3H1030

シロイヌナズナ由来 AtCBL2 の結晶構造

○長江 雅倫¹、野沢 彰²、小泉 望²、佐野 浩²、佐藤 衛¹、清水 敏之¹ (¹横浜市大院・生体超分子、²奈良先端大・遺伝子教育)

AtCBL(Arabidopsis thaliana calcineurin subunitB-like protein) ファミリーは高等植物に存在する EF ハンドカルシウム結合タンパク質ファミリーであり、動物のカルシニューリン調節サブユニット (サブユニット B) に高い相同性を示す。AtCBL ファミリーは AtCIPK (AtCBL-interacting protein kinase) ファミリーと呼ばれるセリン/スレオニンキナーゼにカルシウム依存的に結合して活性化する。AtCIPK ファミリーは AtCBL ファミリーと結合する NAF ドメインと呼ばれる保存されたドメインを持つ。AtCIPK ファミリーの生理的機能は多岐にわたり、植物内でのカルシウムを介したシグナル伝達で重要な役割を担っていると考えられている。AtCBL2、AtSR1 はそれぞれ AtCBL、AtCIPK ファミリーに属し、光によって転写が活性化され、特異的に結合して活性化する。今回、我々は AtCBL2 / AtSR1 の分子認識機構を解明することを目指し、カルシウム結合型 AtCBL2 の結晶構造解析に取り組んだ。結晶化はハンギングドロップ蒸気拡散法で行い、最大 $0.3 \times 0.2 \times 0.1 \text{ mm}$ の結晶を得ることができた。結晶は空間群 C2221、格子定数は $a=83.9 \text{ \AA}$, $b=118.1 \text{ \AA}$, $c=49.1 \text{ \AA}$ であった。位相決定は異常分散効果を考慮した多重原子同型置換法 (MIRAS) で行い、最終的に $2.5 \text{ \AA}$ 分解能での構造を決定できた。現在は精密化の過程である。得られた構造は、内部に擬似的な二回軸を有していた。構造が既知のカルシニューリンと比較することで AtCBL 2 と AtSR1 との結合様式を現在検討中である。

M.Nagae, A.Nozaawa, N.Koizumi, H.Sano, M.Sato and T.Shimizu : Crystal structure of AtCBL2 from Arabidopsis thaliana

3H1100

藍色細菌 *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 の時計タンパク質 KaiB の結晶化

○岩瀬 亮¹、今田 勝巳^{2,3}、林 史夫¹、宇津巻 竜也¹、難波 啓一^{2,3}、石浦 正寛¹ (¹名大・遺伝子・植物ゲノム、²ERATO・難波プロジェクト、³阪大・院・生命機能)

藍色細菌は現在生物時計の存在が確かめられている生物の中で最も簡単な構造をした生物であり、常温性の藍色細菌 *Synechococcus* sp. strain PCC 7942 には 3 つの時計遺伝子 kaiABC が存在することが知られている。この遺伝子群は藍色細菌種間で広く相同遺伝子が存在すること、またそれらの遺伝子群が各藍色細菌内で実際にリズムの発振を担っていることが判明しつつある。藍色細菌を用いる意義として、大量培養が容易であること、リズム振動の機構が比較的簡単であると予想されること、表現型を測定できる独自の系を持っているため得られた構造学的、生化学的知見を生理現象の解釈にフィードバックできることなどが挙げられる。今回我々は、材料として好熱性藍色細菌 *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 を使用している。タンパク質の高い熱安定性が期待でき、解析が容易と考えられるためである。これまでの研究で、タンパク質の大量発現系を構築し、精製条件を決定した。精製したタンパク質を用い、約 $200 \mu\text{m}$ の結晶を得ることができた。またこの結晶に X 線を照射することにより実験室系で約 $3 \text{ \AA}$ に相当する回折点を観察することができた。さらにこれらと並行して、重原子置換したタンパク質を用い約 $100 \mu\text{m}$ の結晶を得ることができ、この結晶に X 線を照射することにより実験室系で約 $2.6 \text{ \AA}$ に相当する回折点を観察することができた。時計タンパク質の X 線結晶構造解析は世界初であるとともに、現在全く機能の分かっていない KaiB タンパク質の機能推定の大きな手がかりになると考えている。

R.Iwase, K.Imada, F.Hayashi, T.Uzumaki, K.Namba and M.Ishihara : Crystallization of clock Protein, KaiB, in thermophilic cyanobacterium, *Thermosynechococcus elongatus* BP-1.

3H1045

藍色細菌 *Synechococcus* sp.strain PCC 7942 由来、時計関連タンパク質 Pex の X 線結晶構造解析

○坂田 宗平¹、林 史夫²、石浦 正寛²、神山 勉¹ (¹名大・院理・物理、²名大・遺伝子・植物ゲノム)

序論) 藍色細菌 *Synechococcus* sp.strain PCC 7942 に見出された遺伝子 pex は、サーカディアンリズムの調節にかかわっている。事実、野生株を始め、様々な周期異常変異体について、pex の遺伝子産物である Pex の大量発現を促すと、周期が伸張することが確かめられている。今回、この Pex を単離、精製、結晶化し、X 線回折実験を行った。

結晶化、回折実験) 大腸菌を用いて Pex を大量発現し、精製した。沈殿剤として PEG 20,000 + Dioxane を使用し、ハンギングドロップ蒸気拡散法で結晶化を行ったところ、約 $0.2 \times 0.2 \times 0.2 \text{ mm}^3$ の八面体の結晶を得ることができた。抗凍結剤 (グリセロール) を含む溶液に結晶を浸した後、急速凍結した。SPRING-8・BL41XU において、低温 X 線回折実験を行い、分解能 $7.3 \text{ \AA}$ のデータを収集した。

解析) 格子定数は $a=b=c=192.7 \text{ \AA}$ 、 $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$ と求められ、逆空間における消滅則から、空間群は P4132、もしくは P4332 と予想された。また、Self-rotation function を計算し、結晶の持つ対称要素を調べたところ、ウイルスキャプシド様の非結晶学的対称要素が存在することが分かった。このことより、Pex は結晶中で正二十面体構造を形成しているものと考えられる。

S.Sakata, F.hayashi, M.Ishiura, T.kouyama : X-ray crystallographic study of the clock-related protein Pex from Cyanobacterium *Synechococcus* sp.strain PCC 7942

3H1115

イネ萎縮ウイルスの結晶構造解析

○宮崎 直幸¹、高 潤一郎¹、内藤 久志²、小川 輝¹、中川 敦史¹、藤本 瑞²、水野 洋²、東 貴彦³、渡邊 康雄³、大村 敏博³、Cheng Holland⁴、月原 富武¹ (¹阪大・蛋白研・物理構造、²生物資源研、³中央農総研、⁴Karolinska Institute)

イネ萎縮ウイルスは、レオウイルス科の Phytoreovirus 属に属し、昆虫を媒介としてイネ科植物に感染・増殖する。このウイルスは、粒子量が約 7000 万 Da、直径約 $700 \text{ \AA}$ の 2 重殻構造をもつ球状ウイルスであり、その 2 重殻キャプシド層の内部に転写・キャッピングを行う酵素群と 12 本に分かれた dsRNA からなるウイルスゲノムを保持している。2 層のキャプシドのうち、inner capsid shell は P3 蛋白質 120 個から、outer capsid shell は P8 蛋白質 780 個から構成されている。本研究では、このウイルス全体を結晶化し、X 線結晶構造解析法により $3.5 \text{ \AA}$ 分解能で 2 層のキャプシドの構造と一部の transcription complex の構造を決定することに成功した。inner capsid shell を構成する P3 サブユニットは、他のレオウイルス科の inner capsid 蛋白質に似た板状の構造をしていた。この P3 サブユニットは、2 種の異なったコンフォメーション状態 (P3A・P3B) をとる dimer を形成することにより、2 つの異なった local environment にうまく適応することができているのだが、このコンフォメーション変化が P3 サブユニットの N 末端によってもたらされることが、本構造解析により明らかとなった。キャプシド 2 層間の相互作用の強さを見積もると正二十面体の 3 回軸上にある P8 trimer (T trimer) が inner capsid shell と最も強く結合しており、この T trimer が outer capsid shell がアセンブリーするための scaffold 蛋白質として働いているものと考えられる。さらに、T trimer の向きは inner capsid shell との静電的な相互作用により決定されていることも明らかとなった。

N. Miyazaki, J. Taka, H. Naitou, A. Ogawa, A. Nakagawa, Z. Fujimoto, H. Mizuno, T. Higashi, Y. Watanabe, T. Omura, R.H. Cheng, T. Tsukihara : The structure of the double shelled virus, rice dwarf virus