1P037

高度好塩好アルカリ性菌走光性光受容タンパク質はホモ複合体形成能を持つ

○鷲見 正人 (北大院・薬)

高度好塩好アルカリ性菌、*Natronobacterium pharaonis* の走光性は、その膜に存在するバクテリオロドプシン様の光受容蛋白質、ファラオニスフォロドプシン (ppR) と、バクテリア走化性レセプタ様のトランスデューサ蛋白質との相互作用により、細胞内へのシグナル伝達、ひいては鞭毛モータの回転制御が行なわれることで発現すると考えられている。これら光受容蛋白質とトランスデューサは、互いの結合部位が明らかにされつつあるなど、生体内において複合体を形成し機能している可能性が強く示唆されている。しかしその全容については組成比を含めて未だ明らかにされていない。

大腸菌膜に発現させ可溶化後、イオン交換樹脂を用い粗精製した光受容蛋白質試料は安定で、冷蔵所での長期 (年単位) の保存が可能である。経時試料をゲル濾過カラムにかけたところ、可溶化およびイオン交換樹脂による精製直後の試料に比べ溶出時間に差 (低分子量化) が認められた。経時試料を改めてイオン交換樹脂に吸着させ、溶出させた試料ではゲル濾過溶出時間の差が解消した。このことは光受容蛋白質が複数会合して存在、その状態を保持する能力を持つ可能性を示唆する。バクテリオロドプシンおよびその類似蛋白質であるハロロドプシンは三量体を形成することが知られている。しかし、溶出時間からの推定される分子量には倍程度の差しか認められなかった。したがって、ppR は他の類似蛋白質とは異なり、二量体を形成していることが予想される。

M. Sumi : Halo-alkaliphilic archaeal sensory rhodopsin is capable of forming homo-oligomeric complex

1P039

ω -conotoxin MVIIC 改変体の立体構造解析

○小林 邦子、佐々木 亨、佐藤 一紀、河野 俊之 (三菱生命研)

ω -conotoxin MVIIC (ω -CTX MVIIC) はイモ貝の毒液由来のペプチドで、26 アミノ酸残基から成り、分子内で3本のジスルフィド結合を形成している。このペプチドは、 Ca^{2+} チャネルの P/Q 型に結合してイオンの流入を阻害するが、N 型に対しても弱い活性を持つ。我々は、 ω -CTX MVIIC をもとにして、チャネル選択性の非常に高い改変体の作成に成功した。アミノ酸残基を3個入れ替えた (S17K、S19R、K25R) この改変体は、野生型の P/Q 型結合活性はそのまま保持しているが、N 型 Ca^{2+} チャネルに対する活性は大幅に低下した。野生型と改変体の活性の違いが構造の面ではどうなっているのか。この観点から、 ω -CTX MVIIC の改変体の構造を解析し、野生型の構造と比較することにした。野生型および改変体のペプチドを化学合成し、2 次元 ^1H -NMR 測定を行った。立体構造決定には X-PLOR を用いた。野生型と改変体のアミドプロトンのケミカルシフト値の比較によって、以下の知見が得られた。改変体において、野生型と比べてケミカルシフト値がほとんど移動しなかった (± 0.01 未満) のものは、C8、C20、G21、R22、G24 の5残基であった。特に、C20 と G24 は隣接残基を置換したにも関わらず、その影響を受けていない。これらの5残基はいずれも、野生型において β 鎖上に存在する。野生型では3本のジスルフィド結合によってペプチドがコンパクトに折り畳まれ、 β シートを中心にコアが形成されている。したがって、改変体でも β シートの骨格部分は野生型とほぼ同一の構造を保っていると考えられる。現在、詳細な立体構造を解析中であるが、改変体のペプチド表面の電荷分布が野生型と異なるために、活性の違いを生じていると予想される。

K. Kobayashi, T. Sasaki, K. Sato, and T. Kohno : Three-dimensional structure of omega-conotoxin MVIIC analogue

1P038

FTIR 法による高密度リボタンパク質 (HDL) の解析

○奈良 雅之¹、辻田 麻紀²、鍵 裕之³、岡崎 三代¹ (¹ 東医歯大教養、² 名古屋市大医、³ 東大院理)

序: 血漿リボタンパク質は脂質と‘アポリリボタンパク質’と呼ばれるタンパク質とが相互作用しあった巨大粒子で、脂質代謝において重要な役割を果たしている。高密度リボタンパク質 (HDL, 比重 (d) : 1.063 ~ 1.21 Kg/L) はアポリリボタンパク質 A-I 並びに A-II (apo A-I, apo A-II) が主成分タンパク質で、リン脂質 (PL) やコレステロールエステル (CE) と相互作用している。本研究では、HDL サブクラスの構造を比較するために、フーリエ変換赤外分光 (FTIR) 法を用いて調べた。実験: HDL 及び apo A-I, apo A-II はヒト血漿より抽出・精製した。HDL を比重 1.125 Kg/L で超遠心分離して top (HDLt), middle (HDLm), bottom (HDLb) の3つに分画した。赤外測定はスペクトラム 2000 (パーキンエルマー) を用いて、分解 2 cm⁻¹、積算回数 200 回で室温にて測定した。結果と考察: FTIR スペクトルに二次微分演算を用いて比較すると、HDLt, HDLm, HDLb のアミド I バンドはいずれも 1652 cm⁻¹ 付近に最大ピークを示し、類似したスペクトルパターンを示した。脂質のエステル C=O 伸縮バンドは 1737 cm⁻¹ にピークを示し、粒子中の PL と CE を反映したものと考えられる。1737 cm⁻¹ のバンドの強度を比較すると、HDLt Ae HDLm Ae HDLb であり、比重の軽い粒子の方がエステル基を持つ脂質の含量が多いことが確認された。また、apo A-I と apo A-II のアミド I バンドはそれぞれ 1652 と 1656 cm⁻¹ に最大ピークを示し、パターンに少し違いがあることがわかった。HDL サブクラス粒子中のタンパク質について、アポリリボタンパク質のスペクトルに基づいて議論する。

M. Nara, M. Tsujita, H. Kagi and M. Okazaki : Analysis of high-density lipoproteins by FTIR spectroscopy

1P040

電圧感受性 Na チャネルの内部構造

○佐藤 主税¹、上野 豊¹、高橋 勝利¹、佐藤 雅彦²、Engel Andreas³、藤吉 好則⁴ (¹ 産総研、² 伊藤ハム・中央研究所、³ パーゼル大バイオセンター MIH、⁴ 京大・生物物理)

電圧感受性 Na チャネルは神経興奮において主体的な役割を果たし、多くの神経毒および局所麻酔薬のターゲットである。これら電圧感受性チャネルの構造が不明である原因に、結晶作成実験がこれまでうまくいかなかったことが挙げられる。近年、非結晶のタンパク質の電子顕微鏡像からその構造を解く単粒子解析法が、急速に進歩してきている。可溶化された電気鰻 Na チャネル分子を極低温 He ステージ電子顕微鏡像で撮影し、単粒子解析法により調べた (1)。その3次元構造を再構成した結果、高さは 135 オングストロームである。その側表面には膜貫通部位が存在し、その上下に4個づつの穴が存在する。その内部構造は細胞の内側と外側にそれぞれ大きな空洞が存在し、その間をつなぐ4つの狭い通路状の低密度領域によってつながれている。この細長い空洞はチャネルの軸を中心として上の断面図と下の断面図では少なくとも45度回転しており、ねじれていることがわかる。さらにこの低密度領域には、膜貫通部位内に極端に狭い部分が存在する。また、チャネル分子の中心部には細長く密度の高い、外殻構造から離れた中心構造が見られる。高さ約40、直径35 オングストロームであり、X線結晶学で解析された KcsA チャネルの構造よりも若干小さい様に見える。本結果は結晶をつくるのが難しい分子量 200kDa 程度以上の分子に関して、He ステージ電子顕微鏡と単粒子解析法の組み合わせが効果的であることを示している。電圧感受性 K チャネル、Ca チャネルは、Na チャネルとアミノ酸配列上の高い類似性があるため、今回判明した構造と深く関連した立体構造を持つ可能性が高い。(1) The voltage-sensitive Sodium Channel is a bell-shaped molecule with several cavities. C. Sato, et al. Nature 409, 1047-1051 (2001).

C. Sato, Y. Ueno, K. Takahashi, M. Sato, A. Engel, and Y. Fujiyoshi : Internal structure of the voltage sensitive sodium channel