2R1415

In vitro expression of various proteins for NMR measurements

○Kiyoshi Ozawa^{1,2}, Laurent Guignard^{1,2}, Sharon Pursglove^{1,2}, Gottfried Otting^{1,2}, Nicholas Dixon¹ (¹Research School of Chemistry, Australian National University, Australia, ²Dept. Medical Biochem. & Biophys., Karolinska Institutet, Sweden)

Cell-free expression systems for the production of protein in milligram scales is an important step for protein NMR experiments. Expression of some proteins using the traditional method in *E. coli* results in the formation of insoluble proteins as inclusion bodies, and selective amino acid labeling is difficult and expensive. A cell-free system would be expected to alleviate some of these problems. Here we show the in vitro cell-free expression of various proteins using modifications of Kigawa's system (Kigawa et al. FEBS Lett. 442, 15-19, 1999). PpiB (*E. coli* cytoplasmic peptidyl-prolyl isomerase, 18.2 kDa), whose yield was raised to about 1.2 mg/ml of reaction mixture, was stable-isotope labeled with ¹⁵N-Ala, and ¹³C-Ala/¹⁵N-Arg for NMR spectroscopy (Guignard et al. FEBS Lett. 524, 159-162, 2002). We present ¹⁵N-HSQC spectra of a sample of PpiB labeled using this system.

K. Ozawa, L. Guignard, S. E. Pursglove, G. Otting and N. E. Dixon : In vitro expression of various proteins for NMR measurements

2R1445

固体 NMR による脂質二分子膜に結合した alamethicin の立体構造と配向の解析

○石岡 大輔、内藤 晶、西村 勝之 (横浜国立大院、工)

alamethicin は菌類である *Trichoderma viride* から得られる抗生物質であり、平面膜中で電位依存性イオンチャンネル活性を持つ。alamethicin を構成する 20 残基には立体障害の大きい Aib 残基が多く、N 末端はアセチル化され、C 末端はアミノアルコールになっている。これまで結晶構造や溶液構造は得られているものの、膜に結合した alamethicin の精密な立体構造、さらにはイオンチャンネルとして活性を示す会合体構造は解明されていない。本研究では、中央に位置する Gly11 残基を、¹³C 同位体標識した [1-¹³C]Gly-alamethicin をペプチド合成機により合成し、さらに N 末端と C 末端をそれぞれアセチル化及びエステル化により修飾し、活性を示す alamethicin を得た (Ac-Aib-Pro-Aib-Ala-Aib-Ala-Gln-Aib-Val-Aib-[1-¹³C]Gly-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Gln-Gln-Phe-OCH₃)。得られた alamethicin と DMPC を 1 : 10 のモル比で混合し脂質二分子膜を調製した。この試料を用いて固体 NMR による構造解析を試みた。³¹P NMR スペクトルの結果から alamethicin は 30 ~ 40 °C、特に 40 °C で膜と強く相互作用しているため、二分子膜が磁場に平行に配向することが判明した。また 40 °C において、¹³C MAS NMR スペクトルから得られる ¹³C 等方化学シフト値は alamethicin の Gly11 付近が α ヘリックス構造をとることを示唆した。Slow MAS NMR スペクトルでは、軸対称粉末線形を示したため alamethicin はヘリックス軸周りを高速回転していることが判明した。さらに ¹³C NMR スペクトルからヘリックス軸は膜に垂直に配向することが分かった。以上の結果は alamethicin が膜表面に吸着した状態ではなく、膜貫通状態であることを示している。講演では他のアミノ酸を同様に ¹³C 標識し、 α ヘリックスと 3_{10} ヘリックスのどちらを形成しているのかを判定し、膜に対する alamethicin の精密な配向情報についても発表する。

D.Ishioka, A.Naito, K.Nishimura : Structure and orientation of alamethicin bound to lipid bilayers by solid state NMR.

2R1430

超好熱菌蛋白質の遅い変性反応の NMR スペクトルによる解析

○飯村 哲史¹、八木 宏昌²、小笠原 京子²、阿久津 秀雄²、野田 康夫¹、瀬川 新一¹、油谷 克英¹ (¹関学大・理工、²阪大・蛋白研)

超好熱菌、*P. furiosus* 由来の Pyrrolidone Carboxyl Peptidase (208 残基, 分子量 22.8k, PCP と略す) は、酸性領域で、変性と復元の緩和速度が非常に遅いことが知られている¹⁾。この遅い緩和速度は超好熱菌由来蛋白質が高い熱安定性を示す要因であると思われる。本研究では、この遅い緩和速度の機構をアミノ酸残基レベルで調べるため、NMR 分光法を用いて解析を行った。PCP は Cys を Ser に置換した変異型 (C142/188S) を用いた (PCP-0SH)。NMR スペクトルのピーク帰属は、¹³C と ¹⁵N でダブルラベルした PCP-0SH の 3 次元 NMR による連鎖帰属と 1 種類のアミノ酸残基だけを ¹⁵N ラベルした PCP-0SH の 2 次元 ¹⁵N -¹H HSQC とを組み合わせて行った。NMR による変性実験の前に、種々の濃度の尿素変性 (pH2.4, 30°C) を CD222nm で観測した。その結果、変性曲線が平衡に達するのにほぼ 1 週間を要し、転移尿素濃度は 0.74M、水中の変性の ΔG_{H_2O} は 9.28kJ/mol であった。そこで、尿素濃度は 1、1.5、及び 2M 溶液中で PCP-0SH の変性反応 (pH2.4, 30°C) を 2 次元 NMR ¹⁵N -¹H HSQC のピーク強度の時間変化から観測した。完全に単離した 127 個のピークについて強度変化を調べると、104 個のピーク強度が減少、23 個のピーク強度が増加した。この強度変化における緩和時間の平均値を強度が減少、及び増加するピークそれぞれについて求めた。その値は 0.96M 尿素中ではそれぞれ 43.7±11.0 h と 43.7±13.4 h であった。一方、2.07M では 18.0±1.6 h と 19.1±5.7 h であった。127 個全てのピークが 2 相で解析でき、減少と増加のピークの緩和時間がほぼ同じであったことは、PCP-0SH の変性速度は非常に遅いが、変性反応は 2 状態転移であることを示している。発表ではこの意味を考察したい。

1)Kaushik, J. K. et al. (2002) J. Mol. Biol. 316, 991-1003

S. Iimura, H. Yagi, K. Ogasahara, H. Akutsu, Y. Noda, S. Segawa and K. Yutani : NMR Study on the Unusually Slow Denaturation of Pyrrolidone Carboxyl Peptidase from a Hyperthermophile, *Pyrococcus furiosus*

2R1500

固体 ¹³C NMR による膜結合ダイノルフィンの立体構造と配向の解析

○上岡 多喜子¹、虎谷 秀一²、辻 暁¹、斉藤 肇¹、内藤 晶² (¹姫路工大院・理・生命科学、²横浜国大院・工・機能発現工学)

ダイノルフィン は 17 アミノ酸残基からなる内因性オピオイドペプチドであり、生体内ではモルヒネ様の鎮痛作用を示すことが知られている。これまで我々の研究室で、ダイノルフィンは膜と強い相互作用を示し、膜分断、膜融合活性を有する結果、自発磁場配向膜を形成することを明らかにした¹⁾。さらに、ダイノルフィンの Gly³、Phe⁴、Leu⁵ 残基付近は α ヘリックス構造をとり、Ile⁸、Leu¹² 残基付近はランダムコイルであることが分かった。本研究では、水和したダイノルフィン-DMPC 分散試料から非結合ダイノルフィンを除き、膜結合ダイノルフィンの精密な立体構造を決定することに重点を置いた。N 端側の残基 Gly²、Gly³、Phe⁴、Leu⁵ を [1-¹³C] 標識したダイノルフィンをそれぞれ DMPC 膜に組み込み、高速 MAS、低速 MAS、静止状態における測定に加えて、パウダー状にしたサンプルについて ¹³C NMR 測定を行った。液晶状態では軸対称化学シフトテンソル $\delta_{||}$ 、 $\delta_{\perp}$ が低速 MAS から決定され、静止状態から $\delta_{\perp}$ 成分が配向によって増加することが分かった。rigid な状態からは非対称化学シフトテンソル $\delta_{||}$ 、 δ_{22} 、 δ_{33} 、高速 MAS から δ_{iso} の値を、それぞれのカルボニル炭素について決定した。これらの値を解析した結果、N 端の α ヘリックスは DMPC 膜法線から 30° 程度傾いて膜に挿入しており、法線まわりで速い回転を行う動的な構造であることが判明した。ダイノルフィンと親和性の高い κ 受容体における細胞外ループ II に α ヘリックス領域があることが報告されており²⁾、本研究で得られたダイノルフィンの N 端の α ヘリックス構造は κ 受容体とのヘリックス間相互作用を示唆する興味深い構造である。

1) Naito et al. Biochim.Biophys.Acta, 1558,34-44 (2002).

2) Zhang et al. Biochemistry,41,61-68 (2002).

T.Uezono, S.Toraya, S.Tuzi, H.Saitô, A.Naito : Structure and orientation of dynorphin bound to lipid bilayer as studied by solid state ¹³C NMR