1P013

超好熱性古細菌シャペロニン II 変異体の基質融合型構造の解析

○伊丹 啓祐¹、古谷 昌弘²、丸山 正³、安永 卓生⁴ (¹ 九工大院・情報工・情報科学、² 積水化学、³ JAMSTEC、⁴ 九工大・情報工・生命)

シャペロニンは、その内部の空洞にアンフォールディングタンパク質を閉じ込め、タンパク質のフォールディングを助ける機能を有している。超好熱性古細菌 *Thermococcus* (KS-1 株) において、シャペロニンはグループ II に属し、分子量約 60kDa のサブユニット 16 個で構成されるオリゴマーである。このオリゴマーは、サブユニット 8 つで形成されたリングが 2 つ重なったダブルリング構造をとる。また、この構造の隣接する C 端と N 端は、内部の空洞側に近接して露出している。そこで、共同研究者である古谷らは、サブユニットを 4 つタンデムにリンカーペプチドでつないだ変異体 (基質非融合型) と、さらに基質として GFP を融合した変異体 (基質融合型) を作成し、発現に成功した。このタンパク質の負染色電子顕微鏡写真を撮影したところ、天然のシャペロニン II と同様の構造が観察できた。そこで、我々はこれら二種類 (基質融合型と基質非融合型) の変異体の構造の違いを画像解析することによって、シャペロニン II が基質をその内部に閉じ込めるとどのように構造変化をするのかを調べた。その結果、基質融合型は期待通り基質をその内部の空洞に閉じ込めていることがわかった。さらに、基質融合型の八量体リングの外縁は基質非融合型よりも密度が高く、赤道部・内側では密度が低いことが観察された。この事は、野生型シャペロニン II が基質をその内部の空洞に閉じ込めると、構造変化を起こし、その内部の空洞を広くすることを示唆している。生化学的実験によりこの基質は天然構造をとっていることが示めされており、ここで示した構造はシャペロニン活性反応の中間状態であるかもしれない。今後この変異体を使用することで、細胞にとって毒となるタンパク質の発現が可能となり、応用範囲は広い。

K.Itami, M.Furutani, T.Maruyama, and T.Yasunaga : Structural analysis of hyperthermophilic archaeal chaperonin II mutant fused with substrates

1P015

MHC クラス I と CLIP の結合様式

○竹川 邦子¹、中川 将利¹、堤 遊³、石村 美雪²、森井 尚之²、中西 洋志²、東 隆親¹、小園 晴生¹ (¹ 東京理科大・生命研、² 産総研・分子細胞、³ 産総研・生物情報解析センター)

免疫系において中心的な役割を担う蛋白質の一つである主要組織適合抗原 (MHC) には、2 種類ある。クラス I は、細胞内に存在する抗原ペプチドを提示する。一方、クラス II は、細胞外に存在する抗原ペプチドを提示する。クラス II は、小胞体内でインバリエント鎖と結合する事により抗原提示を開始する。この事は、クラス II に特有の現象と考えられていたが、クラス II とインバリエント鎖由来のペプチド CLIP との結合が最近発見された。

そこで、本研究では、H2K^b を用いて、CLIP との相互作用の物理化学的解析を試みた。ITC による解析は、H2K^b に CLIP が結合した場合と H2K^b と抗原ペプチドが結合した場合とでは、熱放出パターンに差が現れた。この結果から、CLIP とクラス I との間の相互作用は他の抗原ペプチドの場合と異なっていることが示唆された。水溶液中での CLIP とクラス I との相互作用を解析するために ¹H - NMR 法による測定を行った結果、CLIP のみの時はシャープなシグナルが得られたのに対して、H2K^b を加えていくと顕著なブロードニングが観測された。この観測結果により水溶液中で CLIP と H2K^b の相互作用が確認された。また、BIAcore を用いクラス I と CLIP の Affinity について解析したのでそれについても合わせて報告する。

K.Takekawa, M.Nakagawa, Y.Tsutsumi, Y.Ishimura, H.Morii, H.Nakanishi, T.Azuma, and H.Kozono
: A binding mode of MHC class I and CLIP

1P014

グループ II 型シャペロニンにおける Helical protrusion の役割

○飯塚 怜¹、吉田 尊雄¹、座古 保¹、伊野部 智由²、桑島 邦博²、養王田 正文¹ (¹ 東京農工大院・工、² 東大院・理)

古細菌や真核細胞の細胞質に存在するグループ II 型シャペロニンには、GroES に相当する補因子が存在せず、アピカルドメインの先端に位置する Helical protrusion が可動式のフタとして GroES の代わりに機能を担っていると考えられている。またこの領域は、基質タンパク質の結合部位としての機能も示唆されているが、その詳細については未解明な部分が多い。本研究では、超好熱性古細菌 *Thermococcus* sp. strain KS-1 由来 α シャペロニンの Helical protrusion 欠損変異体を作成し、グループ II 型シャペロニンにおける Helical protrusion の役割について検討した。

Helical protrusion 欠損変異体の変性タンパク質結合活性は野生型とほぼ同等であったのに対し、その ATP 依存的タンパク質フォールディング活性は一様に低下していた。これらの結果は、Helical protrusion は基質タンパク質との結合よりも、タンパク質フォールディング活性に重要な部位であることを示している。また、プロテアーゼによる限定分解実験及び X 線小角散乱実験から、野生型は ATP 結合に伴い、フタの開いた構造から閉じた構造へと転換することが明らかとなった。一方欠損変異体は、ATP 結合に伴いフタが閉じるような構造変化は認められなかった。以上より、Helical protrusion の開閉は ATP により制御されており、基質タンパク質のフォールディングには Helical protrusion が可動式のフタとして機能することが重要であると考えられる。現在、可動式のフタの開閉とタンパク質フォールディング活性の相関について、更に詳細な解析を進めている。

R. Iizuka, T. Yoshida, T. Zako, T. Inobe, K. Kuwajima and M. Yohda
: Role of the Helical Protrusion of the Group II Chaperonin

1P016

溶液中における抗原結合からみた抗体分子の柔軟性の研究

○西尾 享子¹、織田 昌幸²、中川 将利¹、佐川 琢麻¹、東 隆親¹ (¹ 東京理科大・生命研・生命情報、² 京都府立大・院農)

抗原 (Ag)-抗体 (Ab) 反応において抗体が複数の抗原結合部位をもつことから、抗原の価数や大きさ及び抗体分子の柔軟性が複合体形成に影響すると考えられる。特に柔軟性の問題は、蛋白質の構造から機能を知る上で非常に重要である。そこで本研究では、ハプテン価数を変えた各種のハプテン-担体蛋白質を抗原として作製し、抗ハプテンモノクローナル IgG 抗体との分子間相互作用を Biacore により測定し、その親和性の違いから複合体形成時の溶液中における抗体分子内セグメントの柔軟性を解析することを目的とした。

ハプテンにニトロフェニルアセチル基 (NP)、担体蛋白質にニトリ卵白リゾチーム (HEL:14kDa) を用いて、ハプテンが正確に 1 価と 2 価の抗原 (NP₁-HEL、NP₂-HEL) を作製し、センサーチップ上に固定化した抗 NP 抗体との相互作用を Biacore で測定した。その結果、NP₁-HEL では単価結合による親和性が認められ、NP₂-HEL では濃度依存的にアビディティによる親和性の上昇が認められた。このアビディティの寄与は結合形態として、抗体分子内で起こる Ag₁Ab₁ 型と、抗体分子間架橋で起こる Ag_nAb_n 型に起因する可能性がある。そこでこれら各複合体の存在確率を明らかにするために、NP とは結合しない他の抗体を 1:1 の割合で抗 NP 抗体と混合し、同時に固定化したセンサーチップ上での相互作用を測定した。この実験系では抗 NP 抗体が隣り合う機会が減るため、Ag_nAb_n 型の形成量が減り、親和性が低下すると考えられるが、得られた結果は抗 NP 抗体のみを固定化した実験系とはほぼ変わらなかった。従って NP₂-HEL では、Ag_nAb_n 型よりも Ag₁Ab₁ 型でアビディティが認められること、さらには HEL 程度の大きさの抗原に対しても IgG 抗体分子内の 2 つの抗原結合部位が同時に結合できることが示唆された。本発表では混合する抗体の割合を変えた Biacore 測定や免疫沈降実験の結果も含めて議論する。

K.Nishio, M.Oda, M.Nakagawa, T.Sagawa and T.Azuma : Segmental flexibility of antibody molecules in antigen binding in solution