3P113

バクテリオフェリチンの2次元結晶の作製と観察

野口 幹、高崎 優香、○武田 茂樹（群大院・ナノ材料）

フェリチンは各種の生物体内で鉄を貯蔵する蛋白質で、24個のサブユニットからなる直径約10 nmの籠状蛋白質である。内腔に酸化鉄を貯蔵しているが、その大きさが数nm程度であるためこの鉄を量子ドットとして利用できる可能性が指摘されている。大腸菌のもつフェリチン（バクテリオフェリチン）はb型ヘムを12個含む点では乳類のフェリチンと大きく異なっている。これまで我々はフェリチンの内包する鉄を量子ドットとして工業的に用いることを視野におき、蛋白質間の相互作用を調節してナノサイズの粒子である蛋白質を自在に配列化することを可能にする第一歩として、フェリチンの2次元結晶の作製とその結晶系の改変を行ってきた。組み換え体バクテリオフェリチンは、T7プロモーターを含む発現ベクターにより形質転換した大腸菌を培養して得た。集菌、超音波破碎後の上清をDEAE-Toyopearlカラム、Sephacryl S-300ゲルろ過カラムによって精製した。フェリチンで2次元結晶の作製を試み、透過型電子顕微鏡で観察したところ2次元結晶が作製されたことが確認できた。2次元結晶中の数十個のバクテリオフェリチンは正方格子に配列化されており、以前にウマアポフェリチンで作成された六方格子とは異なっていた。展開液に加える2価イオンとして、ニッケル、マンガン、カドミウム等を検討したが、カドミウムの添加が2次元結晶の作製に効果的であった。また蛋白質定量と鉄の定量から得た値の比から、精製した組み換え体バクテリオフェリチン1個当たりの鉄の含有量は約290個であることが分かった。これは約3500個程度の鉄を内包する天然ウマ肝臓フェリチンの1/12の値となった。

M.Noguchi, U.Takasaki and S.Takeda : Two dimensional crystallization of bacterioferritin

3P115

二次構造帰属法 ProSSA と蛋白質 CD スペクトルとの相関

○小副川 博也、阿南 敬三、金光 和保、大内 将吉（九工大・情報工・生命情報）

蛋白質の円偏光二色性(CD)スペクトルは、蛋白質の二次構造を解析する手法として多くの研究者が利用している。CDスペクトルから二次構造含量を推定するための多くのプログラムが開発されているが、蛋白質の二次構造含量が同じでありながらCDスペクトルが異なったり、あるいはCDスペクトルが同じでありながら二次構造含量が異なるという問題が生じている。この原因の一つとして、発表者らは蛋白質の二次構造帰属法に問題があるのではないかと考えた。そこで、発表者らが新たに提案した主鎖二面体角による二次構造帰属法(ProSSA)を用いて、二次構造含量とCDスペクトルとの相関性を調べた。既知の26種類の蛋白質CDスペクトルデータに対してPDBファイルよりProSSA法を使って二次構造を帰属し、それらの二次構造含量を算出した。平均的な二次構造含量をもつ対照蛋白質として1fecを採用し、残りの25個の蛋白質のCDスペクトルの強度と二次構造含量との関係を、「蛋白質の分子モル楕円率 $P(\lambda)$ は、二次構造の分子モル楕円率 $H(\lambda)$, $B(\lambda)$, $R(\lambda)$ に二次構造成分比 f_H , f_B , f_R を掛けただものの総和で表される」ことを前提として調べた。結果として、190 nm近傍の正の極大値に1)ヘリックス含量が多いときは高くなり、2)ストランド含量が多いときは低くなり、3)ランダム含量が多く、ストランド含量も多いときは低くなり、ストランド含量が少ないと高くなるという関係が認められた。この相関が見られたのは、25個のうち20個であった。二次構造帰属法としてDSSPを選択した場合に対して向上した。さらに、相関が見られた蛋白質のCDスペクトルから、二次構造含量が100%であるとき、すなわち、ヘリックス、ストランドの各モデル蛋白質のCDスペクトルを算出した。今後、このスペクトルデータから、構造未知の蛋白質のCDスペクトルの二次構造含量を求める予定である。

H. Osoegawa, K. Konko, S. Ohuchi : The correlation of the novel protein secondary structure assignment and CD spectrum of protein

3P114

人工 λ Croの溶液構造

○磯貝 泰弘¹、伊藤 隆¹、池谷 鉄兵²、太田 元規³（¹理研・生体金属科学、²産総研・生命情報科学研究センター、³東工大・学術国際情報センター）

λ ファージ由来Croタンパク質は、全長67残基のサブユニットからなるホモダイマーを形成し、2次構造として α ヘリックスと β シートをもつ古典的な転写因子の一つである。多くの変異体解析の結果によれば、 λ Croの立体構造はアミノ酸配列の変異に敏感で、 λ リプレッサーやミオグロビンとは異なり大部分の点変異により安定性と活性が損なわれる。したがって、 λ Croフォールドは、タンパク質設計において挑戦的な課題の一つであり、設計法の厳密な評価基準となる。我々は、分子設計用に開発した経験的ポテンシャル関数(Ota et al., Protein Eng. 14, 557-564, 2001)を用いて、 λ Croの立体構造に折り畳まれるアミノ酸配列のデノボ設計と合成を行った(磯貝ら、第40回本学会年会、2002年11月、名古屋)。本研究では、設計されたダイマータンパク質のモノマー変異体を作製し、多次元NMR解析により、その溶液構造(左図:10個の最小エネルギー構造、 $C\alpha$ トレースと疎水性残基の側鎖のみ表示)を決定した。得られた平均構造(右図黒)は、天然 λ Croモノマー変異体のX線構造(右図白)と比較して、主鎖のRMSDが2.1 Åの精度で一致した。

Y.Isogai, Y.Ito, T.Ikeya and M.Ota : Solution structure of designed lambda-Cro

3P116

二次構造帰属法 ProSSA とプロテアーゼ切断配列との相関

○黄 磊、小副川 博也、金光 和保、大内 将吉（九工大・情報工・生命情報）

蛋白質は、不活性型の前駆体からプロテアーゼなどによって特定の配列が切断され活性型へ変換され蛋白質固有の機能を発揮する。これまで、プロテアーゼが切断する配列について、蛋白質の立体構造上、蛋白質表面の位置に存在するのか、または、一次配列上、どのようなアミノ酸残基ペアを切断するのかについて、多くの研究が行われてきた。これに対して二次構造の相関性を明確にすることを本研究の目的とした。最近、発表者らは蛋白質の90%を二次構造として帰属することができる主鎖二面体角を使った二次構造帰属法(ProSSA)を提案した。そこで、このProSSA法を用いて、プロテアーゼによって切断される配列と二次構造との関係について調べた。まず、蛋白質の前駆体の配列と切断部位についての情報をSwiss-Plotより抽出し、それに対応する蛋白質の立体構造データをPDBから取得し、ProSSA法を用いて二次構造を帰属した。その帰属結果と切断配列との相関を調べたところ、切断配列は、塩基性アミノ酸残基と β 分岐側鎖をもつアミノ酸残基のペアであり、このペアがストランド構造のN末端境界領域に存在することがわかった。また、切断配列と同じ配列が、蛋白質内に存在する場合、その配列は、ストランド構造のC末端境界領域に存在することがわかった。以上のことより、プロテアーゼは、ストランド構造のN末端境界領域にある配列を認識していることが示唆された。

R. Hong, H. Osoegawa, K. Konko, S. Ohuchi : The correlation of the novel protein secondary structure assignment and the cleavage site of protein sequence with protease