2P013

H. pylori から分泌される新規分泌 TNF- α 誘導タンパク質 (Tip) の X 線結晶構造解析

○鶴村 俊治¹、菅沼 雅美²、勝沼 信彦¹、津下 英明¹ (¹ 徳島文理大学・健康科学研究所、² 埼玉県立がんセンター)

Tip は、*H. pylori* から TNF- α 誘導因子として発見された新規分泌タンパク質である。*H. pylori* から二量体の形で分泌され、胃上皮細胞に作用し、TNF- α を誘導することにより、胃での発がんを促進するものと考えられる。我々のグループは、TNF- α の誘導には、SS 結合を介した二量体形成が重要ではないかと考え、N 末側にある 2 つの cysteine を含む 6 アミノ酸を欠損させた deletion mutant Tip、del-Tip を作成し、Tip と同様に反応試験を行った結果、del-Tip による TNF- α 誘導は見られなかった [1]。そのため、Tip と del-Tip との相違点を立体構造の観点から明らかにする目的で、それぞれ X 線結晶構造解析を行ってきた。Tip、del-Tip とともに結晶化を行ったが、Tip に関しては現在結晶を得られていない。del-Tip は、t-BuOH を含む結晶化溶液、および、PEG6,000 を含む結晶化溶液において結晶を得ることができた。その空間群は *P*3221 で $a = b = 71.5 \text{ \AA}$ 、 $c = 70.3 \text{ \AA}$ であった。構造解析は、当研究所にある R-AXIS VII により得られた native データと Pt 原子データを用いた MIR 法によって行い $3.2 \text{ \AA}$ の分解能で良い位相が得られた。その位相を用いてトレーシングを行い、ポリアラニンモデルを組み立てた。しかしながら、側鎖をはっきりと認識するには至っていない。ポリアラニンモデルから DALI サーバにより相同なタンパク質を検索したところ、類似の構造はなく、新規構造であると考えられる。del-Tip は、N 末側から β -sheet、 $50 \text{ \AA}$ 程度の長い特徴的な α -helix、以後 α 、 β 、 β 、 α 、 α の順で並び、結晶学的対称な二量体を形成している。この二量体の構造は基本的に活性型である Tip でも同じであると考えている。現在、分子モデル構築と更なる位相の改良を進めている。[1] 2004 年ヘリコバクター学会年会 *H. pylori* の新規分泌タンパク質 Tip による発がん機構とがん予防、菅沼等、埼玉県立がんセンター

T. Tsurumura, M. Suganuma, N. Katunuma, H. Tsuge : X-ray crystal structure analysis of Tip, novel protein secreted by *H. pylori*

2P015

水溶液環境下でのディスタンスジオメトリ法によるタンパク質の構造決定

○山根 努、池口 満徳、木寺 詔紀、岡村 英保、西村 善文 (横浜大)

〔緒言〕NMR によるタンパク質の立体構造解析では、NOE 情報に基づく距離拘束によるディスタンスジオメトリ法により構造構築を行う。その場合、NOE 情報の乏しい、溶媒領域に露出した部分や運動性の高い領域では、正確な構造決定が困難である。一方、近年計算機の性能向上に伴い水分子やイオンを含んだ現実に近い系でのシミュレーションが容易となってきた。そこで、シミュレーションで用いている現実の状況を正しく反映した水溶液中の環境で、ディスタンスジオメトリの計算を行うことで、構造情報の少ない領域の情報を補償し、それによってより精密な構造決定を行うことができると期待される。また、このような計算から得られる情報を NMR による実験にフィードバックすることにより、実験情報の精密化を行うこともできると考えている。以上の背景を踏まえ本研究では現実の状況を正しく反映した水溶液中の環境での NOE 情報に基づく拘束条件下でのシミュレーションを行った。〔方法〕NMR によるタンパク質の構造決定を行うプログラム CNS (Brünger et al.) において用いられている拘束関数を、われわれのグループで開発した生体高分子の分子動力学計算プログラム MARBLE (Ikeguchi et al.) に移植した。力場には CHARMM22 を用いた。そして、水及びイオン存在下での静電相互作用が支配的な DNA-タンパク質複合体の精密構造決定を試みた。そして、水溶液環境下での NOE 情報に基づく拘束条件下での構造の特徴及び、ダイナミクスに関して検討を行った。詳細は当日の発表で報告する。

T. Yamane, M. Ikeguchi, A. Kidera, H. Okamura, Y. Nishimura : Structural analysis of protein by using distance geometry method in aqueous solution

2P014

好熱菌由来クエン酸合成酵素の熱安定化構造

○村上 緑¹、井原 邦夫²、神山 勉¹ (¹ 名大院・理・物理、² 名大・遺伝子実験施設)

好熱菌由来蛋白質の X 線結晶構造解析により、多くの構造上の熱安定化因子が明らかにされたが、好熱菌由来蛋白質が全て同じ熱安定化機構を備えて耐熱化されるのではない。それぞれの蛋白質が機能や生育環境に応じて熱安定化因子を選択しているように見える。本研究では、好酸性好熱菌 *Sulfolobus tokodaii* strain 7 (生育温度 75°C) がクエン酸合成酵素 (CS) として 2 つのアイソザイム (StCS1805、StCS0587) を有していることに着目した。CS はアセチル補酵素 A とオキサロ酢酸を縮合し、補酵素 A とクエン酸を生成する反応を触媒する酵素で、古細菌とバクテリアのほとんどがホモダイマー型の CS をもつ。2 つのアイソザイムは一次配列上 45% の相同性しか持たないが、StCS1805 は同じ属の *S. solfataricus* 由来 CS (生育温度 85°C) と 68%、StCS0587 は超好熱菌 *Pyrococcus furiosus* 由来 CS (生育温度 100°C) と 51% の相同性を示す。我々はこれらのアイソザイムについて X 線結晶構造解析を行い、それぞれ $2.0 \text{ \AA}$ 、 $2.7 \text{ \AA}$ で構造を決定した。それぞれに見られる特徴的な構造を見出し、他の CS との構造比較により構造安定化への寄与を調べた。

アイソザイムの構造を比較すると、塩橋の分布に大きな違いが見られた。すなわち、StCS1805 では N、C 両端が分子に巻きつく表面近傍にはほぼ局在するのに対し、StCS0587 ではさらに反対側面のサブユニット接合面にも多くの塩橋を結んでいた。一方、分子内の空隙の数、容量ともに StCS1805 より StCS0587 の方が多く存在した。StCS1805 では、空隙内に多くの水分子が導入され、そのうちいくつかが周囲の残基と堅固に水素結合しているのが観察された。これらの構造に基づいた熱安定化機構について議論する。

M. Murakami, K. Ihara and T. Kouyama : Crystal structures of two isozymes of citrate synthase from *Sulfolobus tokodaii*

2P016

カイコ由来カビプロテアーゼインヒビターの NMR による構造解析

○金折 賢二、中石 真名美、谷口 麻衣、亀井 加恵子 (京工繊大・繊維・応用生物)

カイコ (*Bombyx mori*) 由来カビプロテアーゼインヒビター-F (FPI-F) は、免疫機能を持たないカイコの体液中でカビプロテアーゼを阻害するインヒビターである。FPI-F は 55 残基のアミノ酸からなり、分子内に 4 個のジスルフィド結合をもっていて、高温や低い pH でも安定であることが報告されている。FPI-F の反応部位とジスルフィド結合の位置関係は、今までに報告されているタンパク質性のプロテアーゼインヒビターとは異なっていることから、FPI-F は特異な構造を形成している可能性がある。本研究では、FPI-F の高次構造を明らかにするために精製した FPI-F の構造を二次元 NMR 法により解析した。FPI-F の COSY スペクトルでは Pro 残基と N 末端を除く主鎖 NH α 由来のクロスピークが観測され、NOESY スペクトルを用いて連鎖帰属法により配列特異的に帰属した。FPI-F は 3~10 と 35~39 番目の残基間に α H- α H および NH- α H 間の NOE が観測されたことから、FPI-F は短い β シートが連続したターンでつながっている構造をとっていることが明らかになった。他のセリンプロテアーゼインヒビターとの比較についても報告する。

K. Kanaori, M. Nakaishi, M. Taniguchi, K. Kamei : Structure analysis of fungal protease inhibitor from silkworm by NMR