2H1715

部位特異的固体高分解能 ^{13}C NMR を用いたジアシルグリセロールキナーゼの構造解析

○山口 悟、辻 暁、斉藤 肇（姫路工大・院理）

ジアシルグリセロールキナーゼ (DGK) はジアシルグリセロール (DG) をリン酸化しフォスファチジン酸 (PA) に変換する膜蛋白質酵素である。微生物の DGK 分子は 121 個のアミノ酸残基からなり、三量体構造が予想されているもののその高次構造は明らかになっていない。本研究ではこれまでバクテリオロドプシン (bR) 研究で展開してきた部位特異的固体高分解能 ^{13}C NMR を用い、DGK の高次構造解析にむけての研究を開始した。大腸菌を用いた大量発現系を使い $[3-^{13}\text{C}]\text{Ala}$ 標識 DGK を調製した。得られた標識試料を非イオン性界面活性剤ドデシルマルトシド (DM) で可溶化を行い固体高分解能 NMR 測定を行った。高出力デカップリングマジックアングルスピニング (DD-MAS) 法から得られた信号は 15.0ppm から 17.5ppm までの分布を示した。この信号は $[3-^{13}\text{C}]\text{Ala}$ 標識 bR とほぼ同じ領域に信号を与えた。二次元結晶をとる bR に比べて DM 中に可溶化された DGK の信号はまだブロードであり、膜蛋白質として必須である界面の寄与が明らかでない。本蛋白質のキャラクタリゼーションとして、脂質二重膜中での膜貫通ヘリックスおよび界面介在ヘリックスの二つのドメインの識別が必須であるが本実験の成功はその道筋を示すものである。さらに脂質二重膜への再構成試料を調製し、上記の点を明らかにすべく固体 NMR 測定を行い、その構造とダイナミクスについて考察を行う。

S.Yamaguchi, S.Tuzi, H.Saito : Structural analysis of diacylglycerol kinase by site-directed high resolution ^{13}C solid state NMR

2I1345

蛋白質立体構造を変えずにアミノ酸配列を単純化する (その3)

○黒田 裕（(現職) 理化学研究所・ゲノム科学総合研究センター・蛋白質構造機能研究グループ）

多くのタンパク質の立体構造は、アミノ酸配列によって一義的に決まっており、個々のタンパク質の立体構造形成に関する情報は、アミノ酸配列中にのみ存在する。我々は BPTI タンパク質を用いて、タンパク質の機能、あるいは立体構造を壊すことなく、アミノ酸配列中に存在する情報量を大きく減少させることが可能であると示した。例えば、58 残基から成る BPTI の約半分の残基をアラニンに同時に入れ替えた配列や、わずか 9 種類のアミノ酸で表記した変異型配列が、野生型 BPTI と同じ構造と活性を持つことを本学会等で報告して来た (1)。今回は、これらの研究から得られた知見を、Shannon の情報エントロピー値を用いて解析し、構造を持たない単純配列 (low-complexity region) との関係を考察する。

(1) Y.Kuroda and P.S.Kim (2000). Folding of BPTI variants in which almost half of the residues are alanine, J Mol. Biol.298,493-501
本研究は HFSP のサポートで行ったことを記する。

Y. Kuroda : Simplified amino acid sequences that fold into native structures

2I1330

フォールディング・エレメント内外への変異がフォールディング初期 CD スペクトルに与える影響

○新井 宗仁、横 互介、高橋 尚、巖倉 正寛（産総研・分子細胞・蛋白質デザイン）

フォールディング・エレメント (FE) とは、円順列変異によってペプチド結合が切断されると蛋白質の foldability (安定な立体構造を形成する能力) が影響を受ける領域のことである。ジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR) には 10 個の FE があり (Iwakura et al. (2000) Nature Struct. Biol. 7: 580)、これらの全 FE が存在すれば、円順列変異や二次構造順序の入れ替え (トポロジー変異) を行っても蛋白質は foldable である。面白いことに、FE は水素交換パルスラベル法によって明らかになったフォールディング初期の構造形成部位と高い相関を持つ。このことから、「FE がフォールディング反応の初期事象に関与する」という仮説が得られる。この仮説を検証するために、我々はこれまでに DHFR の全 FE が存在するトポロジー変異体および円順列変異体のフォールディング反応初期 (ストップフローでの混合直後) の遠紫外 CD スペクトルを測定し、それらが野生型のものと同様という結果を得ている。これは上記の仮説を支持する。この仮説をさらに検証するために、今回、FE 内に摂動 (一アミノ酸置換) を加えた変異体 I155L、I155A 及び R44A のフォールディング初期 CD スペクトルを測定した結果、それらが野生型のものから大きく異なることが示された。一方、FE 外に変異を導入した L24V のフォールディング初期 CD スペクトルは野生型と一致していた。これらの結果もまた、上記の仮説を支持している。この仮説から、蛋白質の foldability と、フォールディング反応初期の事象との間に密接な関係があることが示唆される。

M.Arai, K.Maki, H.Takahashi and M.Iwakura : Effects of mutations inside/outside the folding elements on the CD spectra observed early in folding

2I1400

質量分析法によるリボヌクレアーゼの H/D 交換の研究

○神田 昇、山本 竜也、泉 俊輔、月向 邦彦（広大院・理）

ウシ脾臓リボヌクレアーゼ A (RNaseA) は、124 残基のアミノ酸 (分子量 13690) からなる代表的なヌクレアーゼで、その 20-21 残基間のペプチド結合を切断した RNaseS は、S-protein と S-peptide の複合体として存在している。この複合体は酵素機能を保持していることから、その構造・揺らぎ・機能の関係が注目されてきた。揺らぎについては、これまで I R や NMR などを用いた H/D 交換の実験が行なわれているが、複合体についての測定が難しいこともあり、詳細な解析が行われていない。本研究では、質量分析法で RNaseA と RNaseS の H/D 交換を測定することにより、これらの構造の揺らぎの違いについて考察するとともに、揺らぎの研究への質量分析法の有用性について検討した。

質量分析は JEOL 製 SX-102A 型二重収束質量分析計に ESI10HS を組み合わせた ESI-MS により行った。RNaseA と RNaseS の多価イオンの価数分布が類似していることから、溶液中の構造に大きな差はないことが確認された。それぞれについて H/D 交換による質量増加の時間推移を測定した結果、RNaseA が全交換量の 30 % 程度しか交換されないのに対して RNaseS は 70 % 程度交換され、1 ペプチド基の切断で構造の揺らぎが大きく増加することがわかった。また、RNaseS のスペクトルは S-peptide と S-protein に解離した状態で別々に検出され、S-peptide が 70 % 程度交換されるのに対して、ジスルフィド結合が残っている S-protein では 60 % 程度しか交換されないことがわかった。

以上の結果から、質量分析により RNaseS、S-peptide、S-protein の H/D 交換の情報を同時にかつ区別して追跡でき、複合体の揺らぎの研究に質量分析が有用な知見を与えることがわかった。

N.Kanda, T.Yamamoto, S.Izumi, K.Gekko : H/D exchange study of ribonuclease by Mass spectrometry