2P021

Solution structures of six fibronectin type III domains of human Neogenin

○栞尾 尚哉¹、笹川 彩¹、小柴 生造¹、井上 真¹、木川 隆則^{1,2}、横山 茂之^{1,3,4} (¹ 理研 GSC、² 東工大院・総理工、³ 理研 播磨、⁴ 東大院・理)

Neogenin タンパク質は4つの Immunoglobulin ドメインと6つの fibronectin type III (fn3) ドメイン、さらに、複数のリン酸化部位をもつ C 末端の Neogenin C-terminus ドメインからなるタンパク質であり、軸索誘導に関与する Netrin-1 に結合することが知られている。近年、軸索誘導に関与する他のタンパク質 (repulsive guidance molecule, RGM) に対しても高い結合能を有していることが報告され、Neogenin は軸索誘導に関与すると考えられている。我々は、Neogenin の RGM 結合領域である6個の fn3 の溶液構造をそれぞれ NMR を用いて決定した。6個の fn3 間の配列相同性は 22-39% であり、溶液構造もよく似ているが、5番目の fn3 の beta2-beta3 ループだけが他とは異なる特徴的な構造をとっている。Neogenin と配列相同性をもつ結腸直腸癌抑制遺伝子タンパク質 (deleted colorectal cancer, DCC) は5番目の fn3 を介して Netrin-1 と結合することも考えあわせると、Neogenin ファミリータンパク質はそのターゲットタンパク質と5番目の fn3 の beta2-beta3 ループを介して結合することが示唆される。

N. Tochio, A. Sasagawa, S. Koshiba, M. Inoue, T. Kigawa, and S. Yokoyama : Solution structures of six fibronectin type III domains of human Neogenin

2P023

カイコ由来カビプロテアーゼインヒビターの溶液構造

金折 賢二、○中石 真名美、谷口 麻衣、亀井 加恵子 (京工織大・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残基からなり、分子内に4個のジスルフィド結合をもち、高温や低 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これまで報告されているタンパク性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 の構造は新規なフォールディングを持つ可能性がある。本研究では、FPI-F の高次構造を NMR 法とディスタンスジオメトリ法 (CYANA2.0) により明らかにした。カイコから精製した FPI-F を用いて各種二次元 NMR スペクトルを測定した。DQF-COSY では5残基の Pro と N 末端を除く主鎖 NH-H α 由来のクロスピークが観測され、NOESY を用いて連鎖帰属法により配列特異的に帰属した。その結果をもとに FPI-F の NOE 距離情報を収集した。FPI-F は6~9 と 35~38 番目の残基間に H α -H α 、NH-H α の long-range NOE が観測されたことより、FPI-F は短い β シート構造を形成していることが明らかとなった。すべての Pro に対して $d_{\alpha\beta}(i,i+1)$ の NOE が観測されたことから、FPI-F 中の Pro は全てトランス型であることが示された。また、 $^3J_{HN\alpha}$ のほとんど全てが 7 Hz 以上となり、FPI-F は α -ヘリックス構造を持たないことが示唆された。水素-重水素交換実験から、17、41~44、49~55 番目の残基の主鎖 NH の交換が遅かった。FPI の構造は、C 末端側で疎水コアを形成し、それらが、ジスルフィド結合と短い β シートにより、N 末端側の残基と相互作用し、配列上それらの中間に位置する反応部位 (T29-V30) を含むループを支えているような構造である。

K.Kanaori, M.Nakaishi, M.Taniguchi, K.Kamei : Solution structure of fungal protease inhibitor from silkworm

2P022

Drosophila melanogaster 由来タンパク質 roadblock の NMR による立体構造解析

○田口 誠¹、河野 隆英¹、鍋島 裕子¹、水口 峰之¹、高杉 紘史¹、森佳洋¹、篠田 裕之¹、河野 敬一² (¹ 富山医薬大・薬、² 北大院・理)

roadblock (robl) は、*Drosophila melanogaster* において、その遺伝子の変異が軸索輸送と有糸分裂に影響を与えるタンパク質として同定され、最近の研究では、ヒトでの相同体がダイニンを構成する、中間鎖の特定領域と結合することが報告されているタンパク質である。robl は、微小管輸送に関わるダイニンモータータンパク質の、軽鎖を構成しており、同様に軽鎖に分類されている Tctex1 がロドプシンや TrkA、LC8 が狂犬病ウィルスやモコラウィルスの P タンパク質をはじめとする、様々なウィルスタンパク質とそれぞれ結合し、その細胞内での輸送を媒介しているという報告がある。このことから robl は、微小管輸送においてダイニンがカーゴと結合する際に、その結合を調節するタンパク質と考えられているが、その詳細は不明である。本研究では、このような性質を有する robl の大量発現系を確立し、NMR を用いてその立体構造を明らかにすることで、そのカーゴとの結合調節のメカニズムや中間鎖との関わりに考察を加えることを目的としている。現在までに、大量発現・精製法の確立と主鎖の連鎖帰属を完了している。発現・精製は、GST 融合タンパク質 (GST-robl) として、大腸菌 BL21(DE3) で発現させたサンプルを、Glutathione Sepharose 4B と HPLC を用いて精製した。また、NMR 測定に必要な robl の ¹⁵N 又は ¹³C/¹⁵N で均一に標識した試料の作製には、藻類分解物を主成分とする培地を用いた。以上のような方法で作成したサンプルを用いて、¹H/¹⁵N-HSQC、CBCACONH、CBCANH、HNCO、HNCACO、HNCA といったスペクトルを測定し、それらを用いた主鎖の連鎖帰属の結果、全残基中 93 % の帰属が完了している。現在は、側鎖の帰属に必要なスペクトルの測定及び帰属を行っており、本年度では、robl の溶液構造を決定して報告したい。

M.Taguchi, T.Kouno, Y.Nabesima, M.Mizuguti, H.Takasugi, Y.Mori, H.Sinoda and K.Kawano : Solution structure of roadblock from *Drosophila melanogaster*

2P024

タイトジャンクション結合タンパク質 TJP2 の N 末端 PDZ ドメインの溶液構造解析

○末武 徹也¹、林 文晶¹、白水 美香子^{1,2}、寺田 貴帆^{1,2}、木川 隆則¹、井上 真¹、矢吹 孝¹、青木 雅明¹、松田 貴意¹、関英子¹、廣田 洋¹、好田 真由美¹、田仲 昭子¹、林崎 良英¹、横山 茂之^{1,2,3} (¹ 理研・GSC、² 理研・播磨、³ 東大院・理)

タイトジャンクションは、上皮細胞シートや内皮細胞シートにおいて細胞間を接着する装置の一つとして機能しており、その主要成分は膜タンパク質クローディンおよびオクルディンである。TJP2 (also known as ZO-2) は、細胞質内でクローディンに直接結合する裏打ちタンパク質であることが近年同定された。TJP2 の全長は 1167 残基で、N 末端側から3個の PDZ ドメイン (PDZ1、PDZ2、PDZ3)、1 個の SH3 ドメイン、1 個の GUK ドメインで構成されており、PDZ1 ドメインがクローディンの C 末端部分を認識することが知られている。また、PDZ1 ドメインの1残基変異 (V48A) は、PDZ1 ドメインの構造の安定性とクローディン結合能を低下させ、胆汁酸の排泄障害を引き起こすという報告がある。我々は多次元 NMR 法を用いて PDZ1 ドメインの溶液中での立体構造を決定し、PDZ1 ドメインのクローディンへの結合様式および V48A 変異が立体構造に与える影響を考察した。

T.Suetake, F.Hayashi, M.Shirouzu, T.Terada, T.Kigawa, M.Inoue, T.Yabuki, M.Aoki, T.Matsuda, E.Seki, H.Hirota, M.Yoshida, A.Tanaka, Y.Hayashizaki and S.Yokoyama : Solution structure of N-terminal PDZ domain from mouse TJP2