1P017

牛由来炭酸デヒドラターゼ II 変異体の X 線結晶構造解析

○齊藤 隆太、佐藤 孝雄、田中 信夫、猪飼 篤（東工大院・生命理工学）

序論 原子間力顕微鏡 (AFM) を用いた蛋白質の延伸による蛋白質単分子力学物性測定研究において牛由来炭酸デヒドラターゼ II（以下 CAII）は以前からよく研究されている。CAII は分子量 30kDa の球状蛋白質である。ヒト由来炭酸デヒドラターゼ（以下 HCA）では C 末端側の数残基が主鎖の内側に入り込み、knot 構造と呼ばれる結び目を形成している。変異体 CAII : Gln253Cys（以下 CAII253Cys）はこの knot 構造を回避して延伸することを目的として設計された蛋白質である。本研究では牛由来の CAII および CAII253Cys について結晶構造解析を行い、これらの蛋白質の立体構造を明らかにすることで蛋白質の立体構造と力学物性の関連性について解明することを目的とした。 **実験** CAII は市販品（フナコシ）をサイズ排除クロマトグラフィーで精製したのち結晶化実験に用い、CAII253Cys は大腸菌によって発現させてやり、これを精製して用いた。沈殿剤として硫酸アンモニウムを用いてバッチ法による結晶化を行い、空間群 P6₁、格子定数 a=b=66.77 Å、c=240.0 Å の結晶を得た。データ測定はシンクロトロン放射光施設 (PF) で行い、分解能 2.3 Å のデータを収集した。HCA の立体構造を雛形として分子置換法による構造解析を行った。 **結果** HCA が結晶中で単量体であるのに対し、CAII は結晶中で二量体構造を取ることが明らかになった。しかしながら CAII はその主要な部位において HCA と非常によく似ていて、C 末端側の knot 構造も見ることができた。これは過去に行われている AFM による CAII の力学物性測定にデータに矛盾がないことを意味している。現在、CAII253Cys について構造解析を進めている。本発表では得られた CAII の立体構造を元に、HCA との構造の相違について、また AFM による CAII の力学物性測定にデータにおける解釈について議論する。

R.Saito, T.Sato, N.Tanaka and A.Ikai : Structural analysis of mutant Carbonic Anhydrase II from bovine.

1P019

高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 由来クエン酸シンターゼリガンド複合体の X 線結晶構造解析

○村上 緑¹、金森 英司¹、河口 真一²、倉光 成紀^{2,3}、横山 茂之^{2,4}、神山 勉^{1,2}（¹名大・院理・物理、²理研・播磨研、³阪大・院理、⁴東大・院理）

クエン酸シンターゼは生体内の中心的代謝経路であるクエン酸回路の最初のステップでオキサロ酢酸とアセチル補酵素 A からクエン酸を合成する酵素である。この反応過程では、本酵素の各サブユニットに存在する大小 2 つのドメイン間の活性部位にまずオキサロ酢酸が結合する。それによって小ドメインが回転し酵素全体に大きなコンフォメーション変化が起こり、アセチル補酵素 A に対する結合部位が新たに出現することが知られている。我々はこれまでに高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 由来のクエン酸シンターゼ (TtCS) を用いて X 線結晶構造解析を行い、1.5 Å の高分解能でリガンド非結合型の立体構造を決定した (第 38 回年会)。本研究では、酵素・リガンド複合体と非結合型 TtCS の立体構造を比較し酵素反応機構の詳細を構造的に明らかにするために、リガンド結合型 TtCS の X 線結晶構造解析を試みた。

結晶化には補酵素 A およびクエン酸とともに TtCS をインキュベートし、硫酸リチウムを沈殿剤に用いた。3 日程度で 1 辺約 0.3mm の柱状結晶が得られ、この結晶を用いて SPring-8・BL41XU にて低温 X 線回折実験を行い 2.3 Å 分解能の回折強度データを収集した。この結晶は空間群 P2₁2₁2₁ (格子定数 a=81.23 Å、b=112.31 Å、c=187.19 Å) に属し、非対称単位中に 2 つの 2 量体が含まれている。非結合型 TtCS を初期モデルとして分子置換法にて初期位相を決定した。位相の改良の結果、オキサロ酢酸結合部位にはクエン酸が結合し、さらにその外側には O-P ループに沿って補酵素 A が結合しているのが観察された。

M. Murakami, E. Kanamori, S. Kawaguchi, S. Kuramitsu, S. Yokoyama and T. Kouyama : Crystal structure of citrate synthase closed form from *Thermus thermophilus* HB8

1P018

NMR によるコリシン E6 の RNase 活性ドメインとインヒビターとの複合体の立体構造解析

○池谷 鉄兵¹、伊藤 隆²、畑中 稔²、中村 周吾¹、板倉 健人¹、大野 光宏¹、横山 茂之²、正木 春彦¹、清水 謙多郎¹（¹東大院・農・応用生命・応用生命工学、²理研・GSC）

コリシンは、Col プラスミドにより SOS 応答時に生産され、このプラスミドを持たない大腸菌を殺すタンパク質性毒素である。このうちコリシン E3、E4、E6 は、16S-rRNA を特異的に切断する RNase 活性を持つ。また、Col プラスミドはコリシン遺伝子とともに免疫インヒビター (Imm) をコードしており、コリシンタンパク質の生産と同時にインヒビターである Imm タンパク質も発現し、宿主大腸菌の自殺を防いでいる。

RNase 活性を示すコリシンの中で、E3 と E6 は、活性ドメイン (CRD) と Imm とともに高い相同性を持っているが、これまでの生化学的、分子生物学的な解析から、CRD-Imm による阻害特異性は非常に厳密で、わずか 1-2 残基の相違アミノ酸がこれに関与するということが明らかになっている。そこで、これらのアミノ酸が立体構造の上で阻害特異性にどう寄与しているか明らかにするため、NMR による構造解析を試みた。

我々は、これまでに NMR を用いてコリシン E6 の活性ドメイン (E6-CRD)、およびそのインヒビターである ImmE6 の構造を決定している。今回、新たに E6-CRD と ImmE6 との複合体の構造解析を行なうために、¹⁵N-標識、および ¹⁵N/¹³C/²H-三重標識したサンプルを調整し、各種の異核種多次元 NMR 測定を行なった。主鎖の帰属には、HNCACB と CBCA(CO)NNH を行ない、側鎖のプロトンの帰属には、H(CCCO)NNH と 3D TOCSY-HSQC、側鎖の炭素の帰属には、CC(CO)NNH を行なった。現在、3D ¹⁵N-NOESY-HSQC と 3D ¹³C-NOESY-HSQC による距離情報をもとに構造計算を行ない、複合体形成にともなう構造変化、および CRD と Imm タンパク質間の相互作用に関わるアミノ酸の解析を進めている。

T.Ikeya, Y.Ito, M.Hatanaka, S.Nakamura, T.Itakura, M.Ohno, S.Yokoyama, H.Masaki, K.Shimizu : Solution structure of the RNase active domain of colicin E6 in the complex with its inhibitor protein by NMR spectroscopy

1P020

Bacillus subtilis リパーゼの活性部位に存在するセリン残基側鎖の multi-conformer

○近藤 英昌¹、鈴木 守²、西宮 佳志¹、川崎 公誠¹（¹産総研・生物遺伝子資源、²高エネ研・物構研）

リパーゼはトリアシルグリセロールを加水分解し脂肪酸とグリセリンを生成する反応を触媒する酵素である。その他にも脂肪酸のエステル化やエステルの転移反応や有機酸の光学選択などの反応を触媒する。また、リパーゼは非常に多くの生物種に由来し、幅広い基質特異性を持っている。そのため化学工業、食品加工、洗剤用などの分野で産業用酵素として広く応用されている。*Bacillus subtilis* リパーゼ (BsL) はリパーゼファミリーの中で最も分子量が小さく (19,400) ミセル化していない低濃度の基質に対しても活性を持つ酵素である。我々は活性・安定性の向上した BsL の分子設計を目指した研究を行っており、その基礎となる野生型 BsL の立体構造情報を得るために X 線結晶構造解析を行い、1.3 Å 分解能の立体構造を決定した。BsL は典型的な α/β hydrolase fold であった。また、活性部位はシートの C 端側に存在し、catalytic triad (Ser77, Asp133, His156) は分子表面に露出している。したがって常に基質が活性部位に到達することができる。そのため interfacial activation を示さないと思われる。分子全体の立体構造および catalytic triad の構造は BsL と同じエステラーゼである cutinase と acetylxylin esterase と類似していた。活性残基の一つである Ser77 の側鎖には 2 つの conformer があることがわかった。また、活性部位近傍には反応生成物であるグリセリンが存在することがわかった。発表ではこれらに基づいて反応機構のモデルについて考察する。

H.Kondo.M.Suzuki,Y.Nishimiya,K.Kawasaki : Multiple conformation observed in catalytic serine of *Bacillus subtilis* lipase