B057

北海道大学におけるハイスループット蛋白質構造解析システムの開発

○坂井 直樹¹、伊藤 啓¹、姚 関¹、渡邊 信久¹、田村 具博²、田中 勲¹ (¹ 北大院・理・生物科学、² 産総研・生物機能工学)

網羅的な蛋白質立体構造解析を行う構造ゲノム科学においては高効率で蛋白質構造解析を行う基盤技術が必要である。いわゆるハイスループット蛋白質構造解析技術である。ハイスループット蛋白質構造解析技術において主な手法となるのはX線、NMRである。当研究グループではX線結晶構造解析を中心手法としたハイスループット蛋白質構造解析技術の開発を行ってきた。これまでの開発によるノウハウを導入した蛋白質構造解析ラインを整備し、タンパク 3000 プロジェクト個別的解析プログラム「転写・翻訳」の中核拠点としてプロジェクトに参画している。

蛋白質立体構造解析における問題の一つは解析のために大量の蛋白質を要することである。多種類の蛋白質の構造解析を行う上で蛋白質試料の大量調製はボトルネックとなる。我々は結晶化に要する蛋白質量のスケールダウンを目指すと同時に、組換え発現系を利用したハイスループット蛋白質調製系の構築を行った。

組換え発現系の宿主には大腸菌を利用した。これは培養操作が簡便であり、将来において自動化に耐え得るという判断による。多種蛋白質の組換え発現を同時に行った場合、これらの菌体からの抽出、精製がボトルネックとなる。当研究グループではHisタグ融合組換え蛋白質、蛋白質抽出の並列化、2次元クロマトグラフィーとオートサンプラーを組み合わせ、蛋白質調製の処理能力を向上することに成功した。ハイスループット蛋白質構造解析に必要な技術基盤を整備した構造解析チームを北海道大学次世代ポストゲノム研究棟内に設置し、10月よりタンパク 3000 プロジェクトに関連する蛋白質の調製、結晶化、構造解析の受託を開始する。

N. Sakai, H. Ito, M. Yao, N. Watanabe, T. Tamura and I. Tanaka : A development of the high-throughput protein structure analysis system in Hokkaido University

B059

DsrD 蛋白質の中性子結晶構造解析

○茶竹 俊行¹、水野 伸宏²、樋口 芳樹³、Voordouw Gerrit⁴、田中 伊知郎¹、新村 信雄¹ (¹ 原研・中性子生物、² 京大院・理学系・化学、³ 姫路大院・理学系・生命科学、⁴ カルガリー大・バイオサイエンス)

蛋白質のDNA認識機構において、水和構造や水素結合ネットワークが重要な役割を果たすことはよく知られているが、そのネットワークの詳細はあまりよく知られていない。硫酸還元菌 *Desulfovibrio vulgaris* 由来のDsrD蛋白質は、X線結晶解析によりDNA結合モチーフを持つことが判明している。本研究では、DNA認識における水素結合ネットワークを考える上でのモデル蛋白質として、この蛋白質の中性子結晶解析を行い、水素結合ネットワークについて調べた。中性子結晶解析に適した1mm角以上の結晶を作成するために、結晶析出相図とX線回折実験による結晶化情報の検討を行った。蒸気拡散の系で結晶析出相図の作成を行い、相図上の6条件でX線実験による結晶の品質の定量的な評価を試みた。評価の指標として分解能と結晶の温度因子を使用した。この結果、結晶析出領域の中濃度域で良質の結晶が得られることを見出した。この条件を用いてマクロシーディング法により大型結晶の作成を試み、1.7立方mmの単結晶を得ることに成功した。中性子回折実験はJRR-3MのBIX-3を用いて行った。0.3°刻みで512フレームの中性子回折像を収集した。データ処理は2.4 Åまで行い、Rmerge14.3%の強度データを収率92.5%で得ることが出来た。初期位相は分子置換法を用いて決定した。これに先立ち、既知のX線結晶構造について、パラメーターファイルの統一や電子密度マップ上での細かなズレを補正した。これを初期構造として中性子構造決定を行った。分子モデリングと原子座標の精密化を繰り返して水素原子を徐々に分子モデルに取り込んで行き、最終段階では主鎖のN-H基の軽水素-重水素交換率も精密化した。この結果、2.4 Å分解能の最終構造(R=26.3%、Rfree=31.9%)を得ることが出来た。

T. Chatake, N. Mizuo, Y. Higuchi, G. Voordouw, I. Tanaka and N. Niimura : Neutron crystallographic analysis of DsrD protein

B058

バクテリオファージMuのベースプレートを構成するサブユニットgp44の精製

北澤 大典¹、○武田 茂樹¹、有坂 文雄²、深田 はるみ³、近藤 洋平⁴、月原 富武⁴ (¹ 群大工・生化、² 東工大院・生命理工、³ 大阪府大院・農、⁴ 阪大・蛋白研)

バクテリオファージMuはT偶数系ファージのような収縮性の尾鞘を持つ大腸菌を宿主とする溶原性ファージである。我々はこのファージの自律的形態形成や感染の際の構造変化の仕組みを理解するために、ファージを構成するサブユニットを順次精製している。今回は感染時に大腸菌と結合するベースプレートを構成するgp44を組換え体として精製し、結晶化を行った。組換え体gp44は遺伝子構造からは分子量41,785のサブユニットと予想されたがSDS-PAGE上では41.1Kと39.1Kの2本のバンドを示し、その量比は約2:1であった。N末端配列分析では41.1Kのバンドは遊離アミノ酸を生じず、39.1Kのバンドは開始コドンのメチオニンが切断されたと考えられる分析結果が得られた。従って41.1KはN末端がホルミルメチオニンによって塞がれたままの全長の配列をもち、39.1Kは1番目のメチオニンとC末端側約2Kがプロセッシングされた配列を持つものと予想した。また超遠心分析からgp44は溶液中で分子量114 ± 6.7K、*s* = 6.4 ± 0.2Sの単一分子種であることが示された。以上のことからgp44は41.1Kと39.1Kが2:1で結合した3量体であると判断した。さらにDSCの測定よりgp44の3量体は57.3℃、64.6℃、67.5℃の3段階の熱転移点をもち、67.5℃において熱変性による3量体から1量体への解離が起こることが示唆された。このgp44の立体構造決定のためにX線結晶解析用の結晶を作成した。沈殿剤として20% MDPを用いてpH 6.0 - 7.0においてハンギングドロップ蒸気拡散法で得られたgp44の結晶は、分解能2.4オングストローム程度まで良好な反射を示した。今後、gp44の三次元構造解析と他のサブユニットとの相互作用を検討していく予定である。

D. Kitazawa, S. Takeda, F. Arisaka, H. Fukada, Y. Kondou, and T. Tsukihara : Characterization and crystallization of bacteriophage Mu baseplate subunit, gp44

B060

インスリンの中性子構造解析

○前田 満¹、茶竹 俊行¹、田中 伊知朗¹、栗原 和男¹、新村 信雄^{1,2} (¹ 原研東海研・中性子利用研・中性子構造生物、² 茨大工・システム)

タンパク質の特異性は、立体構造に依存して固有の機能を発揮しており、その立体構造に関する情報はアミノ酸配列に含まれているが、タンパク質中に存在する水素・水和水がこれらの機能にどのように影響を与えているかを調べる直接的な観察手段は、X線構造解析では困難であり、中性子構造解析を用いることが望ましい。しかし、そのためにはX線解析に用いられる結晶と比較して、1 mm³ 以上の大型の結晶育成が必要となる。本研究においては、インスリンの水素・水和構造解析を目的として、まず初めに、ブタインスリン (I2₁₃) の大型結晶化の研究を行った。パッチ法で相図を作成し、この相図から溶解度曲線近傍で結晶化するように透析法を用いた結晶育成方法を行った結果、最大で約4.0 x 4.0 x 1.3 mm³ のブタインスリン単結晶が得ることができた。この結晶を用いて、日本原子力研究所中性子回折装置BIX-typeで、ブタインスリンの中性子回折実験をし、得られたデータを用いて中性子構造解析を行った。中性子構造解析の一例として、インスリンには2つのヒスチジン残基 (B鎖His5,10) があるが、B鎖His5の場合は、窒素 (N_π) が水素化し、窒素 (N_ε) が脱水素しており、他方、B鎖His10の場合は、窒素 (N_π, N_ε) が水素化していることが観察された。現在、構造の精密化を進めており、年会においては、さらに明らかにされたインスリンの水素・水和構造を報告する予定である。

M. Maeda, T.Chatake, I.Tanaka, K. Kurihara and N. Niimura : Neutron protein crystallography of insulin