B049

藍色細菌 *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 の時計タンパク質 KaiB の X 線結晶構造解析

○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、²阪大院・生命機能、³ICORP・超分子ナノマシン)

藍色細菌は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る。生物時計の研究に藍色細菌を用いる意義として、遺伝子操作が容易であること、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、表現型を容易に測定できる独自の系を持っているため、得られた生化学的、生物物理学的、構造学的知見が *in vivo* の時計現象の解釈と解析にフィードバックできることなどが挙げられる。常温性の藍色細菌 *Synechococcus* sp. strain PCC 7942 には 3 つの時計遺伝子クラスター *kaiABC* が存在する。この遺伝子群は種々の藍色細菌に広く存在し、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。12 kDa の KaiB タンパク質は溶液中で複合体を形成するが、その他の生化学的性質や機能についてはほとんどわかっていない。

我々は好熱性藍色細菌 *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 由来の時計タンパク質で X 線結晶構造解析を進めている。これまでに、大腸菌で KaiB タンパク質の大量発現系を構築し、タンパク質の精製条件、結晶化条件を確立した。複数の重原子置換体結晶を作製し、SPRING-8 BL41XU および BL38B1 にて X 線回折データを収集した。これらのデータを用いて多波長異常分散法で位相を求め、2.6 Å 分解能の電子密度図を得た。現在、分子モデル構築と共に位相改良を進めている。

R.Iwase, K.Imada, F.Hayashi, T.Uzumaki, K.Namba and M.Ishiura : X-ray crystallographic study of the clock protein KaiB derived from the thermophilic cyanobacterium, *Thermosynechococcus elongatus* BP-1

B051

酸化型 [NiFe] ヒドロゲナーゼに見られる二つの型 (Ni-A と Ni-B 型) の構造化学的研究

○中原 明香¹、緒方 英明¹、柴田 直樹¹、廣田 俊²、樋口 芳樹¹ (¹ 姫工大・院理・生命、² 京都薬大・薬)

[NiFe] ヒドロゲナーゼは細胞中でプロトン濃度勾配の調節を行い、エネルギー代謝を円滑に進める役割をになっている。[NiFe] ヒドロゲナーゼの酸化型 (Ni(III)) は 2 つの構造 (Ni(III)-A 型と Ni(III)-B 型) を持つことが Ni の EPR 測定で明らかにされていた。Ni-A 型は安定であるが活性化に時間のかかる「不活性型」で、Ni-B 型は不安定であるがすぐに水素還元される「活性準備型」である。これまでに X 線解析された酸化型酵素は 2 つの型の混合物であった。両者を作り分ける方法が知られていなかったため、Ni-A の安定型からどのような反応機構で Ni-B に移り、そして還元型 (Ni(II)) に変化するかは全く不明であった。酵素の活性部位の Ni-B 型と Ni-A 型の性質の「差」がどのような配位子構造の違いに基づいているのかを調べるために超高分解能 X 線結晶解析を行なった。最近我々は Ni-A と Ni-B を EPR 的に見て作り分ける方法を発見した。両者を別々に結晶化して X 線解析したところ、Ni-A においては Ni に配位しているシステイン残基 (Cys84 や Cys546) のイオウ原子、さらには Ni と Fe のブリッジ配位子等が修飾されていることがわかった。Ni-B においても Cys546 のイオウは修飾されているものもあったが、修飾原子の配向が Ni-A とは異なっていた。

Asuka Nakahara, Hideaki Ogata, Naoki Shibata, Shun Hirota and Yoshihiko Higuchi : Structural Chemistry of two different states (Ni-A and Ni-B states) of [NiFe]hydrogenase

B050

出芽酵母のプリオン Sup35 のアミロイド線維構造解析

○岸元 愛子^{1,2}、長谷川 和也³、鈴木 博文⁴、田口 英樹¹、吉田 賢右^{1,5}、難波 啓一^{2,4} (¹ 東工大・資源研、² 阪大院・生命機能、³ JASRI、⁴ ICORP・超分子ナノマシン、⁵ ERATO)

核酸を持たない蛋白質性の感染粒子を意味するプリオンは、正常型から異常型への自己触媒的な構造変換に伴ってアミロイド線維を形成する。この現象は、牛の狂牛病や羊のスクレイピーに代表される一群の伝達性海綿状脳症の病原因子として知られている。近年、このプリオン的な挙動を示す因子が酵母でも発見され、プリオンのモデル蛋白質として広く研究されている。しかし、アミロイド線維の詳細な構造は未解明である。現在までに、出芽酵母のプリオン Sup35 線維の構造については、X 線の溶液散乱で、10 Å と 4.7 Å の繰り返し構造が示唆されているのみである。我々の研究グループでは、線維を配向させる技術を用いて Sup35 線維の詳細な立体構造の解析を行っている。Sup35 線維配向試料からの X 線回折像は、新たな繰り返し構造を示す層線を示した。また、配向度と分解能の向上を目指し、以下の方法で切断変異体の構造解析を行った。Sup35 は、プリオン現象を引き起こす N(末端)、高い極性をもつ機能未解明の M(中間)、Sup35 の正常機能を担う C(末端) の 3 つのドメインから構成されている。酵母のプリオン伝播には、NM ドメインが必要であることが示唆されており、通常実験には NM ドメインを用いている。しかし、M ドメインが、線維構造にどれだけ寄与しているかは不明である。そのため、M ドメインの C 末端側からの部分切断変異体の発現系を構築した。我々はまず、精製と線維形成条件を検討し、線維が絡まり合わずに単一な状態で得られる条件を見出した。次に、線維を形成させて配向させ、X 線繊維回折像を観測した。その結果、M ドメインの部分切断変異体と N ドメインのみの変異体の両者ともに、基本的な線維構造は NM ドメインと変わらないことが分かった。また、線維形成条件を変えて線維構造への影響を調べた結果も報告する。

A.Kishimoto, K.Hasegawa, H.Suzuki, H.Taguchi, M.Yoshida and K.Namba : Structural Analysis of Yeast Prion Sup35-Fibers.

B052

Axin-DIX ドメインの結晶学的研究

○山本 亮¹、上田 康史¹、山本 英樹²、菊地 章²、柴田 直樹¹、樋口 芳樹¹ (¹ 姫工大院理、² 広大院医歯薬)

Axin は Wnt シグナル伝達系を負に制御する因子として同定された。Wnt シグナル伝達系タンパク質は初期発生や形態形成過程で生じる細胞間相互作用を仲介し、ショウジョウバエからヒトにいたるまで種を超えて広く保存されている。Axin は Wnt シグナル伝達系タンパク質の一つであり、遺伝子発現を制御する働きを有する b-catenin の細胞質内濃度を制御するタンパク質として知られている。Axin は b-カテニンと GSK-3 β (glycogen synthase kinase-3 β) を同時に結合し、GSK-3 β による b-カテニンのリン酸化を促進する。リン酸化により b-カテニンはユビキチン化とプロテアソームでの分解を受ける。従って Axin は細胞内での b-カテニンの蓄積を妨げ、結果として b-カテニンの核内移行と標的タンパク質の発現、ひいては細胞の分化を抑える。Axin にはそれに結合するタンパク質ごとに結合部位が存在する。Axin は 831 残基から成る単一鎖で構成されるが、少なくとも互いに機能が異なる 3 つのドメインで構成され、それぞれ長いリンカーで結合されていると考えられている。本研究ではそれらドメインのうち、Axin のオリゴマー化と GSK-3 β によるリン酸化を抑制する Dvl タンパク質結合に関係する DIX ドメインの結晶化を行った。結晶化にあたり DIX ドメインを通常の方法で結晶化を行ったところ結晶はできなかった。この原因はシステイン残基による分子間 S-S 結合が原因である事がわかった。そこで分子内にある三個のシステイン残基の SH 基を PCMB で保護した試料を使った。その結果、最長で 0.1 mm 程度の微結晶が得られた。水銀による異常分散効果を用いて MAD 法によるデータ測定を行い、SPRING-8 において 3.3 Å 分解能でのデータ測定を行った。

R Yamamoto, Y Ueda, H Yamamoto, A Kikuchi, N Shibata, Y Higuchi : Crystallographic studies of Axin-DIX domain