2P045

高度好塩性古細菌 *Halobacterium salinarum* に存在する藍藻時計遺伝子 *kaiC* の相同遺伝子の機能推定

○井原 邦夫、横田 はるみ、石浦 正寛 (名大・遺伝子実験施設)

kaiC 時計遺伝子は、単細胞原核生物である藍藻で初めて見つかった単細胞生物の時計遺伝子群 (*kaiA*, *B*, *C* の 3 種類からなっている) の 1 つである。興味深いことに、*kaiC* の相同遺伝子だけが、古細菌に広範囲にわたって見ついている。我々は、この古細菌に広く存在する *kaiC* 相同遺伝子が持つ生理機能に興味をもち、古細菌の中でも、遺伝子操作に優れている高度好塩性古細菌 (好塩菌) を使って、(1) 好塩性菌で、この *kaiC* 相同遺伝子 (*hkaiC*) がどのように発現しているのか?、(2) *hKaiC* を大腸菌で発現させたタンパク質 (*hKaiC*) がどのような性質を持つのか、そして (3) *hkaiC* 遺伝子の破壊株がどのような性質を示すのか? という 3 点からのアプローチを行った。その結果、(1) 種々の成長段階の好塩菌からトータル m-RNA を調製して、ノーザンハイブリダイゼーションで、*hkaiC* 遺伝子の発現を調べたところ、対数増殖期中期から定常状態になる段階で約 1.0kb のサイズの転写産物が検出できた。(2) 大腸菌で発現させた好塩菌 *KaiC* タンパク質 (*hKaiC*) は、インクルージョンボディの状態で回収されるが、6 M 尿素で抽出され、その後 1 MKCl を含む溶液中で再生できる事がわかった。この再生 *hKaiC* は、ゲルろ過クロマトグラフィーにより 2 量体 (分子量 5 万程度) の形成が推定できた。これまで試した測定条件においては、顕著な ATP 水解活性や DNA 結合活性は見出せなかった。(3) ノボボシオン耐性を指標として、相同組換えを利用して、*hkaiC* 遺伝子の破壊株の作成を試みた。薬剤耐性が安定な株を選択して、*hkaiC* 遺伝子の欠失が生じた株の単離・確認する作業中である。詳細は本大会において発表する。以上の 3 点が明らかになった。

K.Ihara, H.Yokota and M.Ishiura : Function of a *kaiC* homologous gene found in an extremely halophilic archaeon, *Halobacterium salinarum*.

2P047

アミノ酸配列に対する疎水性-両親媒性相関プロット

○朝川 直行、美宅 成樹 (東京農工大・工)

タンパク質の局所構造に対応する疎水性残基の周期性が以前から指摘されてきた。また一方で、我々の研究室で提案されたアミノ酸の両親媒性指標によって、両親媒性残基がタンパク質構造の安定性に関わっていることが示唆されてきた。例えばコイルドコイルと呼ばれる水溶性の細長いタンパク質は、ヘリックスが複数本より集まった構造をしており、その会合面は疎水性残基が出現し、水に露出する部分には親水的な残基が多く現れるという特徴をもつ。そこで、疎水性指標と両親媒性指標を用いて、周期性の解析を行い、タンパク質の構造の特徴との相関を調べることで、タンパク質の構造形成のルールを見出すことを目的とした。

配列中の疎水性残基と両親媒性残基の周期性を解析するシステム、アミノ酸配列物性相関プロット Multiple Correlation Viewer を開発した。このプロットでは、アミノ酸残基に対して割り当てられた疎水性指標と両親媒性指標の自己相関関数と交叉相関関数をグラフ化した。これらの相関関数の計算値の平均をとったプロットも可能にした。またそれぞれの指標のみによる値もプロットした。これによって、アミノ酸配列の各部位がどのくらいの疎水性、両親媒性を持っているか、また自己相関や交叉相関を持つかということが、ビジュアルに容易に観察することができるようになった。

この相関プロットツールの特徴は、WebLab Viewer を組み込み対応するタンパク質の立体構造を見れること、二次構造など見たい領域を入力すれば、その部分をプロットと立体構造の両方にインタラクティブに反映することができることなどである。

このツールは局所的なアミノ酸配列の周期性を示すのに便利な道具になるはずで、今後様々なタイプのタンパク質のアミノ酸配列と立体構造との関係を調べていく予定である。

N. Asakawa, S. Mitaku : Correlation between Hydrophobicity and Amphiphilicity of Amino Acid Sequence

2P046

ウシ由来ニオイ結合性タンパク質の二量体間に存在するセントラルポケットの役割とニオイセンシング

○池松 峰男 (三洋電機・ニューマテ研)

[目的] ウシ由来ニオイ結合性タンパク質 (OBPb) は、鼻や呼吸器粘膜内にホモダイマーとして存在する水溶性タンパク質である。モノマー間にはセントラルポケット (CP) と呼ばれる空間が形成されているが、その機能は明らかではない。そこで、CP に存在するトリプトファン (trp) および結合部位のチロシン (tyr) 由来の蛍光を測定し、CP が結合部位として機能しているか否かを調べ、さらに蛍光によるニオイ定量の可能性を探った。[方法] C 末端のアミノ酸 10 残基を除いた OBPb (OBPb-del) と正常な OBPb (OBPb-norm) を、GST との融合タンパク質として発現・精製した後、GST を切断して得た。250nM に調製した両 OBPb にニオイ物質 (dimethyloctanol (DMO), geraniol, 等) を添加し、25 度 C での trp, tyr の蛍光強度の経時変化、置換時変化、および結合完了時強度を測定した。[結果と考察] OBPb-norm/del とともに経時的な信号増加が見られたが、OBPb-norm では定常値となったのに対し、OBPb-del では最終的に消失した。DMO を使用した場合、OBPb-norm での信号増加が 2 段階あり、この 2 段階目増加時には trp 周辺 (CP 内) が親水性化していた。また、初期結合分子を geraniol で置換した場合、tyr の蛍光強度が大きく低下した。以上の結果を踏まえ、“OBPb へのニオイ結合は、ニオイ分子が先ず CP に結合することから始まる” という結合モデルを提案した。さらに、ニオイ分子結合後の trp 蛍光強度がニオイ物質の対 OBPb 解離定数と相関があることや蛍光によるニオイ物質の定量が可能であることも明らかにした。

M. Ikematsu : The role of the central pocket formed between monomers of bovine odorant binding protein and its relation to odor-sensing

2P048

配列の類似性が低い構造類似タンパク質の総電荷比較

○今井 賢一郎、美宅 成樹 (東京農工大・工)

私たちは、特殊な水溶性タンパク質であるダンベル型タンパク質の予測ツール SOSUdumbbell を開発した。その過程において、ダンベル型タンパク質の構造安定性には、総電荷が重要なパラメータであることが分かった。そこで、他のタイプの水溶性タンパク質においても、物理的に明らかな総電荷というパラメータが構造と相関を持っている可能性があると考えられる。

そこで、本研究では、いくつかの代表的なフォールドに注目し、それと同じフォールドに分類され、配列類似性の低いタンパク質について、総電荷の比較を試みてみた。

今回の解析には、立体構造分類データベースである SCOP (Structural Classification of Proteins) から、タンパク質の構造のタイプ (all- α 、all- β 、 $\alpha+\beta$ 、 α/β) ごとにいくつかの代表的なフォールドを持つタンパク質をまず抽出した。次に、これと同じフォールドを持ち、かつ同程度の配列長を持つものを集め、データセットを作成した。これをデータセットとして用いた。そして、それぞれのフォールドにおけるタンパク質のデータセットからすべてのベアを取り出し、その間の相同性を一つの変数とし、それに対して総電荷の差がどのように分布しているかを調べた。

その結果、配列類似性の低い (相同性 25% 以下) 領域では、今回解析したタンパク質のセットの構造、フォールドタイプに関わらず、総電荷の差は大きく分布していた。つまり、アミノ酸配列の類似性が低い同フォールドタンパク質間では、総電荷が必ずしも保存されていないことが分かった。もちろん、総電荷が非常に似たものもあり、そういった電荷の似ているもの、似ていないものについて、他の相互作用がどのような役割を果たしているかをさらに調べていくことが、今後の課題となると考えられる。

K. Imai, S. Mitaku : Analysis of Representative Set of Similar Fold Proteins with Low Sequence Identity by Total Charge