1P025

藍色細菌の時計タンパク質 KaiA の構造と機能の解明

○宇津巻 竜也¹、藤田 真康¹、中津 亨²、林 史夫¹、柴田 洋之³、伊藤 典代¹、加藤 博章²、石浦 正寛¹ (1 名大・遺伝子、² 京大院・薬、³ 理研)

藍色細菌の生物時計の発現に必須な時計遺伝子クラスター *kaiABC* は2つのオペロンより構成されており、時計タンパク質 KaiA は *kaiBC* オペロンの発現を促進し、もう一つの時計タンパク質 KaiC はその発現を抑制する。

本研究で、KaiA タンパク質は、N 末端に位置し、時計発振の振幅を増幅する「振幅増幅ドメイン」、中央部に位置し、周期を24 時間に調節する「周期調節ドメイン」、C 末端に位置し、時計の発振を司る「時計発振ドメイン」の3つの機能ドメインより構成されることを明らかにした。C 末端ドメインは KaiA の二量体化、KaiC との結合、KaiC リン酸化の促進に必須であった。

そこで、KaiA の3つの機能ドメインのうち、もっとも重要な機能を担っていると考えられる *T. elongatus* KaiA の C 末端時計発振ドメインの原子構造を、X 線結晶構造解析により 1.8 Å の解像度で解明した。この原子構造を基に、KaiA 分子が形成する凹面最深部にある His270 が KaiC との結合や、KaiC リン酸化促進等に重要であり、時計発振に必須であることを明らかにした。また、原子構造に基づいて、アミノ酸残基の置換とリズム変異の因果関係を明らかにした。

KaiA 分子上の His270 の位置。His270 は KaiA 分子の凹面最深部に位置している。右図は左図を X 軸方向に 90° 回転した図。

T. Uzumaki, M. Fujita, T. Nakatsu, F. Hayashi, H. Shibata, N. Itoh, H. Kato and M. Ishiura : Role of KaiA functional domains in circadian rhythms of cyanobacteria as revealed by crystal structure

1P026

藍色細菌の時計タンパク質 KaiB の X 線結晶構造解析及び機能領域の探索

○岩瀬 亮^{1,2}、今田 勝巳^{3,4}、林 史夫^{1,5}、宇津巻 竜也^{1,5}、古川 進朗^{3,4}、難波 啓一^{3,4}、石浦 正寛^{1,2,5} (1 名大・遺伝子・ゲノム、² 名大院・理・生命、³ 阪大院・生命機能、⁴ ICORP・超分子ナノマシン、⁵ 生研センター)

多くの生理活性を24時間周期で変動させる生体内のリズム発振機構を生物時計と呼ぶ。原核生物で唯一生物時計の存在が確認されている藍色細菌には、リズムを発振する時計タンパク質 KaiABC が存在する。KaiB タンパク質は溶液中で4量体を形成するが、その他の生化学的性質や機能についてはほとんどわかっていない。

我々は好熱性藍色細菌 *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 由来の KaiB タンパク質を結晶化、SPRING-8 にて分解能 2.6 Å の回折データを収集し、MAD 法により解析した。得られた構造は非対称なサブユニットからなる六角板状型の4量体であり、構造から計算した表面電荷の分布には大きな偏りが認められた。我々は、複合体中央の正電荷に富んだ谷状構造 (positive cleft)、それを取り囲む負電荷に富んだ尾根状構造 (negative ridge)、複合体脇の正電荷に富んだくぼみ状構造 (positive hollow) に注目した。これらのサブ構造に変異を導入し、宿主藍色細菌で発現させ、生物発光を用いた *in vivo* リズム解析により変異株のリズムの表現型を調べた。positive cleft に存在する Lys11、Lys43 に変異を導入した変異体はリズム発振能を失った。negative ridge を形成する4つの酸性残基の単独変異ではリズム発振能への影響は少なかったが、これらの酸性残基を全て中性残基に置換した場合にはごく弱いリズムしか発振できなかった。positive hollow の変異は発振に特に影響しなかった。以上の結果より、positive cleft がリズム発振に重要な役割を担っていること、negative ridge の負電荷が補佐的に働いていることが示唆された。

R. Iwase, K. Imada, F. Hayashi, T. Uzumaki, Y. Furukawa, K. Namba and M. Ishiura : Unique tetramer structure of circadian clock protein KaiB reveals its functional site

1P027

T4 ファージ基盤蛋白質 gp10 と gp11 の蛋白質間相互作用

○中尾 朋子¹、Ali Said¹、金丸 周司²、有坂 文雄² (1 東工大院・生命理工・生命情報、² 生物プロセス)

T4 ファージ基盤の形成は、まず構成蛋白質 gp10 に gp11 が結合することから始まる。gp10 を欠損した変異体ではファージの尾部は形成されない。gp11 は3量体を形成し、立体構造が X 線構造解析により明らかになっている¹⁾。遺伝子 10 と 11 の共発現系によって得られた複合体を超速心分析によって解析した結果、両蛋白質は (gp10)₃(gp11)₃ のヘテロ6量体を形成していることが分かった²⁾。この複合体は安定で、20℃では pH6 から pH10 の間で安定である。他方、gp10、gp11 をそれぞれ単独で発現させたところ、いずれも3量体を形成したが、共発現系で複合体が得られる条件 (pH8) で両蛋白質を混合しても複合体は形成されなかった。そこで、pH を6まで下げたところヘテロ6量体が形成されたが、この反応は不可逆で共発現系で得られたヘテロ6量体と同様に安定であり、pH を再び上げて解離は見られなかった。両蛋白質の相互作用をさらに詳細に調べるために、共発現させた gp10-11 複合体を用いて種々の条件下で相互作用を調べるために超速心分析を行った。測定には主として沈降速度法を用い、その結果を移動境界面に Lamm 方程式の数値解を最小二乗法であてはめる Sedfit 法³⁾によって解析した。その結果、複合体は pH10 で一部解離し、pH11 で完全に解離したが、gp10、gp11 ともに3量体構造を維持していた。また、pH 7 において2M 尿素に対しては安定であるが、6M 尿素で各3量体へと解離した。各3量体が安定な条件が確立したので、現在これらの条件を基準として両3量体間の相互作用の pH 及び温度依存性を解析することによって相互作用の物理的基盤を解明する予定である。

- 1) Leiman et al. J Mol Biol. 2000;301(4):975-85.
- 2) Zhao et al. Biochim Biophys Acta. 2000;1479(1-2):286-92.
- 3) Schuck. Biophys J. 1998;75(3):1503-12.

T. Nakao, S. Ali, S. Kanamaru and F. Arisaka : Protein-protein interaction between gp10 and gp11, baseplate proteins from bacteriophage T4

1P028

Protein-protein interactions between gp13, a neck protein, and the connector, gp15, of bacteriophage T4

○Akhter Tahmina、趙 麗、金丸 周司、有坂 文雄 (東工大院・生命理工・生物プロセス)

Gp15 is a tail protein which completes the tail assembly and constitutes the connector on top of the tail. We have previously shown that gp15 forms a hexameric ring when over-expressed in *E. coli*¹⁾. On the other hand, gp13 is a neck protein which attaches to the portal vertex of the head and completes the head formation in the assembly pathway. Upon head-tail joining, gp15, the connector, and gp13 in the head side are expected to bind.

In the present study, an over-expression vector for gp13 was constructed and the gene 13 was expressed in *E. coli* and purified to homogeneity by anion exchange, hydrophobic and gel filtration chromatographies. Sedimentation velocity indicated that it is hydrodynamically homogeneous as a monomer, which was confirmed by sedimentation equilibrium. Gp13 did not interact with gp15 at pH7 or 8, but formed a complex at pH6 in the presence of 50 mM phosphate buffer and 100 mM NaCl as revealed by both gel filtration and analytical ultracentrifugation. Under this condition (pH6), gp13 tends to form aggregation in the absence of gp15. It indicated that gp15 was required for gp13 to assemble. In *in vivo* situation, on the other hand, gp14 or other neck components would be necessary for gp13 assembly. The estimated secondary structure of gp13 from CD spectrum revealed that this protein is rich in α -helix (~40%). The precise stoichiometry of the subunits and the higher order structure of the complex remain to be determined.

- 1) Zhao et al., J. Bacteriology 185, 1693-1700 (2003)

T. Akhter, L. Zhao, S. Kanamaru and F. Arisaka : Protein-protein interactions between gp13, a neck protein, and the connector, gp15, of bacteriophage T4