2P001

超好熱菌トリプトファン合成酵素 $\alpha_2\beta_2$ 複合体の結晶構造

李 守宰¹、○小笠原 京子¹、馬 吉春¹、西尾 和也¹、石田 真巳²、山縣 ゆり子³、月原 富武¹、油谷 克英⁴ (¹ 阪大蛋白研、² 東京海洋大、³ 熊本大院薬、⁴ 理研播磨研)

トリプトファン合成酵素 (TSase) は、2 種のサブユニットからなる $\alpha_2\beta_2$ 複合体である。分離された α と β_2 サブユニットはそれぞれ固有の触媒機能をもっている。複合体を形成したとき、 α と β_2 サブユニットの酵素活性は約 2 桁増幅される。この増幅機構の構造的基盤を知るために、 $\alpha_2\beta_2$ 複合体形成に伴って起こる各サブユニット構造の変化を明らかにすることが求められている。我々は超好熱菌、*Pyrococcus furiosus* の α (248 残基) と β_2 (776 残基) サブユニットの結晶構造を既に報告している^{1,2)}。今回、 $\alpha_2\beta_2$ 複合体の結晶構造を解析した。*S. typhimurium* の $\alpha_2\beta_2$ 複合体の結晶構造はすでに報告されているが、単独構造の解明がまだなされていない。各サブユニットおよび複合体の一連の構造が解かれたのは、今回の *P. furiosus* の TSase が最初である。複合体形成に伴う各サブユニットの構造変化は次のようであった。1) β サブユニットに起こる構造変化は、 α サブユニットでの変化よりも広範囲に亘っている。2) α サブユニットの Ala46 と Leu165 の大きな変化は、 α サブユニットへの基質の入り口を広げる。3) β サブユニットで起こる大幅な変化は、 α サブユニットで生成されたインドールを β サブユニットの活性中心へ移動させるためのインドールトンネルへの入り口およびトンネル幅を広げる。4) α と β の両サブユニットの接触領域では、複合体の安定性を高める水素結合や疎水性相互作用が新たに形成される。以上の変化は、トリプトファン合成酵素 $\alpha_2\beta_2$ 複合体の触媒機能と安定化に有利なものであることが明らかになった。

¹⁾ *J. Biol. Chem.* (2001) **276**, 11062 ²⁾ *Eur. J. Biochem.* (2004) **271**, 2624

S.J.Lee, K.Ogasahara, J.Ma, K.Nishio, M.Ishida, Y.Yamagata, T.Tsukihara, K.Yutani : Crystal structure of tryptophan synthase $\alpha_2\beta_2$ complex from hyperthermophile

2P003

結晶構造に基づいたヒト由来サイトグロビンのリガンド結合機構

○牧野 正知^{1,2}、杉本 宏¹、澤井 仁美^{1,2}、河田 則文³、吉里 勝利⁴、城 宜嗣¹ (¹ 理研播磨、² 兵庫県立大院理、³ 大阪市大院医、⁴ 広大院理)

サイトグロビン (Cgb) は、近年発見された新規ヘム含有グロビン蛋白質である。その特徴は、ミオグロビン (Mb)、ヘモグロビン (Hb) と異なり、様々な臓器組織で発現することである。また Cgb は酸素や一酸化炭素などの外來性配位子と結合することから、Cgb は外來性配位子結合に関係する生理学的機能を担っていると考えられているが、明確には理解されていない。配位子結合に関係するアミノ酸配列は、Cgb、Hb、Mb 間で良く保存されているが、Cgb の配位子結合は Mb、Hb とは顕著に異なった挙動を示す。そこで我々は外來性配位子結合の挙動を立体構造に基づき、原子レベルで理解するため X 線解析法により Cgb の立体構造決定を行った。

Cgb はグロビンフォールドを形成する A~H の 8 つのヘリックスを保持し、その主鎖構造はマッコウジラ Mb と類似している。しかし Cgb は A ヘリックスの N 末端側に、更に一つのヘリックスを持った構造をとる。また H ヘリックスの C 末端側にも約 20 残基からなる長いループを持つ。このような構造はグロビン蛋白質として前例がなく、Cgb 独特のものである。Mb との構造比較より、近位ヒスチジンの存在する F-ヘリックス側では顕著な違いが見られない。一方、第 6 配位座周辺では、Mb の配位子結合に関与するアミノ酸側鎖は、位置、向きとも良く保存されていたが、Cgb のヘム鉄には E-ヘリックスに存在する遠位ヒスチジン (HisE7) が、直接配位した 6 配位構造を形成していた。この E-ヘリックス側の環境の違いが、Mb と Cgb の配位子結合に関する特徴の違いを反映しているものと考えられる。即ち HisE7 が外來性配位子結合部位を占有しヘム鉄に配位しているの、その結合に際しては HisE7 の位置が大きく動く必要があり、Mb には見られない E-ヘリックスの構造変化があると推測できる。

M.Makino, H.Sugimoto, H.Sawai, N.Kawada, K.Yoshizato, Y.Shiro : Ligand binding mechanism of human Cytoglobin based on X-ray crystal structure

2P002

Structural basis for the recognition of a nuclear export cargo (Kap60p) by an exportin (Cse1p) and RanGTP

○松浦 能行、Stewart Murray (MRC-LMB)

Bidirectional transport of macromolecules between cytoplasm and nucleus through nuclear pore complexes is mediated primarily by importins or exportins of the karyopherin-beta superfamily and is orchestrated by the nucleotide state of the Ran GTPase. In contrast to importins, exportins bind to cargoes only in the presence of RanGTP. The yeast exportin Cse1p mediates nuclear export of Kap60p (importin alpha) after import cargoes bearing a nuclear localization signal (NLS) have been released. We present the crystal structure of the Cse1p:Kap60p:RanGTP complex at 2.0 Angstrom resolution that provides a structural framework for understanding nuclear export. The 20 Cse1p HEAT repeats generate an alpha-helical solenoid structure that wraps around both RanGTP and Kap60p so that it stabilizes the binding of the importin-beta-binding (IBB) domain along the NLS-binding groove of Kap60p, ensuring only NLS cargo-free Kap60p is exported. The structure also suggests how export cargo binding is coupled to high affinity RanGTP binding.

Y.Matsuura and M.Stewart : Structural basis for the recognition of a nuclear export cargo (Kap60p) by an exportin (Cse1p) and RanGTP

2P004

ヘモフィルス・インフルエンザ菌由来、鉄化合物結合タンパク質 HI1472 の X 線結晶構造解析

○岸田 寛行¹、西野 綾²、雲財 悟¹、David Roper³、Jeremy Tame¹、朴 三用¹ (¹ 横市院・総合理・生体超分子システム、² 理研・GSC・タンパク質構造・機能研究グループ、³ University of Warwick・Department of Biological Science)

グラム陰性菌である、ヘモフィルス・インフルエンザ菌はヒトに寄生している病原性細菌の 1 つであり、特に b 型は小児の化膿性髄膜炎や肺炎などの病気を引き起こすものとして知られている。これら病原性を持つ多くの細菌は生育のために鉄原子が必要不可欠であり、ヘムや鉄キレート化合物を用いて鉄源を取り込む機構が知られている。ヘモフィルス・インフルエンザ菌 Rd 株の HI1472 は ABC トランスポーターを構成するタンパク質の一つであり、ペリプラズム層に存在する。部分的なアミノ酸相同性検索の結果から HI1472 はヘムを含む鉄化合物結合モチーフを持つことが示唆されている。また数種類の鉄化合物を輸送するとされる大腸菌由来 FhuD にもこれらのモチーフは存在することから、HI1472 も、鉄化合物の網羅的な輸送を行っているとも推測される。我々はヘモフィルス・インフルエンザ菌 Rd 株由来の HI1472 のアポ構造を 1.70 Å の分解能で決定した。HI1472 は空間群 P3121、非対称単位に 1 分子で結晶化した。結晶中の溶媒含量は 80.2%、パッキング密度 (Vm) は 6.3 Å³/Da と高い値を示し、Matthews によって定義された範囲から外れていた。HI1472 の構造は一般的なペリプラズム層の物質輸送タンパク質に見られる α/β 構造をとっており、N 末端と C 末端に一つずつある α/β サンドイッチドメインが α ヘリックスで繋がれた概観であった。HI1472 の基質結合部位は正電化を帯びており、基質ポケットには硫酸イオンの配位が確認された。また大腸菌由来 FhuD との構造比較から全体構造の類似性は確認されたが、基質結合部位のトポロジーは大幅に異なっていた。

H. Kishida, A. Nishino, S. Unzai, D. I. Roper, J. R. H. Tame and S.-Y. Park : Crystal Structure of HI1472, Iron compound binding protein from *Haemophilus Influenzae*.