B077

揺らいでいる C 末断片を除去した λ Cro の機能・構造解析

○武蔵 映^{1,2}、杉本 宏²、城 宜嗣²、磯貝 泰弘² (¹法政大・工・物質化学、²理研・生体物理化学)

λ Cro は、 λ ファージの溶原化に関与する DNA 結合蛋白質で、最も古くから知られている転写因子の一つである。全長 66 残基のサブユニットからなるホモダイマーで、それぞれのサブユニットの C 末端領域に存在するフェニルアラニン (Phe-58) を他方のサブユニットが取り囲むようにして 2 つの疎水性コアを形成する特徴的な立体構造をもつ。C 末 6 残基 (-Ser-Asn-Lys-Lys-Thr-Thr-Ala) は特異的な DNA 結合活性に必須であるにもかかわらず、その立体構造は大きく揺らいでおり、蛋白質-DNA 複合体の X 線結晶構造中でも位置が特定されていない (Albright & Matthews, Mol. Biol. 280, 137-151, 1998)。本研究では、この C 末 6 残基の役割を同定するために、 λ Cro の C 末 6 残基の欠損変異体を作製し、構造と機能について解析した。CD と一次元プロトン NMR を用いた解析によると、変異体は野生型と同様な立体構造を保持しており、その安定性も損なわれていない。 λ Cro と DNA の結合は、蛋白質のフォールディング反応とカップルしており、(1) $2U \rightarrow F_2$ 、(2) $F_2 + O \rightarrow F_2O$ (U は unfolded monomer、 F_2 は folded dimer、 O はオペレーター DNA) の 2 つの平衡で説明できる (Jana et al., J. Mol. Biol. 273, 402-416, 1997)。ゲルシフトアッセイ実験によると、変異体は野生型に較べてオペレーター DNA に対する解離定数 (K_2) が約 1000 倍大きかった。蛋白質の安定性 (K_1) には変化がなかったため、変異体の活性は (2) のステップで損なわれていることが判明した。すなわち、単一構造を持たない C 末 6 残基は、DNA 配列の特異的認識に関与している。この機構を X 線結晶構造解析により明らかにするために、変異体 λ Cro の結晶化を行った。六方晶系の結晶を得ることに成功し、SPRing-8 BL44B2 において 2.4 Å 分解能の回折データを収集した。

A. Musashi, H. Sugimoto, Y. Shiro and Y. Isogai : Fluctuated carboxy-terminal domain of lambda-Cro is involved in the specific DNA recognition

B079

家族性パーキンソン病原因遺伝子産物 parkin とマシヤド・ジョセフ病原因遺伝子産物 ataxin-3 の相互作用の NMR 解析

○坂田 絵理¹、山口 芳樹¹、Li Wei²、Claudio A.P. Joazeiro²、田中 啓二³、加藤 晃一¹ (¹名古屋市大・院薬・生命分子構造学、²Genom. Inst. of Novartis Res. Found.、³都臨床研・分子腫瘍)

アルツハイマー病、パーキンソン病 (PD)、脊髄小脳変性症などの神経変性疾患においては、細胞内タンパク質分解系の破綻によりタンパク質の異常な蓄積が引き起こされると考えられている。常染色体劣性若年性パーキンソン症候群 (AR-JP) の原因遺伝子産物である parkin は、E3 ユビキチンリガーゼであり、その N 末端にユビキチン様ドメイン (Ubl) を有する。我々は NMR を用いて parkin-Ubl の三次元構造を決定し、このドメインが 26S プロテアソーム構成サブユニット Rpn10 のポリユビキチン結合モチーフ (PUBS) と相互作用することを明らかにした。PUBS を含むタンパク質は Rpn10 以外にも多く存在しているが、遺伝性脊髄小脳変性症のひとつであるマシヤド・ジョセフ病の原因遺伝子産物の ataxin-3 が PUBS 様モチーフ (PUBH) を有することに着目した。Parkin-Ubl と ataxin-3 の相互作用の可能性について検討するため、PUBH を含んだ ataxin-3 のフラグメント (ataxin-3₂₀₀₋₂₇₅) と parkin-Ubl の結合に伴う NMR スペクトルの変化を解析した。その結果 ataxin-3₂₀₀₋₂₇₅ は、parkin-Ubl 上の Rpn10 結合部位と相互作用していることが明らかとなった。Parkin の Ubl と 26S プロテアソームの Rpn10 が相互作用することにより、基質をポリユビキチン化する識別系と分解系とがカップルした効率的なタンパク質の処理システムが実現されており、ataxin-3 はこのシステムの制御因子として機能している可能性があると考えた。

E. Sakata, Y. Yamaguchi, W. Li, C.A.P. Joazeiro, K. Tanaka, K. Kato : NMR analysis of interaction between parkin and ataxin-3, gene products of neurodegenerative diseases.

B078

バクテリオファージ T4 のテイルリゾチーム (gp5) の切断部位近傍の構造と切断の特異性の解析

○金丸 周司¹、石渡 保敬²、鈴木 俊治³、Rossmann Michael¹、有坂 文雄⁴ (¹パーデュー大・生物、²東工大・生命理工、³東工大・資源研、⁴東工大院・生命理工)

テイルリゾチーム (gp5) はバクテリオファージ T4 の構造形成および感染に必須の蛋白質である。gp5 は 63 kDa の前駆体として発現され、プロセッシングをうけて gp5* (38 kDa) と C 末端フラグメント (25 kDa) に切断されそのまま複合体を形成する。近年我々は X 線結晶構造解析により gp5-gp27 複合体の構造を決定した。その構造は、C 末端ドメインが、特徴的な注射針状の三本鎖トリプル β ヘリックスを形成し、この周りには 3 つのリゾチームドメインが位置している。これら、リゾチームドメインと C 末端ドメインの間には、切断部位 (Ser351 と Ala352) および、リゾチームドメインのリゾチーム活性を抑制する部位 (Asp362-Asp365) を含むリンカー 2 が存在する。野生型の結晶構造には切断部位近傍 18 残基の電子密度が見当たらなかった。この切断部位近傍 18 残基の構造と切断の特異性を解析するため、我々は gp5 の Ser351 変異体 8 つを作成した。その結果、大腸菌で発現させると 5 つの変異体 (S351L, K, Y, Q, T) は切断が起こらなかった。2 つの変異体 (S351H, A) は野生型に比べほとんど切断が起こらなかった。驚くべきことに、遺伝子 5 欠損ファージとの *in vivo* 相補性検定の結果、これら変異体全て 37℃ では野生型と同程度相補性を示した。しかし、20℃ まで温度を下げると切断が起こらなかった変異体は約 50% 相補性が減少した。我々は、切断が起こらなかった変異体の 1 つ S351L を gp27 と共に結晶化し、その構造を決定した。その結果、野生型で見えなかった 18 残基の構造も決定することができた。切断部位はその他の部分とは相互作用をしておらず、分子表面に露出し大腸菌由来のプロテアーゼによる切断が容易に行われるような構造を持っていた。

S. Kanamaru, Y. Ishiwata, T. Suzuki, M. Rossmann, F. Arisaka : Processing of gp5 (tail lysozyme) is not essential for bacteriophage T4 infection.

B080

高圧 NMR 法による非天然構造ユービキチンの構造解析

○北原 亮¹、横山 茂之^{1,2}、赤坂 一之^{1,3} (¹理研・細胞情報、²東大・院理、³近大・生物理工)

蛋白質の多様構造に関する研究は、蛋白質の機能と構造の関係、蛋白質の巻戻り問題、プリオンに代表される蛋白質の異常構造への転移問題等様々な問題に知見を与える。我々は天然状態から逸脱した蛋白質の構造を捉える新しい方法として高圧 NMR 法を用いた。高圧 NMR 法は、もともと存在する蛋白質の多様構造間の平衡を、分子体積を軸に、加圧により部分モル体積の小さな方へシフトさせることによって、天然状態から逸脱した構造を観測可能とする方法である。これによって分光学的検出限界外にある“稀な”構造も、高圧下で安定に捕捉され検出可能になる。細胞内でポリユビキチンを形成し蛋白質分解の信号となるユビキチンについて、これまでその構造の全体像を明らかにした。すなわち広い圧力範囲で全残基レベルでの高圧 NMR 実験 (-21~35℃、30~3700 bar) を行うことによって、ユビキチンは N1, N2, I, U の少なくとも 4 つの構造間の平衡状態にあることを明らかにした。高圧下で観測された I 構造は、残基 33-42、C 末端残基 70-76 の部分で構造が壊れた局所変性構造であり、これは速度論的重水素ラベル法により観測された巻き戻り中間体の構造と極めて似ていることが分かった。またその構造が壊れている部分は、一連の酵素 (E1-E3) との相互作用部位と一致することから、我々はこの局所変性構造こそが機能に直接関係する構造であると考えている。最近、その前駆的構造体である N2 構造について、3000 bar の加圧下でのプロトン-プロトン NOE 情報に基づく座標解析を行うことに成功した。この結果に基づいて、ユビキチンが広い構造空間での揺らぎによって、どのように機能を発揮するのかについて考察する。

R. Kitahara, S. Yokoyama, K. Akasaka : Structure determination of non-native conformers in ubiquitin by high pressure NMR