2R1515

NMR法を用いたMHCクラスIタンパク質の相互作用の研究

○中川 将利¹、千葉 かおり²、宇高 恵子³、中西 洋志¹ (¹産総研・生物情報セ、²原研、³京大院理)

【序論】Major histocompatibility complex class I protein (MHCクラスIタンパク質)は、H鎖とL鎖(β 2m)からなるヘテロ二量体であり、細胞内で外来性抗原ペプチドと結合し、細胞表面でキラーT細胞に抗原提示を行うことが知られている。このように免疫応答においてMHCクラスIタンパク質は非常に重要な役割を果たしているにもかかわらず、水溶液中での構造と機能の解析はほとんど進んでいない。今回、我々は抗原ペプチドとMHCクラスIタンパク質との間の相互作用および、H鎖と β 2mとの間の水溶液中での相互作用についてNMR法を用いて解析を行った。

【実験】H鎖と β 2mはそれぞれ大腸菌を用いて大量発現した。抗原ペプチドはペプチド合成器(SHIMADZU PSSM8)を用いて合成し、それらを用いてin vitroでフォールディングを行い、MHCサンプルを得た。NMRの測定はBruker DMX750およびDMX500を用いて行った。

【結果・考察】一次元プロトンNMR測定において、MHCクラスIタンパク質に対し、抗原ペプチドを添加していくとペプチドシグナルの顕著なブロードニング現象が観測された。このブロードニングは抗原ペプチドの種類および残基によって異なることを見出した。また、二次元NOESY測定を行い、抗原ペプチドのTR-NOEを検出した。このNOEの距離情報に基づいて構造計算を行ったところ、抗原ペプチドは β ストランド状の構造でMHCクラスIタンパク質と結合していることが示唆された。さらに、 β 2mの15Nラベル体を用いてHSQCスペクトルの解析も行ったのでその結果についても合わせて報告する。

M. Nakagawa, K. Chiba, K. Uda, and H. Nakanishi : Study on interaction of MHC class I protein by NMR spectroscopy

2R1600

プロテインジスルフィドイソメラーゼの活性部位のミクロ環境とドメイン間相互作用の解析

○宮崎 千穂¹、原田 拓志¹、山口 芳樹¹、栗本 英治¹、浅見 修²、梶野 勉²、稲葉 謙次³、西 義則¹、小林 祐次⁴、加藤 晃一¹ (¹名市大・院薬、²豊田中研・生物部、³京大・ウイルス研、⁴阪大院・薬)

【目的】プロテインジスルフィドイソメラーゼ(PDI)はジスルフィド結合形成の触媒反応を通じてタンパク質の高次構造形成を補助する蛋白質であり、a-b-b'-a'-cという5つのドメインから構成されている。本研究では好熱カビ由来のPDIのNMRスペクトルを解析することによって、aおよびa'ドメインにそれぞれ存在する活性部位のS-S結合の安定性を比較するとともに、PDIのドメイン間の相互作用に関する知見を得ることを試みた。

【方法】大腸菌による大量発現系を構築して、シスチン残基の主鎖カルボニル炭素に¹³C標識を施したPDIを調製してNMRスペクトルを測定した。活性部位のシスチン残基に由来するシグナルをプローブとして還元剤存在下におけるPDIのS-S結合の還元状態を追跡した。さらに、PDIの様々な欠失変異体を作成し、ドメイン間相互作用の解析を行った。一方、活性部位のS-S結合に隣接しているトリプトファン残基の蛍光を指標に活性部位の還元状態を評価した。

【結果・考察】グルタチオンを用いると、aドメインの活性部位のS-S結合が優先的に切断された。一方、ジチオスレイトールを用いた場合は、初めにa'ドメインのS-S結合が優先的に切断されたが、時間の経過とともに再びこのS-S結合が形成され、それに伴ってaドメインのS-S結合が切断された。また、aおよびa'ドメインはアミノ酸配列上の相溶性が高いにもかかわらず、遠位の部位との相互作用により活性部位のミクロ環境の違いが異なっていることが明らかとなった。すなわちドメイン間の相互作用によって2つの活性部位のS-S結合の安定性に違いが生じているものと考察された。現在、超遠心分析法等をあわせて用いてドメイン間相互作用の解析を行っている。

C. Miyazaki, T. Harada, Y. Yamaguchi, E. Kuromoto, O. Asami, T. Kajino, K. Inaba, Y. Nishi, Y. Kobayashi and K. Kato : Structural analyses of protein disulfide isomerase focused on the active sites and domain-domain interactions

2R1545

NMRによるコリシンE6のRNase活性ドメインとその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、板倉 健人¹、大野 光宏¹、中村 周吾¹、横山 茂之²、正木 春彦¹、清水 謙多郎¹ (¹東大院・農・応用生命工学、²理研・GSC)

コリシンは、Colプラスミドにより生産され、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。十数種存在するコリシンの中で、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、コリシンと同時にインヒビター(Imm)も発現させており、宿主菌の自殺を防いでいる。E3、E4、E6の活性ドメイン(CRD)とそれぞれに対応するImmは、互いに高い相同性を持っているが、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によって決定されることがこれまでの解析から示されている。そこで、これらのアミノ酸が立体構造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。

我々のグループでは、阻害特異性解析の足がかりとして、コリシンE6-CRD、ImmE6、ImmE6の変異体(ImmW47C)、およびE6CRD-ImmE6複合体、以上4つの立体構造を決定した。構造解析の結果、E6-CRDの構造は、1つのターン領域と5本のストランドからなるアンチパラレル β シートとからなっていた。またImmE6の構造は4本のアンチパラレル β シートと2つの α ヘリックスからなっていた。

これらの構造とNMRタイトレーション実験から、CRDのImmとの結合部位は、活性中心から離れた領域に位置していることが分かった。また、この領域は、単体の状態では非常にflexibleであったが、複合体形成によって安定な構造をとるようになっていた。一方、予想活性部位の構造は、単量体と複合体とでほとんど変化していなかったことから、Immによる活性調節は、活性部位への直接的な阻害というよりは、活性残基周辺の構造変化によるRNA(またはリボソーム)との結合能の低下によるものと推定される。

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

2R1615

NMRによるフェレドキシン-NADP⁺還元酵素の重水素交換反応の解析

○田村 幸介¹、前田 正洋¹、星野 大¹、山崎 俊夫²、長谷 俊治¹、後藤 祐児¹ (¹阪大・蛋白質研、²理研・ゲノム科学総合研究センター)

【目的】フェレドキシン-NADP⁺還元酵素(FNR)はFAD結合ドメインとNADP⁺結合ドメインからなる。本酵素はFADを非共有結合的に結合した分子量35000のフラビン蛋白質であり、光化学系Iにおいてフェレドキシンを介したNADP⁺の光還元反応を触媒する。これまでに種々の安定同位体標識FNRを作製し、800 MHz NMRを用いて多次元スペクトルの測定を行い、主鎖アミドプロトンの帰属を行った。部分帰属した共鳴ピークの化学シフト値から二次構造領域を見積もったところ、結晶構造と一致していた。本研究では溶液中でのFNRの部分的な構造の強さや水素結合を解析するために重水素交換反応を試みた。

【方法及び結果】アミドプロトンの重水素交換速度は、¹⁵N-標識蛋白質の¹H-¹⁵N HSQCスペクトルを測定することにより得た。凍結乾燥したFNRを重水素化リン酸バッファーに溶解した後、連続的にスペクトルを測定した。得られたスペクトルから各残基に由来する共鳴ピークの強度を算出し、その経時変化を追跡した。その結果、各アミドプロトンの共鳴ピークの強度は指数関数的に減少し、分子表面の α ヘリックスとループ構造に位置する残基は重水素交換の速度が比較的速かった。 β ストランドでは交換の速度が遅く、溶媒から保護されていることがわかった。また40℃、pD8において10日間経過した後も、FAD結合ドメインおよびNADP⁺結合ドメインともに強く保護されている残基が確認され、非常に強固な水素結合を形成していることが示唆された。

K.Tamura, M.Maeda, M.Hoshino, T.Yamazaki, T.Hase and Y.Goto : H/D exchange reaction of ferredoxin-NADP⁺ reductase analyzed by NMR