B061

カルシウムチャネル hTRPM2 の電子顕微鏡による構造解析

○松本 友治、Stanislav Hucek、永山 國昭（岡崎国立共同研究機構・統合バイオサイエンスセンター）

膜タンパク質 TRPM2 はレドックス単位依存性カルシウムチャネルであり、中枢神経細胞において高レベルに発現される。活性化因子 β -NAD⁺ の濃度上昇に伴ない TRPM2 のチャネル活性も上昇し、このことから TRPM2 は細胞内のレドックス状態の変化によって引き起こされる細胞死に関連があるものと考えられている。

すでにヒト全脳の cDNA ライブラリーから取り出された cDNA 断片より全長の hTRPM2 遺伝子が再構成されている¹⁾。これをトランスファー・ベクター pYNGHis(C)/hTRPM2 へと組み込み、組換えバキュロウイルス・カイコ系を用いて hTRPM2 を大量発現させた。目的タンパク質はフッ化界面活性剤ペンタデカフルオロオクタノ酸²⁾を用いることで抽出・可溶化でき、これを ニッケル・キレート・アフィニティカラムクロマトグラフィーならびに微量ゲル濾過によって精製したところ、アミノ酸組成比が既知の配列情報から予想される値とはほぼ一致するサンプルが得られた。

ゲル濾過における主ピーク近傍で予想分子量 160kDa の成分を含むいくつかの分画から負染色試料を作成して電子顕微鏡下で観察したところ、その一つにおいて比較的サイズの揃った多数の粒子像を確認できた。目下、平均化像ならびに初期立体構造モデルを得るべく単粒子解析法による画像データ処理を遂行中である。また、氷包埋試料での単粒子像取得ならびに 2 次元結晶の作成も試みており、本年会ではこれらの結果について報告する。

- 文献 1) Y. Hara et al. (2002) *Molec. Cell* **9**, 163-173.
2) F. H. Shepherd & A. Holzenburg (1995) *Anal. Biochem.* **224**, 21-27.

T. Matsumoto, S. Hucek and K. Nagayama : Structural analyses of the calcium channel hTRPM2 with some electron microscopic methods

B063

氷核蛋白質タンデムリピートのヘアピンループ構造

○熊木 康裕¹、新田 勝利²、松嶋 範男³ (¹北大院・理・NMR、²北大院・理・生物科学、³札幌医大・保健医療)

氷核活性細菌によって分泌される氷核蛋白質 (INP) は水の凍結を促進する。この INP のアミノ酸配列は、約千残基からなる 48 残基を単位配列としたタンデムリピートをもつ。この 48 残基の単位配列は、16 残基および 8 残基の繰り返しと見られることもできる。このタンデムリピートが規則的な立体構造をとることで氷の結晶と相互作用するのではないかと考えられているが、その立体構造はいまだ明らかにされていない。本研究の目的は、このタンデムリピートの立体構造についての情報を得ることである。

本研究では、*Erwinia herbicola* および *Erwinia uredovora* 由来の INP の部分配列をモデルとした 24 残基のペプチド SGLRSVL-AGYGSSLISGRSSLT を合成し NMR 測定を行った。同時に、これまで報告された 10 個すべての INP のタンデムリピート配列を詳細に解析した。NMR の解析の結果、以下のことが明らかになった。(1) T8 と A9 のメチル基のプロトンは、Y11 の芳香環プロトンとの間に NOE を示した。また Leu のメチル基も Y11 の芳香環との間に NOE を示した。(2) S13 の主鎖のアミドプロトンは高磁場シフトを示した。これらの NMR の結果をもとに構造計算した結果、LTAGYGS からなるヘアピンループ構造を形成することが示された。また、配列解析の結果から、LTAGYGS あるいは LIAGYGS がすべての INP において、16 残基の繰り返し単位毎に非常によく保存されていることが明らかにされた。以上の結果から、L(I/T)AGYGS 配列のループ構造が基本構造となったラセン構造をとりうることを示唆された。

Y. Kumaki, K. Nitta and N. Matsushima : Hairpin-loop conformation of tandem repeats in ice nucleation proteins

B062

Neural Network による電子顕微鏡での蛋白質粒子画像の自動拾い上げ法の改良

○小椋 俊彦、佐藤 主税（産総研・脳神経情報部門）

単粒子構造解析法は、タンパク質の結晶サンプルを作成することなく 3 次元構造を解析する方法である。この方法では電子顕微鏡画像より多数の目的粒子画像を切り出し、粒子の位置と角度を合わせて平均化処理をすることで、粒子画像の SN 比を向上させる。そのため、10 Å 程度の分解能を得るためには、数万の粒子画像が必要である。さらに、分解能と解析速度を向上させるためには、高精度な自動粒子画像認識アルゴリズムが必須である。最近、我々は、三層階層型 Neural Network (NN) を用いた単粒子画像認識アルゴリズムを開発し、極めてバックグラウンドノイズの高い Cryo 電子顕微鏡による粒子画像の拾い上げに成功している¹⁾。本論分では、こうした NN の学習過程と認識方法を詳細に解析することで、認識精度をより向上させる方法を探索し、その改良に成功した。本 NN 法では、粒子画像とノイズ画像を学習することで、結合重みの値を変化させ最適な認識システムを構築する。この時、入力層から中間層への結合重みには、粒子の特長情報が生成されている。この情報を詳細に検討したところ、学習された粒子画像の主成分画像とはほぼ同様の情報が抽出されていることが確認された。そのため、粒子画像の主成分画像をあらかじめ結合重みの初期値として与えたところ、学習速度と認識精度の大幅な向上が確認された。本方法により、単粒子画像の切り出しにかかる莫大な時間と労力を劇的に減少させ、単粒子解析における構造解析速度の飛躍的な向上を可能とした。1) Ogura, T. & Sato, C. (2001). An automatic particle pickup method using a neural network applicable to low-contrast electron micrographs. *J. Struct. Biol.*, **136**, 227-238

T.Ogura and C.Sato : An automatic particle pickup method using a neural network has high accuracy by the initial weight setting

B064

海綿由来の細胞毒性化合物ポリセオナミド B の NMR による構造解析

○藤原 正子¹、濱田 季之²、藤田 憲一¹、松永 茂樹³、伏谷 伸宏³ (¹日本電子データム (株)、²理研 GSC、³東大院・農学生命科学)

海洋無脊椎動物から、著しい生物活性と特異な化学構造を有する化合物が多数見いだされている。八丈島産海綿 *Theonella swinhoei* から非常に強い細胞毒性を示す成分として見いだした polytheonamide B は、脂溶性のペプチドで、既存の二次代謝産物中最大の分子量 (MW 5032) を持ち、多くの異常アミノ酸を含むとともに分子全体にわたって D 型と L 型のアミノ酸が交互に配列するという珍しい性状を示した。このペプチドの平面構造の決定および NMR シグナルの帰属は COSY, HOHAHA および NOESY などの解析により行った。さらに、重水素置換実験により明らかにされた 42 個の強固な分子内水素結合、NH-C α H の J 値から得た 48 個の二面角制約条件、および NOESY から得られた 336 個の距離制約条件をもとに、Distance Geometry (DADAS90) 計算を行った。その結果、すべての側鎖が外側を向き、6.3 残基で 1 回転の右巻き β -Helix 型構造をとることが示された。なお、第 44 残基側鎖のスルホキシド基の立体化学は検討中である。ヘリックスの片側にアスパラギンが並ぶことと膜毒性機能との関連が示唆された。

M. Fujiwara, T. Hamada, K. Fujita, S. Matsunaga and N. Fusetani : NMR structure of polytheonamide B from the marine sponge *Theonella swinhoei*