2P013

hMTH1-8-oxo-dGTP 複合体構造と活性部位

○中村 照也¹、藤間 祥子¹、池水 信二¹、白川 昌宏²、中別府 雄作³、山縣 ゆり子¹ (¹ 熊大院・薬、² 京大院・工、³ 九大・生医研)

8-オキソグアニン (8-oxoG) は、生体内の活性酸素により DNA, RNA, ヌクレオチドにおいて生じる酸化損傷であり、シトシンのみならずアデニンとも塩基対を形成するため、内在性の変異原となりうる。大腸菌 MutT 蛋白質は、8-oxo-dGTP, 8-oxo-GTP をそれぞれリン酸へと加水分解し、8-oxoG の DNA, RNA への取り込みを阻害して、A:T から C:G へのトランスポージョンや異常な蛋白質の生合成を抑制する。MutT homolog-1 (MTH1) は、MutT の真核生物のホモログとして同定され、8-oxo-dGTP だけでなく、2-OH-dATP, 8-oxo-dATP など様々な酸化プリンヌクレオシド三リン酸をリン酸へ加水分解するという、MutT とは異なった幅広い基質特異性を有している。また、ヒト MTH1 (hMTH1) は、癌や神経変性などの疾患との関与が示唆されており、hMTH1-基質 8-oxo-dGTP 複合体構造解析は MutT, hMTH1 に共通の加水分解モチーフ (Nudix モチーフ) での反応機構の解明のみならず、立体構造に基づく新規治療薬の設計においても期待される。我々は既に、hMTH1 と反応生成物 8-oxo-dGMP との複合体 (hMTH1-8-oxo-dGMP) 構造を明らかにしており、今回、基質 8-oxo-dGTP との複合体 (hMTH1-8-oxo-dGTP) の結晶化に成功した。現在までの解析の結果、hMTH1-8-oxo-dGMP で明らかになった幅広い基質特異性発現に関する知見を支持するとともに、MutT-8-oxo-dGTP で見られた結合様式とは異なった β , γ -リン酸の電子密度が確認できた。これは MutT が 8-oxo-dGDP も 8-oxo-dGTP と同様に加水分解できるのに対して、hMTH1 は MutT に比べて反応速度が遅いということや、特に 8-oxo-dGDP などヌクレオシド三リン酸の加水分解の効率が悪くという両酵素の差異を反映しているのかもしれない。

T.Nakamura, S.Toma, S.Ikemizu, M.Shirakawa, Y.Nakabeppu and Y.Yamagata : Crystal structure of hMTH1-8-oxo-dGTP complex and its active site

2P015

血管内皮細胞のアポトーシスを誘導するヘビ毒メタロプロテアーゼの X 線結晶構造解析

○五十嵐 智子¹、武田 壮一¹、荒木 聡彦²、大石 裕子¹、盛英三¹ (¹ 国循・研・心臓、² 名大院・理・生命)

Vascular Apoptosis-Inducing Protein (VAP) は血管内皮細胞に特異的に働きアポトーシスを誘導する因子としてガラガラヘビ毒より 2 種類のタンパク質が単離、精製された。2 つのうち、ホモダイマーの塩基性タンパク質で、一次構造より Metalloproteinase domain, Disintegrin-like domain および Cysteine-rich domain からなるマルチドメインタンパク質であることが分かっているものを VAP1 とし、VAP1 とは異なりモノマーの酸性タンパク質であるが、そのアミノ酸の部分配列から VAP1 と同様のドメインを保持している他のヘビ毒メタロプロテアーゼと高い相関性があることが分かっているものを VAP2 とした。近年これらのドメインを保持する ADAM ファミリーに属するタンパク質が各種膜結合型シグナル因子の切断遊離、筋組織の発生分化などに関与していることが報告されているが、その分子機構についてはほとんど明らかにされていない。そこで我々はこれら 2 種類の VAP の構造から、ADAM ファミリータンパク質の分子機構の解明を目指している。まず、ガラガラヘビ毒より VAP1 および VAP2 を精製し、結晶化を行った。VAP2 は結晶化条件の検討途中であるが、VAP1 に関しては 2 種類の結晶から 2.5 Å の回折データを得ることができた。現在、既知のヘビ毒メタロプロテアーゼを用いて分子置換法にて構造解析を行っている途中であるが、これまでに得られた知見について報告する。

T.Igarashi, S. Takeda, S.Araki, Y.Oishi and H Mori : Crystallization and preliminary X-ray analysis of VAP

2P014

Thermus thermophilus HB8 由来タンパク質 TTHA0420 の X 線結晶構造解析

○今川 貴仁¹、杉本 康志¹、宇都宮 敬子¹、横山 茂之^{2,4}、海老原 章郎²、倉光 成紀^{2,3}、津下 英明^{1,2} (¹ 徳島文理大学健康科学研究所、² 播磨理研、³ 大阪大学、⁴ 東京大学)

Thermus thermophilus HB8 由来 TTHA0420 は分子量 18kDa のタンパク質で Pfam データベースよりフラビン還元酵素であると予想された。フラビン還元酵素は広く生物界の反応に関わっており、バクテリアの発光、鉄の還元、芳香族化合物の酸化、キレート剤の分解、化石燃料の脱硫黄化や抗生剤の分解等に関わっている。最近、TTHA0420 と構造の類似性が高い鉄還元酵素 (FeR) とフェノール還元酵素 (PheA2) が X 線構造解析された。後者に属するフラビン還元酵素は 2 つの酵素からなり、PheA2 は NAD(P)H を供与体としてフラビンを還元し、次に酸化 FAD が結合して遊離の還元型 FAD を生むと考えられている。TTHA0420 のアポ及び FAD 結合型ホロの構造を X 線構造解析により 2.0 Å と 1.9 Å 分解能により構造決定を行い、次の事が明らかになった。(1) TTHA0420 は PheA2 類似のホモダイマー構造をとる。(2) PheA2 では NADH のニコチンアミドが結合する部位に C 末端の Tyr157 が入り込んでいる。TT1382 と 2 つの酵素 (FeR, PheA2) の C 末を比較したところ、この C 末構造は他の 2 つとは大きく異なっていた。このことから、TTHA0420 では、PheA2 と類似のモードで NAD(P)H が結合できない事が示唆された。(3) FAD を過剰に加えたホロ構造では、モノマー辺り 2 分子の FAD が結合しており、フラビンリングは First FAD → Tyr157 → Phe41 (dimeric partner) → Second FAD (FMN) の順に並んでいる事が分かった。この疎水性残基の存在 (Tyr157 と Phe41) が、FAD 間での電子の受け渡しにかかわっている可能性が考えられる。

T.Imagawa, Y.Sugimoto, H.Utsunomiya, S.Yokoyama, A.Ebihara, S.Kuramitsu, H. Tsuge : Crystal structure of a flavoenzyme TTHA0420 from *Thermus thermophilus* HB8

2P016

エンドフィリン BAR ドメインの結晶構造：脂質二重膜を曲げる二つの機構

○武田 壮一^{1,3}、増田 道隆²、曾根 麻奈美²、上岡 裕治²、大木 高志²、盛 英三¹、望月 直樹² (¹ 国循・研・心臓生理、² 国循・研・循環形態、³ 理研・播磨)

細胞の様々な活動は膜組織構造のダイナミックな変化を伴い、それらは様々な因子によって巧みに制御させている。McMahon (MRC Cambridge) らは Amphiphysin の N 末端ドメインの結晶構造から単一のタンパク質分子自体が脂質二重膜の曲率を感知し、curved membrane を形成させる新しいメカニズムを提案した (Science 303, 495- (2004))。即ち、3 本の折り返しからなる α -ヘリカルな分子がダイマー形成により 6 本の Anti-parallel な coiled-coil バンドル構造 (BAR ドメイン: Bin/Amphiphysin/Rvs-homology domain) を形成し、それが分子全体として湾曲した三日月様の形状を呈し、その凹面を利用して膜のチューブ化やベジクル化に関与するという。今回我々は神経シナプスのエンドサイトーシスに関与する Endophilin-A1 の N 末端部に存在する BAR ドメインの結晶構造を解明した。Endophilin-A1 にはこれまで報告された Amphiphysin や Arfaptin の BAR ドメインの結晶構造と異なり、三日月形の凹部中央から左右に突き出たヘリックスループ構造 (Appendage) が存在した。さらにこの Endophilin に特異な Appendage に着目し、その膜結合とチューブ形成に関わる機能解析を行った。得られた結果は Endophilin が分子の凹面を利用して BAR ドメイン共通のメカニズムに加えて、Appendage 中央部の疎水性隆起を脂質二重膜に挿入し、脂質層の内外膜の表面積の不一致をもたらしす事で効率的に膜のチューブ化を行う事を示唆した

S.Takeda, M.Masuda, M.Sone, Y.Kamioka, T.Ohki, H.Mori and N.Mochizuki : Crystal structure of Endophilin BAR domain: two mechanisms to drive membrane curvature