3K1330

X線溶液散乱法を用いたプロスタグランジンD合成酵素（L-PGDS）の構造変化に関する研究

○井上 勝晶¹、乾 隆^{2,3}、裏出 良博³、八木 直人¹（¹ISpring-8/JASRI、²三重短大・生活科学・栄養、³大阪バイオ研・分子行動生物）

リボカリン型プロスタグランジン (PG)D 合成酵素（L-PGDS）は、おもに脳脊髄液中に存在し、睡眠誘発物質である PGD2 の合成を触媒する酵素で、自然睡眠の誘発に関与していると考えられている。アミノ酸配列の相同性から L-PGDS はリボカリン・スーパーファミリーに分類され、分子内に β -sheet 構造を多く持つ蛋白質であることが明らかにされている。リボカリン遺伝子群は、細胞分化に重要なレチノイド（活性型ビタミン A）などの疎水性の生理活性物質を結合し運搬する輸送蛋白質により構成され、既に 100 種以上のメンバーが報告されているが、本酵素はリボカリン属のなかで唯一「酵素」としての機能を持つ蛋白質であり、輸送蛋白質から機能的に進化したと考えられる。同時にその祖先であるリボカリン的な性質も保持しており、レチノイドや甲状腺ホルモンなど様々な疎水性生理活性物質を高親和性 ($K_d=30\sim 100$ nM) に結合する。これらの興味深い機能は分子進化の過程で獲得したものであると考えられているが、分子構造との関係は解明されていない。蛋白質の構造と機能の相関を詳細にわたり明らかにしていくことは、単に L-PGDS の機能発現機構を明らかにするだけにとどまらず、機能的な蛋白質分子の設計等にも新たな知見を与え、将来的には医学利用の可能性も期待できると考えられる。今回我々は、L-PGDS の輸送蛋白質としての働きがその分子構造とどのような関係を持つのかを明らかにすることを目的とし、各種疎水性基質と L-PGDS 複合体について X 線溶液散乱法を用いた構造解析を試みた。その結果、基質の種類による慣性半径の変化が認められ、基質の大きさによって構造が変化することが明らかになった。この構造的柔軟性が、他の同属分子にはない L-PGDS の疎水性基質に対する “broad selectivity” という性質に反映されていると考えられる。

K. Inoue, T. Inui, Y. Urade and N. Yagi : Studies on the structural change of prostaglandin D synthase (L-PGDS) with X-ray small-angle scattering

3K1400

膜厚依存性を示すメリチンの動的膜結合構造の解析

○虎谷 秀一、西村 勝之、内藤 晶（横浜国大院・工・機能発現工学）

メリチンはミツバチ毒の主成分であり、26 アミノ酸残基から成る両親媒性ペプチドである。メリチンは生体膜の構造を破壊する性質をもち、また、レシチンから成る膜小胞の融合および分断を誘起することが知られている。これまで様々な手法によりその動的な膜との相互作用機構を明らかにする試みがなされてきたが、従来の手法は上述の活性を示さない条件下におけるメリチンの膜結合構造を知ることに限られていた。本研究室の過去の研究によって、メリチンが結合した DMPC 膜小胞は、静磁場に対し膜面を平行にして自発的に配向することがわかった。この系を用いてメリチンの動的構造を固体 NMR により調べた結果、メリチンは液晶相において膜貫通 α -ヘリックス構造をとりヘリックス軸を膜法線から傾けて膜中で二次元的に拡散していることが明らかになった⁽¹⁾。

本研究では、メリチンが膜融合・分断を誘起する機構に対する詳細な知見を得るため膜の厚みを変化させ、その変化がヘリックス軸の傾き角を含むメリチンの動的膜結合構造にどのような影響を及ぼすかを固体 NMR により明らかにする試みを行った。メリチンを DLPC または DPPC から成る膜小胞に結合させ、その動的膜結合構造を固体 ³¹P および ¹³C NMR を用いて解析した。その結果、脂質成分に依存したゲルー液晶相転移点近傍に存在する膜融合・分断平衡点よりも高い温度において、メリチンは、膜法線に対して平行な軸のまわりを回転するように膜中で二次元的に拡散しており、脂質のアシル鎖の長さに応じて回転軸とヘリックス軸が成す角度を変化させることが明らかになった。発表では、メリチンの高分解能膜結合構造を求める新しい手法に重点を置いて研究成果を報告する。

(1) Naito et al. 2000. Biophys. J. 78: 2405-2417

S. Toraya, K. Nishimura, and A. Naito : Dynamic structure of melittin bound to phospholipid vesicle, depending on the membrane thickness

3K1345

1 分子 FRET による Ras の構造変化の可視化解析

○新井 由之¹、和沢 鉄一²、横田 浩章²、岩根 敦子^{3,4}、石井 由晴²、片岡 徹⁵、柳田 敏雄^{2,3,4}（¹阪大院・基礎工・生物工、²JST、³阪大院・生命機能・ナノ生体、⁴阪大院・医学系・情報生理、⁵神大・医学系・第 2 生理）

低分子量 G タンパク質である Ras は、細胞増殖や分化の促進に重要な役割を果たしている代表的なシグナル伝達タンパク質である。細胞内において、Ras は GDP を結合した不活性型であるが、ホルモン等の細胞外刺激により、GTP を結合した活性型へと交換される。これまでの生化学的な研究から、活性型 Ras は多様なエフェクターと相互作用し、様々なシグナル伝達経路に関与していることが明らかとされている。また、NMR による研究から活性型の Ras には動的な構造多型性があることが示唆されている。

近年、1 分子イメージング法がタンパク質の構造多型性を研究する上で強力な手法となりつつある。本研究では、全反射エバネッセント顕微鏡を用いた 1 分子蛍光エネルギー移動 (FRET) イメージングにより、溶液中において Ras 1 分子の構造変化の直接観察を行った。

WT の H-Ras(1-166) 組換え体のチオール基を、マレイミド化した蛍光色素 Cy3 で特異的に標識した。また、Cy5-GTP を合成し、蛍光標識した Ras に取り込ませた。さらに、Ras に特定のエフェクターとのみ結合活性がある T35S、E37G の変異体を部位特異的変位導入法を用いて作成した。

Ras^{WT}.GTP、Ras^{T35S}.GTP、Ras^{E37G}.GTP の 1 分子 FRET を観察し、そのエネルギー移動効率の時系列からヒストグラムを求めた。その結果、WT の Ras はヒストグラムが広く分布していたが、T35S、E37G はヒストグラムが一部分に収束し、エフェクターと相互作用する際の構造に変化していることが示唆された。現在、エネルギー移動効率の時系列解析により、活性型 Ras の構造揺らぎの解析を行っている。

Y. Arai, T. Wazawa, H. Yokota, A. H. Iwane, Y. Ishi T.Kataoka and T. Yanagida : Imaging of conformational changes in single Ras molecule by FRET

3K1415

蛍光分光法によるカルモデュリンとメリチンの複合体形成過程の研究

○花房 朋¹、三沢 浩一¹、飯尾 隆義¹、高橋 敏²（¹名大院・理・物理、²京女大・家政）

4 つのカルシウム結合部位を持つカルモデュリン（CaM）は細胞質内のカルシウム濃度の増減に伴って多彩な標的タンパク質の機能を制御している。我々は CaM とその標的ペプチドとの複合体形成過程解明のためにメリチン (ME:GIGAVLKVLIT TGLPALISWI KRKRQQ) とマストパラン X (MasX:INWKIGIAAMA KKLL-NH₂) を用いることで、MasX-CaM の複合体形成は三状態間転移として起こるのに対し、ME-CaM では二状態間転移として起こることを示した。この相違の原因を探るため本研究では、ME の Trp の位置を 2、4、8、13 番目に変えた ME1、ME2、ME3、ME4 を用いて蛍光分光法によって複合体形成過程を研究した。カルシウム非存在下の低塩濃度 (0.1M KCl) では高塩濃度 (0.4M KCl) に比べてペプチド単独に対してペプチド-CaM ではより大きな蛍光強度の増加とブルーシフトが見られた。これはカルシウム非存在下の低塩濃度で ME の C 端塩基性クラスターと CaM の C 端酸性クラスター間の静電的な相互作用によってペプチドは CaM に結合していることを示している。カルシウムを加えるとペプチド-CaM の構造変化が生じて蛍光変化を示す。ME1、ME2 では pCa7.5 より低いカルシウム濃度において蛍光強度が減少し、pCa7.5 より高いカルシウム濃度では増加に転じるという三状態間転移が見られた。また ME4 では蛍光ピーク波長の変化が同様な三状態間転移を示した。すなわち ME では二状態間転移として観測されていた過程も Trp の位置をペプチドの塩基性クラスターの存在する C 端から N 端に移したことで MasX と同様に三状態間転移となった。このように標的ペプチドの塩基性クラスターと Trp の位置関係が CaM との複合体形成過程に大きな影響を与えていることが明らかになった。

T.Hanafusa, K.Misawa, T.Iio and S.Takahashi : Fluorescence Spectroscopic Studies of Complex Formations between Calmodulin and Melittin