1P021

ユビキチン様モディファイアー Ufm1 の立体構造解析

○笹川 拓明¹、坂田 絵理²、山口 芳樹²、小松 雅明³、田中 啓二³、加藤 晃一^{1,2} (¹分子研・先導分子科学、²名古屋市・院薬、³都臨床研)

Ubiquitin-fold modifier 1 (Ufm1) は、アミノ酸 83 残基からなるタンパク質であり、ユビキチンとアミノ酸配列上約 20 % の相同性を有する。Ufm1 はユビキチンと同様に活性化酵素 (E1)、結合酵素 (E2) による反応を経て、標的タンパク質に結合し、その機能を調節する修飾分子として作用していると考えられている (1)。本研究では、Ufm1 の立体構造と機能の相関を明らかにするために、NMR を用いて Ufm1 の水溶液中における立体構造を決定するとともに緩和解析によるダイナミクスの評価を行った。

NMR 解析の結果、Ufm1 は 4 つの β ストランドと 2 つの α ヘリックスからなるユビキチンフォールドを形成していることが明らかとなった。しかしながら Ufm1 の分子表面の性状は、ユビキチンおよびユビキチン様タンパク質として知られる NEDD8 や parkin-Ubl とは異なり、分子表面に負電荷に富む領域が存在しないことが明らかとなった。また、緩和データに基づいて model-free 解析を行ったところ、 β 1 ストランド、 α 1 ヘリックス- β 3 ストランド間のループおよび C 末の β 4 ストランドにミリ秒オーダーの化学交換が見出された。これらの領域は NEDD8 上の E1 (APPBP1/Uba3) 結合部位とほぼ対応していることから、Ufm1 の E1 (Uba5) との相互作用部位の構造は揺らぎを示すものと予想される。

(参考文献)

1. Komatsu, M., Chiba, T., Tatsumi, K., Iemura, S., Tanida, I., Okazaki, N., Ueno, T., Kominami, E., Natsume, T., Tanaka, K. 2004. EMBO J. 23: 1977-1986.

H. Sasakawa, E. Sakata, Y. Yamaguchi, M. Komatsu, K. Tanaka and K. Kato : Solution structure and dynamics of Ufm1, a ubiquitin-fold modifier

1P023

Candida albicans 由来 UDP-*N*-アセチルグルコサミンピロホスホリラーゼにおける構造変化

○圓山 大介¹、西谷 優一¹、野中 剛¹、喜田 昭子¹、深海 隆明²、曾我部 智²、三尾 俊之²、岡部 尚文²、岡部 とし子³、三木 邦夫^{1,4} (¹京大・院理・化学、²中外製薬・鎌倉研、³横浜市大・医、⁴理研・播磨)

UDP-*N*-アセチルグルコサミンピロホスホリラーゼ (UAP) はアミノ糖の代謝に関わる酵素であり、*N*-アセチルグルコサミン-1-リン酸 (GlcNAc-1-P) と UTP から UDP-*N*-アセチルグルコサミン (UDP-GlcNAc) の合成を触媒する。UAP はグルコサミン-1-リン酸のアミノ基のアセチル化も行う多機能酵素である原核生物由来のものと、単機能酵素である真核生物のものの 2 種類が存在する。また、真核生物では哺乳類などの一部の種においてアイソフォームが存在することが知られている。これまでに原核生物である大腸菌と肺炎連鎖球菌、そして真核生物であるヒトとマウス由来の UAP の X 線結晶構造が決定されている。我々が構造解析を行った *Candida albicans* 由来の UAP は、これまでに構造が明らかになっている真核生物由来のものとは異なり、アイソフォームの存在は確認されていない。基質 (GlcNAc-1-P または GlcNAc-1-P + UTP) との共結晶、および生成物 (UDP-GlcNAc) との共結晶についての構造解析を行い、反応過程における構造変化を明らかにした。これまでの解析から、活性部位のポケットは反応の過程にそって大きな変化を起こすことが明らかになった。また、活性部位には沈澱剤由来の硫酸イオンが存在しており、UTP あるいは中間体のリン酸基が結合する部位に相当すると考えられる。GlcNAc-1-P + UTP との共結晶では反応が終了し、UDP-GlcNAc が結合分子となっていた。この構造では K421 の側鎖のアミノ基がピロリン酸結合に結合していた。この結合については、既知の原核生物由来の UAP の構造で見られる金属イオンの結合とよく似ており、この残基が活性に重要ではないかと考えられる。

D. Maruyama, Y. Nishitani, T. Nonaka, A. Kita, T. A. Fikami, S. Sogabe, T. Mio, H. Yamada-Okabe, T. Yamada-Okabe, and K. Miki : Structural change in UDP-*N*-acetylglucosamine pyrophosphorylase from *Candida albicans*

1P022

フェレドキシン依存性ビリル還元酵素 PcyA の構造解析

○杉島 正一¹、萩原 義徳²、高橋 康弘²、福山 恵一² (¹久留米大・医・医化学、²阪大院・理・生物科学)

紅藻やシアノバクテリアは光合成色素 (フィコビルン) や光センサー (フィトクロモビルン、フィコシアノビルン) としてビリル化合物を用いている。これらはヘムの酸化的開裂によって生じるビリベルジン IX α (BV) から、フェレドキシン依存性ビリル還元酵素 (FDBR) とよばれる一連の酵素ファミリーによって合成される。PcyA はこのファミリーに属する酵素で、BV からフィコシアノビルンを合成する。BV は A から D の 4 つのピロール環を持つが、PcyA はまず D 環側鎖のビニル基を還元し、つぎに A 環を還元する。D 環と A 環は側鎖のメチル基とビニル基の位置が異なるだけであるが、PcyA はこの違いを厳密に認識して順番に還元を行なう。また、この反応は金属や補酵素を必要としない新規なラジカル反応であり、その反応機構や基質認識機構は非常に興味深い。FDBR の立体構造はまだ明らかになっておらず、PcyA の反応機構に関する構造基盤を得るために、我々はシアノバクテリアの一種である *Synechocystis* sp. PCC 6803 由来の PcyA と BV の複合体の立体構造を 1.5 Å 分解能で決定した。PcyA は $\alpha/\beta/\alpha$ の三層サンドイッチ構造をとり、BV は中央の β シート構造と C 末端側の α ヘリックスの間に結合していた。PcyA の分子表面は基質結合部位付近のみが正に帯電しており、フェレドキシンは基質周辺に結合し BV に直接電子を受け渡すことが示唆された。BV は主に疎水の相互作用によって基質結合ポケットに結合しているが、水素結合可能な官能基は全て PcyA と水素結合または塩橋を形成しており、PcyA と BV は非常にタイトに結合していた。A 環側鎖のメチル基と接触する形で PcyA において保存されている His, Val, Tyr, Phe が位置し、これらの残基によって PcyA は BV の表裏を認識していた。保存された Glu, Asp, Gln が PcyA の反応において重要な役割をもつことが示唆された。

M. Sugishima, Y. Hagiwara, Y. Takahashi and K. Fukuyama : Structural analysis of ferredoxin dependent bilin reductase, PcyA

1P024

小麦胚芽無細胞蛋白質合成系を活用した高ラベル化率蛋白質の調製と NMR への応用

○飯原 亜希子¹、奈良 行訓¹、北野 実智子²、松原 景子¹、河野 俊之² (¹ゾイジーン (株)、²三菱化学生命科学研究所)

NMR を用いた蛋白質の立体構造解析や相互作用解析技術は、他の立体構造解析関連技術と異なって水溶液中の蛋白質試料で測定が可能のため、三次元構造をベースとする創薬分野などにおいてその有用性が注目されている。特に HSQC スペクトルによる蛋白質と相互作用分子の複合体解析は、短時間に多種の測定ができることから薬物スクリーニングなどに幅広く応用されてきた。この技術における課題は、いかにして性状の良い安定同位体ラベル化蛋白質を安価に大量調製するかという事と、複雑な HSQC スペクトルの帰属解析をいかにスムーズに行うかという事である。我々は自社製の小麦胚芽抽出液を用いた無細胞蛋白質合成系を活用してこれらの問題を解決してきた。小麦胚芽無細胞蛋白質合成系を用いたアミノ酸選択的ラベルは、アミノ酸選択性が高く、蛋白質の高純度精製を必要としない点で、大腸菌発現系などの細胞発現系及び大腸菌無細胞蛋白質合成系に比べて優位性がある。我々は、無細胞合成系のメリットを活かした迅速な可溶性機能ドメインの決定方法により得られたトランケート体 JSP1 を対象とし、独自の蛋白質合成方法における様々なラベル化アミノ酸濃度などを検討して、蛋白質合成量と MS スペクトル測定によるラベル化率を評価した。その結果、従来より少量のアミノ酸でラベル化蛋白質を得られる系を確立した。また、この系はラベル化効率も高く、小麦胚芽無細胞系を用いた方法が NMR 解析などを目的としたラベル化蛋白質調製に非常に有効な手段である事が分かった。更に、小麦胚芽無細胞蛋白質合成系で調製した選択的ラベル化蛋白質の NMR スペクトルを組み合わせて解析する方法により、低濃度の蛋白質を用い、1~2ヶ月という短期間で蛋白質調製から難易度の高い HSQC 帰属解析を完了した。本件では、このスペクトル帰属解析を基質相互作用解析へ応用した結果についても報告する。

A. Iihara, Y. Nara, M. Kitano, K. Matsubara and T. Kohno : A highly efficient isotopic labeled protein by using wheat germ cell-free protein synthesis system and an application to NMR technologies