1P009

NMRによるプロテインジスルフィドイソメラーゼのマルチドメイン構造と機能発現の連関の解析

○中野 路子^{1,2}、山口 芳樹^{1,2}、村上 千穂¹、原田 拓志¹、栗本 英治^{1,2}、浅見 修³、梶野 勉³、稲葉 謙次⁴、加藤 晃一^{1,2} (1名市大院薬、²CREST,JST、³豊田中研、⁴京大ウイルス研)

マルチドメイン構造を有するタンパク質において、個々のドメインが相互作用を通じて機能を発現する仕組みは興味深い。プロテインジスルフィドイソメラーゼ (PDI) は小胞体に豊富に存在するマルチドメインタンパク質であり、ジスルフィド結合形成の触媒反応によりタンパク質のフォールディングを補助する働きをしている。本研究は、NMR解析により PDI の機能発現の構造的基盤を明らかにすることを目的とした。

PDI は $a-b-b'-a'-c$ という 5 つのドメインからなり、ヒト PDI の a および b' ドメインはいずれもチオレドキシソフォールドを形成していることが報告されている。我々はまず、NMR を利用して好熱カビ由来 PDI の b' ドメイン、 a' ドメインの三次元構造を決定し、これら 2 つのドメインもやはりチオレドキシソフォールドからなることを明らかとした。NMR および表面プラズモン共鳴法を利用した相互作用解析の結果、基質との結合はもっぱら b' ドメインと a' ドメインの境界に存在する疎水性領域で担われていることも明らかとなった。さらに、 a' ドメインの活性部位に存在する Cys 残基の還元に伴い、両ドメインが近接するような立体構造変化が誘起され、基質結合部位を形成する疎水性領域の露出度が低下することが判明した。また、全長 PDI を対象とした NMR 解析の結果、 a ドメインと a' ドメインに存在する活性部位は異なる酸化還元特性を示し、しかもドメイン間の相互作用を介してそれら 2 つの活性部位間で電子の授受がなされている可能性が示唆された。

このように、高次構造上の相溶性が高いにもかかわらず異なる機能を担う 4 つのドメインの酸化還元状態に応じた相互作用様式の変化を通じて、PDI の活性発現は制御されていると考えられる。

M.Nakano, Y.Yamaguchi, C.Murakami, T.Harada, E.Kurimoto, O.Asami, T.Kazino, K.Inaba and K.Kato : NMR analyses of relationship between multidomain structure and functions of protein disulfide isomerase

1P011

SPR センサーを用いた超好熱菌由来シャペロニンとプレフォルディンとの相互作用解析

○座古 保^{1,2}、吉田 尊雄¹、神前 太郎¹、村瀬 陽介¹、井出 直希¹、飯塚 令¹、船津 高志²、養王田 正文¹ (1東京農工大・工・生命工、²東大院・薬学系)

プレフォルディン (PFD) は、グループ 2 型シャペロニン (CPN) に変性タンパク質を受け渡す役割を果たしている分子シャペロンである。これまでの研究から、PFD は CPN と直接結合することにより、変性タンパク質を受け渡していることが分かっており、PFD については CPN 及び変性タンパク質との結合部位の同定も進んでいる。本研究では、SPR センサーを用いて、超好熱性古細菌 *Pyrococcus horikoshii* OT3, *Thermococcus* sp. strain KS-1 由来 CPN (PhCPN, TKSCPNalpha,, TKSCPNbeta) 及び PFD (PhPFD) 間の相互作用解析を行い、CPN における PFD 結合部位の同定と結合状態の解析を行った。

センサーチップに固定化した PhPFD に対し、 β 型に分類される PhCPN ($K_d=180\text{nM}$) と TKSCPNbeta ($K_d=120\text{nM}$) は、 α 型である TKSCPNalpha ($K_d=920\text{nM}$) に比べ約 8 倍の結合定数を示した。CPN は頂点・中間・赤道ドメインより形成されており、TKSCPN の α 型と β 型の頂点ドメインを交換した変異体は、それぞれの頂点ドメイン型に対応した結合を示した (頂点ドメインが α 型: $K_d=840\text{nM}$, β 型: $K_d=76\text{nM}$)。この結果、CPN は頂点ドメインを介して PFD と結合していることが明らかとなった。

また、既に我々は ATP、AMP-PNP との結合に伴い、TKSCPN が OPEN 構造から CLOSE 構造へと構造変化することを見出している。これらのヌクレオチド存在下で、PFD の CPN への結合・解離がどのように変化するかを議論したい。

T.Zako, T.Yoshida, T.Kanzaki, Y.Murase, N.Ide, R.Iizuka, T.Funatsu, M.Yohda : Interaction analysis between hyperthermophilic chaperonin and prefoldin using SPR sensor

1P010

古細菌由来プレフォルディンとシャペロニンの相互作用の NMR 解析

○西 洋平¹、栗本 英治¹、山口 芳樹¹、座古 保²、吉田 尊雄²、養王田 正文²、加藤 晃一¹ (1名市大・院薬・生命分子構造学、²東京農工大・生命工学)

【目的】プレフォルディン (PFD) は新生・変性蛋白質を認識・結合し、グループ II 型シャペロニン (CPN) へ受け渡しをするシャペロニン補因子である。古細菌由来 PFD は $\alpha_2\beta_4$ という分子量約 90 kDa の六量体で、X 線結晶解析により立体構造が明らかにされているが、CPN との相互作用の詳細は不明である。本研究では NMR を用いて PFD と CPN の相互作用を解析した。

【方法】大腸菌を用いて PFD の α , β 各サブユニットを別々に発現し、*in vitro* で六量体を再構成させることにより、サブユニット選択的な標識が可能となった。変異体を用いた実験により CPN との結合には、PFD の各サブユニットの末端部分が重要であることが示唆されているため、末端付近に多く分布する Met 残基 (α 1, α 4, α 144, β 1, β 11) のカルボニル炭素を ^{13}C で選択的に標識して CPN との相互作用を解析した。

【結果・考察】アミノ酸選択的な標識により PFD の Met 残基に由来する NMR シグナルを観測することができた。二重標識法およびサブユニット選択的な標識法により帰属したシグナルをプローブとして PFD と CPN の相互作用解析を行った。標識した PFD に対してモル比で 1/2 等量の CPN を加えたところ、 β Met 11 に由来するシグナルは広幅化して消失するのに対して、 β Met 1 は依然としてシャープなシグナルを与えた。また、 α サブユニット由来の Met 残基のシグナルはいずれも若干の広幅化を示すもののスペクトルの中に観測可能なシグナルを与えていた。以上の結果から、PFD の β Met 11 付近は CPN の結合に関わっているのに対し、 β サブユニット N 末端部分および α サブユニット末端付近は結合には関与せず、複合体中においても揺らいだ状態にあることが明らかになった。

Y.Nishi, E.Kurimoto, Y.Yamaguchi, T.Zako, T.Yoshida, M.Yohda and K.Kato : NMR analysis of the interaction between archaeal prefoldin and chaperonin

1P012

超好熱菌由来シャペロニンのプレフォルディンとの相互作用部位の解析

○村瀬 陽介、座古 保、井出 直希、吉田 尊雄、飯塚 令、養王田 正文 (東京農工大・工・生命工学)

[緒言]

プレフォルディン (PFD) は、近年発見された分子シャペロンで、グループ 2 型シャペロニン (CPN) に変性タンパク質を受け渡す役割を果たしていると考えられている。しかし、その詳細な分子機構はまだ明らかになっていない。本研究では受け渡し機構の解明のため、SPR センサーを用いて、超好熱性古細菌 *Pyrococcus horikoshii* OT3, *Thermococcus* sp. strain KS-1 由来野生型及び変異体 CPN (PhCPN, TKS α CPN, TKS β CPN) と *P. horikoshii* OT3 由来 PFD (PhPFD) との相互作用解析を行った。

[実験方法と結果]

PhPFD に対し、PhCPN 及び TKS β CPN は、TKS α CPN に比べ強い結合を示すことが分かっている。これまでの PhPFD 欠損変異体を用いた解析から、CPN との結合には、プラス電価を有するアミノ酸残基が重要であり、TKS α CPN, TKS β CPN に対する相互作用の強さはこのイオン性相互作用に起因していると考えられた。これらの CPN では、PFD の結合部位と考えられている頂点ドメインの 250 及び 256 残基目のアミノ酸の電荷が逆転していた。これらのアミノ酸残基は CPN のふた構造の頂上やや内側に位置している。そこで、TKS α CPN の 250 番目及び 256 番目の Lys を Glu に置換したシングル (K250E, K256E) 及びダブルミュータント (K250E-K256E) を作成し、PhPFD との相互作用解析を行った。その結果、K250E と K250-K256E 置換体は TKS β CPN に近い相互作用を示した。この結果より、250 残基目の Glu の電荷が CPN-PFD の相互作用に大きく寄与していることが明らかとなった。

Y.Murase, T.Zako, N.Ide, T.Yoshida, R.Iizuka, M.Yohda : Identification of prefoldin interaction site of archaeal group II chaperonin