1P017

藍色細菌時計タンパク質 KaiB の機能部位変異体の構造解析

○岩瀬 亮¹、今田 勝巳²、林 史夫³、宇津巻 竜也⁴、難波 啓一²、石浦 正寛¹ (¹ 名大・遺伝子・ゲノム、² 阪大院・生命機能、³ 群大・院工・ナノ材料、⁴ 名大・院理・物理)

生物の多くの生理活性は 24 時間周期で変動している。このリズムを発振させる生体（細胞）の分子機構を生物時計と呼ぶ。藍色細菌は生物時計の存在が確認されている唯一の原核生物であり、そのリズム発振分子装置は時計タンパク質 KaiA、KaiB、KaiC で構成されている。KaiB は 4 量体であるが、その生化学的性質や機能についてはまだほとんど分かっていない。これまでに我々は、X 線結晶構造解析により好熱性藍色細菌 *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 由来の KaiB の原子構造を決定し、KaiB は非対称なサブユニットからなる 6 角板状型の 4 量体であり、分子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）、分子側面の正電荷に富んだくぼみ状構造（positive hollow）を有することを明らかにしている。アミノ酸置換変異体や欠失変異体の機能解析により、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ている。本研究では、KaiB 変異体の X 線結晶構造解析の結果について報告、考察したい。これまでにリズムへの影響が確認されたアミノ酸置換変異体タンパク質は、熱安定性、複合体形成において野生型とほぼ同じ挙動を示したこと、これらのアミノ酸変異が構造に影響を与えたわけではなく、これらが機能に重要な残基である可能性が高い。また現在、不完全なリズム表現型を示した C 末端欠失変異体について結晶構造解析を試みており、塊状の結晶を成長させることに成功している。得られた構造の野生型との比較から、現時点で想定している他分子との結合面の構造的特徴を考察する予定である。

R.Iwase, K.Imada, F.Hayashi, T.Uzumaki, K.Namba and M.Ishiura : Structural analysis of mutants of cyanobacterial circadian clock protein KaiB

1P019

Aeromonas sobria 由来セリンプロテアーゼの X 線結晶構造解析

○宇都宮 敬子¹、勝沼 信彦¹、小林 秀丈²、山中 浩泰³、藤木 博太³、岡本 敬の介²、津下 英明¹ (¹ 徳島文理大学・健康科学研究所、² 岡山大学・薬学部、³ 徳島文理大学・薬学部・微生物学講座)

Aeromonas sobria は下痢症の原因菌として広く知られている。本菌は腸内で痛みを伴う下痢を誘発するが、その感染症による死亡率は低い。また、腸管外感染症の原因ともなり、特に皮膚や筋肉等の軟組織感染が多く報告されている。本菌のセリンプロテアーゼは皮膚の浮腫をおこし、軟組織の損傷に関与すると考えられている。本菌が分泌する毒素のうち、我々はこのセリンプロテアーゼに着目し、その機能と構造を解析した。*A. sobria* のプロテアーゼは 624 アミノ酸からなる約 6.6kDa のタンパク質である。我々はセリンプロテアーゼに分類される、このプロテアーゼを *A. sobria* Serin Protease (ASP) と呼ぶことにした。ASP は Kex2/furin タイプのプロテアーゼメンバーの 1 つであり、これら convertase protein と他の subtilase family は基質分解のための高い選択性があるかどうかで区別されている。ASP は subtilisin に似た形の Kex2、furin と共通の触媒ドメインと P ドメインから成っている。我々はシッディングドロップ蒸気拡散法を用いて 10mg/ml の ASP プロテアーゼ、5% PEG3000、pH = 9.5 の 500mM CHES buffer の条件下で、針状の ASP の結晶を得ることができた。この結晶構造は 2.0 Å 分解能で多重同形置換法によって決められた。結晶の空間群は *P*₂₁、a = 50.7 Å、b = 112.2 Å、c = 53.9 Å、β = 113.0° である。X 線の回折データとして 1.9 Å 分解能の native データと 2 つの水銀データを収集した。SOLVE を使用して位相計算した結果、ASP の 2 つのドメインが電子密度で明確に見えた。モデルの構築と構造精密化は生化学的な研究とあわせて進行中である。

H. Utsunomiya, N. Katunuma, H. Kobayashi, H. Yamanaka, H. Fujiki, K. Okamoto, H. Tsuge : Crystal structure of the serine protease from *Aeromonas sobria*

1P018

タンパク質単独で機能する分子時計 EA4 の結晶構造

○開 俊樹¹、柴山 修哉²、Jeremy R.H.Tame¹、朴 三用¹ (¹ 横市院・国総科・生体超分子科学、² 自治医大・生理学・生物物理)

多くの生物は、生物時計を使って生命活動の時間制御を行っている。近年、概日リズムの研究は飛躍的に進展し、その発振機構が分子レベルで明らかになりつつある。しかし、発生・分化のようにある時間間隔をおいて順序正しく進行する生命現象を制御するタイマー型生物時計の時間制御機構については、現在あまり多くのことは分かっていない。EA4 (esterase A4) は、カイコの休眠卵で発見されたタイマー型生物時計の一つと目されるタンパク質である。EA4 の時間読みは、EA4 に結合している 38 残基のペプチド (PIN) が冬期の低温刺激により解離することでスタートする。時間読み開始から約 2 週間後に、それまで低レベルに抑えられていたコレステロールエステラーゼ活性（または ATPase 活性）の一過的な急上昇が起こる。この活性は休眠卵を休眠覚醒（胚子発育再開）段階に移行させる重要なシグナルとして働く。いくつかの試験管内の実験から、EA4 は単独で時間読みと酵素活性制御の両方を行っていることが示されており、時間読み前後の EA4 の立体構造を明らかにすることが時間読み分子機構解明の鍵になると考えられている。今回、我々は時間読み終了後の EA4 (終状態) の X 線結晶構造解析に成功したので、その詳細を報告する。EA4 の終状態は、8 つの β-シートからなるカゴ状の構造で、Cys61 と Cys151 の側鎖 SH 基間で分子内 S-S 結合を形成している。結晶構造中では非対称単位にタンパク質 2 分子が存在し、溶液中での 2 量体という結果と矛盾しない。EA4 は Cu-Zn SOD と高い相同性を示しており、結晶構造上でも銅・亜鉛イオンが確認された。銅・亜鉛イオンの配位座近傍の構造は、従来の SOD の活性中心と同様であった。また、EA4 の分子表面には PIN の結合部位と推測される長い疎水性領域が存在する。

T.Hiraki, N.Shibayama, J.R.Tame, S.-Y.Park : Crystal structure of esterase A4 that acts alone as a molecular clock

1P020

フェリチン変異体の結晶構造解析

○長島 重広¹、岩堀 健治²、今田 勝巳^{1,3}、難波 啓一^{1,3}、山下一郎^{4,5} (¹ JST・ICORP・超分子ナノマシン、² JST・CREST、³ 阪大院・生命機能、⁴ 松下・先端研、⁵ 奈良先端大・物質創成)

鉄貯蔵タンパク質であるフェリチンは 24 量体で球殻構造を形成し、その内部に大量の金属を貯蔵することができる。二次元結晶を作製することも可能で、ナノスケールのデバイスを構築するための媒体として工業的に期待されている。N 末端の一部欠損させた変異体では、野生型のフェリチンと比較してその温度耐性が低下することが報告されており、この N 末欠損効果の原因とともに、鉄イオン取り込みのメカニズムを解明するため、フェリチンの 2 つの変異体の構造解析を行った。horse spleen L-ferritin の N 末端 8 残基を欠損させた変異体 (fer-8) と、球殻構造の 3 回対象部位に存在するチャンネルに露出している Asp127、Glu130 を Ala に置換し、さらに球殻内部に露出している Glu57、Glu60、Glu63 を Lys に置換した変異体 (8-AK) の両方から、硫酸を沈殿剤とし、CdSO₄ を加えた条件で結晶を得ることができた。大型放射光施設 SPring-8 のビームライン BL26B1 でデータ収集を行い、構造解析を行ったが、これらの結晶はいずれも単結晶ではなく、空間群 *P*₄ の merohedral twin (Twin fraction=0.49) であったため、解析は容易ではなかった。PDB Code:1IES を初期モデルとして CNS-Solve で分子置換を行い、twin となっている結晶の片方について解を求め、shelx で detwin と構造精密化を行った。これまでに fer-8 については水分子 500 個が見つかり、分解能 2.2 Å で Rfactor=18%、Rfree=28%という結果が得られ、8-AK については 360 個の水分子、2.8 Å 分解能、Rfactor=21%、Rfree=28%という結果が得られた。現在更なる精密化を行っている。

S.Nagashima, K.Iwahori, K.Imada, K.Namba and I.Yamashita : X-ray crystallographic analysis of ferritin mutants.