2R1630

蛋白質発現で形成される不溶性顆粒中の蛋白質二次構造の傾向

○梅津 光央^{1,2}、津本 浩平¹、阿尻 雅文²、熊谷 泉¹ (¹ 東北大・院工・生工、² 東北大・多元研)

網羅的ゲノム研究が進む中大腸菌等を用いた蛋白質の大量調製が行われているが、多くの場合発現した蛋白質が不活性な不溶性顆粒として沈殿してしまう。この不溶性顆粒中の蛋白質は活性型の立体構造をしておらず生理活性を有していないことから利用されない場合が多いが、極めて大量に得られ、プロテアーゼによる分解を受けず菌体からの分離精製も容易にできる利点がある。そこで、本研究では β シート構造を主に持つ抗体 HyHEL10 の一本鎖 Fv 断片 (HyHEL10-scFv、 β 構造比率 40%) と α ヘリックス構造を持つ超好熱細菌 *Pyrococcus Horikoshii* OT3 由来 PH0979 コード蛋白質 (α 構造比率 16%) を例にとり、フーリエ変換赤外吸収 (FT-IR) スペクトルと固体核磁気共鳴 (NMR) を用いてそれらの二次構造解析を試みた。

まず、HyHEL-10 scFv の FT-IR スペクトルを測定したところ、 1630cm^{-1} 付近にカルボキシル基由来の吸収帯が存在しており、スペクトル分解の結果その β シート構造比率は約 30% であることが分かった。また、 1655cm^{-1} 付近にも吸収帯が存在したが、交差分極 (CP)/高速マジック角回転 (MAS) 一次元固体 ^{13}C -NMR よりそれらは α ヘリックス構造ではなくランダム構造由来であることが示された。PH0979 コード蛋白質については α ヘリックス構造が約 20% 存在しており、それは CP/MAS ^{13}C -NMR からも確認された。よって、HyHEL-10 scFv、PH0979 コード蛋白質共にある程度天然型構造に近い比率で二次構造が形成されていることが分かった。現在、より詳細な二次構造解析を行なうために現在 RFDR 法とより遠距離の磁化移動が可能なスピン拡散法を用いた二次元同核種 ^{13}C - ^{13}C 相関 NMR の測定を試みている。

M.Umetzu, K.Tsumoto, T.Adschiri and I.Kumagai : The protein structure in the inclusion body formed by expression of recombinant proteins

2R1700

植物グリシンリッチ RNA 結合蛋白質の特異なループ構造

○熊木 康裕¹、新田 勝利¹、松嶋 範男² (¹ 北大院・理学系・生物科学、² 札幌医大・保健医療・物理)

植物のグリシンリッチ RNA 結合蛋白質 (GRP) は、RNA の転写やプロセッシングに関わっていると考えられている。一般に GRP は、N 末端側に約 90 残基の RNA 認識モチーフ (RRM) と C 末端側に約 100 残基のグリシンリッチドメインから構成されている。このグリシンリッチドメインは、数残基連続した Gly が Tyr、Arg によってはさまれた配列が繰り返した特徴をもっており、非常にフレキシブルであると予想される。U1A 蛋白質の RRM ドメインの立体構造は明らかにされている。しかしながら、グリシンリッチドメインの立体構造は全く明らかにされていない。

本研究の目的は、このグリシンリッチドメインの立体構造を NMR を用いて調べることである。まず、22 種類の植物からの 55 個の GRP 配列解析を行い、NMR 実験のために 10 残基からなる短い 2 種類のペプチド配列を選択した。(1) H-GGYGGGRRDG-OH と (2) H-GGRRDGGYGG-OH を合成した。GOESY 実験から、両合成ペプチドとも Tyr の芳香環の ϵ プロトンと Arg の δ プロトンの間に NOE が観測された。また、2 つの連続する Arg 残基の一方のみにおいて、Arg の ϵ プロトンの化学シフトは、ランダムコイル値から大きなずれを示した。これらの実験結果に基づいた構造計算の結果は、両者のペプチドが 4 あるいは 5 残基離れた Arg と Tyr の側鎖同士が互いに近接する特異なループ構造を形成することを示した。グリシンリッチドメインは、(1) や (2) の配列およびそれと類似した配列が繰り返しているため、GRP はこのような数多くのループ構造をとりうると思われる。

Y.Kumaki, K.Nitta and N.Matsushima : An unconventional loop of quasi-repetitive, glycine/arginine/tyrosine-rich amino acid sequences within glycine-rich RNA binding proteins

2R1645

氷核蛋白質タンデムリピートの配列解析と立体構造研究

熊木 康裕¹、新田 勝利¹、○松嶋 範男² (¹ 北大院・理学系・生物科学、² 札幌医大・保健医療学部・物理)

農産物に被害を与える天災の一つとしての霜害は、地表温度が温和な条件下で凍結してしまうことにより起こる。この霜は、氷核活性細菌によるものであることが明らかにされている。この氷核活性細菌の表面には、水が凍ることを促進する氷核蛋白質が存在し、この氷核蛋白質により、細胞外での水の凍結を促進し、細菌は自らの細胞内での致命的な凍結を防いでいる。この氷核蛋白質は、オクタペプチド、Ala-Xaa-Xaa-Xaa-Ser-Xaa-Xaa-Xaa (Xaa は任意のアミノ酸) が、100 回以上も連続して繰り返すタンデムリピートを含む。本研究の目的は、これまで知られている氷核蛋白質タンデムリピート配列を詳細に解析しその分子進化を議論し、また立体構造の研究に利用することである。また、タンデムリピートを形成するペプチド合成し、NMR 法によりその立体構造を明らかにすることである。

氷核蛋白質は 3 つのドメイン構造 (N ドメイン、R ドメイン、C ドメイン) に分けられる。配列解析から、タンデムリピートからなる R ドメインは 3 つのサブドメインに分類できることを見いだした。また、SGLRSVLTAGYGSLSISGRSSLT の 24 残基からなるペプチドの NMR の結果は、LTAGY がループ構造をとることを示した。この結果は、以前行った研究結果を支持している (Tsuda S, Ito A, Matsushima N. FEBS Lett.409:227-231,1997)。

Y.Kumaki,K.Nitta and N.Matsushima : Sequence analysis and structural studies of tandem repeats within ice nucleation proteins