、heregulin α (HRG- α) の EGF ドメイン、BTC の立体構造が解明されており、立体構造の観点から生物学的機能、レセプター特異性等が議論されている。今回それらに続いてこの新規 EGF ファミリーリガンドである epieregulin の立体構造を明らかにするため、大腸菌を用いた発現系を構築し、epieregulin を精製、その後 NMR 法による構造解析を行った。連鎖帰属法により全 46 残基中 N 末端残基を除く 45 残基の帰属を完了した。現在、主鎖原子の RMSD が 0.87 Å の構造が得られており、構造の精密化を進めている。

K.Sato, K.Miura, M.Tada, T.Aizawa, K.Miyamoto and K.Kawano : Structural analysis of epieregulin, a novel EGF like growth factor

1P004

海藻レクチン ESA-2 の結晶学的研究

○紙谷 康則¹、堀 貫治²、月向 邦彦¹、片柳 克夫¹ (¹広大院・理、²広大・生物生産)

海藻由来のレクチンは既知のレクチンとは一次構造レベルで全く異なり、新規のレクチンファミリーに属する。その多くは単糖を認識せず複合糖質の糖鎖を認識し、ユニークで厳密な糖鎖認識能を持つことから、立体構造的にも既知レクチンとは異なっていると考えられる。そこで我々は、その中でも紅藻から抽出され、高マンノース型糖鎖に選択的に結合するレクチン、ESA-2 を構造解析の対象とした。このレクチンは最近、発ガン性マウスに対する経口投与実験からも極めて強い抗ガン作用が観測されている。

結晶化は、20℃においてハンギングドロップ式蒸気拡散法にて、沈殿剤として PEG8000 を用いた系で行い、幾重にも重なり合った板状結晶を得た。このままでは X 線回折実験に不適なため、ついでマイクロシーディングをおこない、厚さ約 10 μ 、0.3 x 0.5mm 程度の面積をもつ板状の結晶を得た。回折実験は、高エネルギー加速器研究機構のフロンファクトリーの BL6A, BL18B および SPring-8 の BL44XU, BL40B2 でおこなった。空間群は P2₁、格子定数はそれぞれ a = 42.20 Å, b = 62.43 Å, c = 48.53 Å, β = 110.34°, V_m = 2.1 で非対称単位あたり 1 分子を含んでいることが判明した。

厚みがわずか 10 μ であるにもかかわらず、高分解能の回折点が観測され、ペンディングマグネットで 1.7 Å、アンジュレーター光で 1.5 Å 分解能の回折点が観測されている。 R_{merge} は前者で 0.062、後者で 0.093 であった。現在、良好な重原子同型置換体を探索するとともにより厚みのある結晶化条件を探索中である。また高分解能な回折点が得られるため、ESA-2 に特有な糖認識機構を考える上での詳細な構造が得られることが期待でき、糖基質との複合体の結晶化条件も探索中である。

Y. Kamiya, K. Hori, K. Gekko and K. Katayanagi : Crystallographic study of new lectin from algae.