1P009

古細菌 *P. horikoshii* 由来リボソームタンパク質 S7 の X 線結晶構造解析

○保坂 晴美¹、姚 閔¹、木村 誠²、田中 勲¹ (¹ 北大院・理、² 九大院・農)

超高度好熱古細菌 *Pyrococcus horikoshii* 由来のリボソームタンパク質 S7 (PhoS7) の立体構造を 2.1 Å 分解能で決定した。S7 はリボソームの 30S サブユニットのヘッドを構成するタンパク質である。16S rRNA の 3' 大ドメインと結合することによって、30S サブユニットのヘッド領域の初期段階会合における中心的役割を果たす。また、E サイトに結合した tRNA とコンタクトする位置にあり、遺伝暗号解読にも何らかの役割を果たしていることが期待されている。先に我々は真正細菌由来 S7 の構造を報告しており、S7 はフレキシブルな N 末領域を中心にして 16S rRNA と結合することがわかっている。しかし、古細菌 S7 では N 末の領域が真正細菌 S7 に比べて約 50 残基長く、また *PhoS7* では rRNA 結合ループに 20 残基の挿入があることなど、構造上の重要な違いが存在する。

結晶化は 20 °C においてハンギングドロップ蒸気拡散法で行った。結晶化条件はタンパク質濃度が 10mg/ml, 0.1M Tris-HCl (pH7.0), 0.2M NaCl, 30% (w/v) PEG3K であった。空間群 *P*3₂21, 格子定数は $a=b=58.9$ Å, $c=118.1$ Å, $\gamma=120^\circ$, 非対称単位中に 1 個の分子を含んでいた。X 線回折データ収集は西播磨にある SPring-8 のビームライン BL44XU にて行った。PhoS7 の構造は *B. stearothermophilus* 由来 S7 の構造をサーチモデルとした分子置換法にて解析した。20-2.1 Å のデータで $R=19.8\%$, $R_{free}=23.5\%$ を得た。

構造解析の結果、真正細菌と一次構造の保存性がない N 末 (1-65 残基) のうち、18-42 残基は α ヘリックスが形成する疎水コアと疎水コンタクトを保ち、44-62 残基は見えなかった。既に解析されている真正細菌由来 30S サブユニット、70S リボソームの構造に重ね合わせることで、真正細菌由来 S7 と古細菌由来 S7 との rRNA 結合様式の違いを明らかにすることができた。

H.Hosaka, Y.Min, M.Kimura and I.Tanaka : Crystal structure of the archaeobacterial ribosomal protein S7

1P011

硫酸還元菌チトクロム c_3 におけるヘムの酸化還元と動的構造

○原田 英里砂^{1,2,3}、福岡 由記²、大村 友章⁴、福西 有間²、河合 剛太⁵、藤原 敏道¹、阿久津 秀雄¹ (¹ 阪大・蛋白研、² 横浜国大・工、³ JBIC、⁴ 三菱重工・横浜研、⁵ 千葉工大)

硫酸還元菌 Miyazaki F 株のチトクロム c_3 は酸化還元電位が -300 mV と非常に低く 1 分子中に 4 つの c 型ヘムを持つ分子量約 14000 の蛋白質である。本研究では NMR により構造の観点から酸化還元電位制御のメカニズムを明らかにすることを目的とした。

¹⁵N 安定同位体標識を用い、多次元 NMR 測定によって完全還元型の構造を決定した。主鎖の RMSD は 0.37 ± 0.05 Å、側鎖は 0.92 ± 0.06 Å であった。得られた構造を完全酸化型 X 線結晶構造と比較するとヘムのプロピオン酸の向きが大きく異なり、ヘム 1、ヘム 2 近傍での構造変化が観測された。これは Miyazaki 株と相同性が高い Hildenborough 株の報告と一致した。他の種でも酸化状態に応じてプロピオン酸の向きが異なることが報告されており、Miyazaki 株に限らずこの動きがヘム間の協同性と関連がある可能性がある。

さらに、完全酸化型及び完全還元型両状態での T_1 、 T_2 、NOE 測定を行い model free 解析を行った。オーダーパラメーター S^2 から、全体として報告されている他のヘムタンパク質と同様に完全酸化型の方が硬い構造をとっており、局所的にヘム 4 の周りで酸化型は揺らぎが大きかった。また、ヘム 1 から 2 の周りに位置する残基のいくつかは還元型が揺らぎが大きく、NMR の構造においてもこの部分の RMSD が大きかった。さらに、化学交換の項 (Rex) がチトクロム b_5 やクラス 1 の c 型チトクロム c においては酸化型で全体的に観測されているのに関わらず、チトクロム c_3 (クラス 3) では還元型でタンパク質の全体にわたって観測された。この全体としての大きな揺らぎが還元型の構造を不安定化し、結果として酸化還元電位を下げる要因の一つになりうると考えられる。

E. Harada, Y. Fukuoka, T. Ohmura, A. Fukunishi, G. Kawai, T. Fujiwara and H. Akutsu : Dynamic structure and redox properties of cytochrome c_3 from *D. vulgaris* Miyazaki F

1P010

NMR による RRF の溶液構造と分子内運動の解析

○岡 伸一郎、吉田 卓也、中野 博明、内山 進、大久保 忠恭、小林 祐次 (阪大薬)

翻訳終結後合成したタンパク質を遊離したリボソームはリボソーム・mRNA・tRNA の複合体となる。これを解離させ再利用する過程は、効率のよいタンパク質合成のために重要である。リボソーム再生因子 (RRF) は、原核生物においてこの過程に必須な分子量 21 kDa のタンパク質因子である。我々は RRF の作用機構について知見を得るため、また RRF をターゲットとした新規抗菌剤の開発にむけて、NMR を用いた解析を進めており、昨年超好熱菌 *Aquifex aeolicus* 由来 RRF についてその溶液内における立体構造を決定した¹⁾。その結果 RRF は 2 ドメイン構造をとっており、全体的に tRNA と類似した形状をしていることを明らかにした。また、ドメイン間の配向に揺らぎがあることが示唆された。そこで今回我々は NMR を用い、各種 RRF について分子内の運動性を解析したので報告する。各種 RRF について主鎖 15N 核の縦緩和時間 T_1 、横緩和時間 T_2 、15N -{1H} hetero NOE を測定した。これらの測定値を満たすような分子内運動モデルを検討し、その運動性を見積もった。その結果、常温菌の生育温度付近では、好熱菌由来 RRF と常温菌由来 RRF との間で特にドメイン II において運動性の差が見られた。これにより、RRF の活性発現にはドメイン II の運動性が重要であると考えられる。そこでドメイン毎の運動と活性の関係をより明らかにするため好熱菌と常温菌由来のキメラタンパク質を作成し同様の解析を進めている。本会ではその結果もあわせて報告したいと考えている。¹⁾ Yoshida, T. et al. (2001) *Biochemistry* 40, 2387-2396

S.Oka, T.Yoshida, H.Nakano, S.Uchiyama, T.Ohkubo and Y.Kobayashi : Molecular dynamics of RRFs

1P012

不溶性グルカン合成酵素 (GTF-I) におけるドメイン間相互作用の熱力学的解析

○稲積 広平¹、児玉 孝雄¹、深田 はるみ² (¹ 九工大・情報工・生化、² 大阪府大・農)

GTF-I は、N 端の触媒ドメイン (GSd, 110 kDa)、C 端のデキストラン結合ドメイン (DXBd, 58 kDa) から構成されており、両ドメインの機能的共役により、スクロースのグルコース残基をデキストラン鎖上に α -1,3 分岐として高い効率で転移する。本研究では、ドメイン間相互作用を熱力学的に解析するために、GTF-I の N 端 85 残基を欠損した GS-6R、GSd を C 端に DXBd を N 端に入れ替えた 6R-GS、GSd が単独で発現した GS の 3 種類のタンパク質について、示差操作熱量計 (DSC) により熱変性に伴う熱容量変化を測定した (図)。その結果、6R-GS は 40 °C 付近と 55 °C 付近にピークを示した。高温側のピーク位置とその大きさは GS とよく一致した。これに対して、GS-6R は 50 °C 付近にピークを 55 °C 付近に肩を示した。これらのことから、6R-GS はドメインの独立性が高く、温度上昇につれ DXBd, GSd の順に変性すると考えられる。一方、GS-6R ではドメイン間の相互作用が強く、DXBd は安定化され、GSd は不安定化されるが、分子全体としては 6R-GS に比べ熱安定性が高くなっていることが示唆される。

K.Inazumi, T.Kodama and H.Fukada : Thermodynamic analysis of the interaction between domains in glucosyltransferase (GTF-I)