3H0930

超好熱菌トリプトファン合成酵素 α サブユニットの熱安定化に果たす塩結合の役割：熱測定とX線構造解析

○小笠原 京子¹、Kaushik Jai¹、日置 雄策¹、李 守宰¹、石田 真巳²、宮澤 雅之³、山縣 ゆり子³、油谷 克英⁴ (¹ 阪大蛋白質研、² 東京水産大、³ 熊本大院薬、⁴ 関学大理工)

超好熱菌由来の蛋白質は常温菌由来の蛋白質に比べ、一般に多くの塩結合が含まれているので、超好熱菌蛋白質の安定化に塩結合が重要な役割を果たすと思われる。しかし、構造と物性の両面から系統的に塩結合の役割を解明した研究はほとんどない。そこで、私達は、超好熱菌、*Pyrococcus furiosus* のトリプトファン合成酵素 ($\alpha_2\beta_2$ 複合体蛋白質) の α サブユニット (Pf- α 、248 残基、分子量 27.5k、単量体) を取り上げた。この立体構造を常温菌 *Salmonella typhimurium* の α サブユニット (St- α) の構造と比較すると、Pf- α は 4 Å 以内の近距離塩結合を、St- α よりも 8 本多い 13 本も含んでいることがわかったので 1)、これらの塩結合が Pf- α の熱安定化に果たす役割を明らかにするために、Pf- α に含まれる 13 本の塩結合を形成している Glu を Ala に、Asp を Ala または Asn に置換した 15 種の変異型を作成し、変異型の熱安定性をカロリメトリー (VP-DSC、N-DSC) によって測定した。酸性領域から中世領域における変異型の熱変性温度の低下は、塩結合形成の部位によって大きく (4—19 °C) 異なった。各塩結合の Pf- α の安定化への寄与の差異を解析するために、各変異型の結晶化を試み、X線結晶構造解析を行った。7 種の変異型 (D110A、D110N、D17N、E103A、E74A、E244A、D131L32A) については、分解能 2.2-2.4 Å で構造解析を行うことができた。これらの変異に伴う構造変化の解析と安定性の変化から、発表では Pf- α の安定性に各塩結合がどのように寄与しているかを明らかにしたい。 1) Yamagata, Y., et al., (2001) J. Biol. Chem. 276, 11062-11071.

K. Ogasahara, J. Kaushik, Y. Hioki, S. J. Lee, M. Ishida, M. Miyazawa, Y. Yamagata, K. Yutani : Role of salt bridges in thermostability of tryptophan synthase α subunit from hyperthermophile: X-ray analysis and calorimetry

3H1000

銅含有アミン酸化酵素のトパキノン生成反応における低温トラップによるX線時間分割構造

○山口 宏¹、金 美沙¹、岡島 俊英²、吉村 めぐみ¹、岸下 誠一郎²、谷澤 克行² (¹ 関学・理工、² 阪大・産研)

近年、遺伝子中では一般のアミノ酸としてコードされ、翻訳後修飾により補酵素に変換されて酵素反応に用いられるビルトイン補酵素が見つかった。我々は、ビルトイン補酵素の一つであるトパキノン (TPQ) の生成機構をX線構造解析法を駆使して明らかにした。*Arthrobacter grobiformis* フェニルエチルアミン酸化酵素は、補欠金属として2価銅イオンと補酵素としてTPQを含有し、一級アミンの酸化的脱アミノ反応を触媒する酵素である。銅イオンと酸素の存在下、銅イオン結合部位近傍のTyr残基が自動的にTPQへ変換される。このTPQ生成反応を詳細に解明するために結晶中で反応を制御・進行させ、反応中間状態を低温トラップすることにより、時系列に沿ったX線解析を行った。まず、厳密な脱酸素条件下で本酵素前駆体を結晶化し、銅イオンを導入して100Kに冷却し、酸素が存在せず銅イオンのみが結合した中間体のX線結晶解析を行った。次にこの結晶を酸素飽和の結晶母液に移すことによりTPQ生成反応を開始させた。反応開始後数分から数時間の結晶をそれぞれ100Kに冷却し、顕微分光測定によってTPQが生成しているかを確認しながら、時間分割的にX線構造解析を行った。これにより銅イオンが結合しており残基382がTyrのままである第一の中間体、Tyr382が酸化され1原子の酸素が付加したドーパキノン中間体、2原子の酸素が付加している還元型TPQ中間体の3つの中間体構造を決定した(1)。また、酸素の結合部位決定するためXo原子をプローブとして構造解析を行った結果、金属中心から7.6 Åの距離にXoの結合部位を見出した。この部位は、疎水ポケット中にあり、酸素の初期的な結合部位であると推定した。これらの結果より、詳細なTPQ生成の反応機構について議論する。(1) Kim *et al.*, *Nature Structural Biology* (2002), **9**, 591-596.

H.Yamaguchi, M.Kim, T.Okajima, M.Yoshimura, S.Kishishita and K.Tanizawa : Time resolved X-ray structure analysis of topaquinone biogenesis in copper-containing amine oxidase

3H0945

Zoothamnium スパズミンのX線結晶構造解析と溶液中のCD測定

○松本 亮、板橋 岳志、浅井 博 (早大・理工・生命理工)

巨大ツリガネムシ *Zoothamnium* のスパズミンはCa²⁺誘起性収縮器官スパズモネーム内にあり、収縮に必須なCa²⁺結合タンパク質である。このスパズミンのCa²⁺結合状態での結晶化に成功し、その単結晶X線結晶構造解析を行った。また、スパズミンのCa²⁺結合状態、および非結合状態での溶液のCDを測定したのでその結果とあわせてスパズミンのCa²⁺による構造変化に関して報告する。X線構造解析の結果ではCa²⁺結合状態のスパズミンの三次構造は β -sheet およびRandom 構造が主である。CD測定の結果からスパズミンはCa²⁺と結合することにより分子構造の変化が現れることがわかる。CD測定の結果から三次構造を予測するプログラムを使ってスパズミンの分子構造を検討した。その結果、あきらかに α -helix、 β -sheet およびRandom coilの組成比が変化していることがわかった。これらの結果と、スパズモネーム収縮時に複屈折が消失するという当研究室の過去のデータと比較すると、スパズモネーム収縮による組織構造の変化とタンパク質分子構造の変化との関連性が検討される。

R. Matsuki : Crystal structure of Zoothamnium spasmin and its CD spectrum in solution

3H1015

超好熱菌由来 2-デオキシリボース-5-リン酸アルドラーゼのX線結晶構造解析

○津下 英明¹、櫻庭 春彦²、下家 郁子²、勝沼 信彦¹、大島 敏久² (¹ 徳島文理大学・健康科学研究所、² 徳島大学・工学部)

2-デオキシリボース-5-リン酸アルドラーゼ (DERA) はキラル化合物の合成に使える事が報告されている。アルドラーゼ反応物は、光学的な中間体として医薬農業中間体、光学系材料に重要である。大腸菌由来のDERAを用いてアルドール反応を行った報告では、1000単位の酵素を用いて3日間という反応時間が必要であり実用的でない。また酵素の精製に多くのステップが必要であり工業利用に適さない。我々は超好熱菌アエロパイラム・ペルニックス (*Acropyrum Pernix*) 由来の2-デオキシリボース-5-リン酸アルドラーゼの精製を行い、この酵素の工業利用について検討している。さらに結晶構造を明らかにできればその構造ベースの変異体作成すなわち、熱安定性高く利用価値のあるアルドラーゼの設計ができると考えている。また大腸菌由来の2-デオキシリボース-5-リン酸アルドラーゼの結晶構造はPDBにすでに登録されているが、 β バレル構造の分子が結晶中でダイマーをとった構造をしている。超好熱菌DERAでもダイマー構造を取るのかは興味がある問題である。この構造が得られればこの大腸菌由来酵素 (一次構造相同性30%以下) との比較により分子内あるいは分子間のいかなる結合により大きな熱安定性の違いが生まれるのかを解析する事を目的とする。我々は超好熱菌DERA遺伝子の大腸菌での高発現系を作り酵素の精製および結晶のスクリーニングを行ってきた。その結果、沈殿剤としてNaH₂PO₄を用いて直方晶系の結晶を得た。その結晶を用いてインハウスでのNATIVEデータ測定及び、クライオパッファスクリーニング、重原子スクリーニングを行い位相決定を行っている。初期の解析により β バレル構造の分子が非対称単位中でダイマーをとっているが、そのダイマー間相互作用は大腸菌と超好熱菌DERAでは異なっている。

H.Tsuge, H. Sakuraba, I.Shimoya, N. Katunuma, and T.Oshima : Crystal structure of hyper-thermophilic 2-deoxyribose-5-phosphate aldolase.