2P045

アダプター蛋白質 GGA の自己阻害機構の構造学的検証

○上久保 裕生¹、川崎 政人²、加藤 龍一²、中山 和久³、若槻 壮市²、片岡 幹雄¹ (¹ 奈良先端大・物質、² 高エネ機構・構造生物セ、³ 京大・薬)

GGA 蛋白質は、積み荷蛋白質のクラスリン被覆小胞への取り込みに関与するアダプター蛋白質である。GGA 蛋白質は、N 末端から VHS、GAT、GAE の 3 つのドメインからなるマルチドメイン蛋白質であり、GAT と GAE の間には、クラスリン結合部位を含む長いリンカーが存在する。このリンカー領域には、VHS ドメインの認識配列に相同性の高い配列が存在することが知られており、生化学的な実験から VHS と輸送蛋白質受容体の結合に対して、自己阻害している可能性が示唆されている。先の年会では、従来、単量体で機能すると考えられてきた GGA 蛋白質が、溶液条件下で VHS を介した 2 量体を形成していることを明らかにした。さらに、この 2 量体は、VHS に輸送蛋白質受容体 C 末端ペプチド (M6PR ペプチド) が結合することによって、単量体に解離することを示した。この結果は、リンカーに存在する自己阻害配列が VHS ドメインと実際に結合するのであれば、自己阻害配列を含む断片では、その多量体形成能に何らかの変化を与えることを示唆している。そこで、本研究では、VHS、GAT、及び自己阻害配列を含む断片の溶液構造を、X 線溶液散乱測定によって明らかにすることで、提唱されている自己阻害機構の構造学的検証を行うことを目的とした。GGA の 3 つのホモログの一つである GGA3 について、自己阻害配列の影響を検証した結果、M6PR ペプチド添加による 2 量体の解離定数、及び溶液構造に違いは確認されなかった。GGA3 は GGA1 に比べ、GAT から自己阻害配列間に長いリンカーが存在する。そこで、このリンカー長の効果を検証するために、GGA1 についても実験を行ったが、同様に自己阻害配列の寄与は確認できなかった。以上の結果は、従来提唱されている自己阻害機構が、実際には機能していない可能性を示唆している。

H. Kamikubo, M. Kawasaki, R. Kato, K. Nakayama, S. Wakatsuki, and M. Kataoka : Structural inspection of the auto-inhibition mechanism of GGA proteins

2P047

ヒト M-フィコリン フィブリノーゲン様ドメインの三量体構造

○谷生 道一¹、近藤 伸²、杉尾 成俊²、河野 俊之¹ (¹ 三菱生命研、² MCC、ゾイジーン)

生体防御機構の一つである自然免疫では、レクチンが異物認識に関与している。これらのレクチンは、生物に普遍的に存在する糖鎖を認識しているが、自己に存在する糖鎖は認識しない。そのため、この自己-非自己認識機構の解明は、多種多様な病原体に対する医薬品開発に繋がるのが期待されるが、その認識機構の詳細は明らかではない。本研究では生体防御レクチンの一種であるフィコリンの糖結合能と立体構造の解析から、その異物認識機構の解明を目的とした。フィコリンは、N 末側にコラーゲン様ドメイン、C 末側に糖結合部位であるフィブリノーゲン様 (FBG) ドメインを持つ約 300 残基から成るタンパク質であり、三量体を単位とした多量体を形成している。ヒトでは現在三種類 (M、L および H) のフィコリンが知られている。このヒトフィコリンの FBG ドメインを、酵母 *P. pastoris* による分泌発現を試みた結果、M-フィコリン FBG ドメイン (FD1) のみが正常なレクチン活性を持つ状態で発現された。FD1 の結晶構造解析の結果、これまで不明であったフィコリンの三量体形成機構の詳細が明らかとなった。年会では、FD1 の糖結合能と三量体構造から、自己-非自己認識機構について考察する。

M.Tanio, S.Kondo, S.Sugio and T.Kohno : Trimeric structure of human M-ficolin fibrinogen-like domain

2P046

タンパク質ファミリー内での会合状態変化：相互作用面とアミノ酸置換

○西 羽美¹、太田 元規² (¹ 東工大・生命理工、² 東工大・学国情セ)

生体内に存在するタンパク質の多くは複合体構造をとることで初めてその機能を発揮する。複合体形成において重要となるのがタンパク質間の相互作用であり、相互作用面である。本研究ではタンパク質の相互作用面を考えるにあたり「会合状態 (単量体、2 量体等)」に焦点を当て「配列・構造共に似ているが、会合状態が異なるタンパク質」同士を比較する事で、どのような配列的・構造的要素が会合状態の差異＝相互作用面の獲得／消失をもたらすのかを明らかにしようとした。

まず、SCOP の family について「同じ family に属するが、異なる会合状態を取る」ようなシングルドメインのタンパク質 294 個 / 51 family を選び出した。会合状態については Uniprot のアノテーションを利用した。次に、同一 family 内で multiple alignment を作成し、会合状態が異なる配列間において「ある会合状態をとるタンパク質では表面にあたるが、よりサブユニット数の多い会合状態 (例：2 量体に対する 4 量体等) では相互作用面となる」部位を選び出し、アミノ酸置換をカウントすることでタンパク質表面-相互作用面間の置換頻度マトリックスを得た。また、タンパク質表面間でも同様にマトリックスを作成しその比を取る事で、タンパク質表面→相互作用面に特有な置換を点数化するスコアマトリックスを生成した。このマトリックスを用い、データセット中より会合状態が異なるタンパク質ペアを取り出して点数付けしたところ「サブユニット数の多い会合状態では相互作用面にあたる」部位での平均スコアは約 94% のペアで正の値をとったのに対し、双方共に表面にあたる部位では約 99% で 0 を下回る結果となった。当日は、元となるアラインメント精度のスコアへの影響や相互作用面でのスコア分布等の詳細についても報告する。

H.Nishi and M.Ota : Amino acid substitutions on protein-protein interfaces that will cause the change of oligomeric states.

2P048

NAD 生合成系酵素キノリン酸シンターゼの結晶構造

○櫻庭 春彦¹、米田 一成¹、大島 敏久¹、津下 英明²、勝沼 信彦² (¹ 徳島大・工・生物工、² 徳島文理大・健康科学研)

キノリン酸シンターゼ (QS) は原核生物におけるアスパラギン酸からの *de novo* NAD 生合成系の第 2 段階を触媒する。QS は人や動物には存在しないため、新規な抗細菌剤開発のターゲットとなりうる。これまで、原核生物の NAD 生合成系に関与するほとんど全ての酵素の立体構造が決定されているが、QS の構造に関する報告は無い。また、反応機構に関する研究も行われていない。我々は、超好熱アーキア *Pyrococcus horikoshii* には、この NAD 生合成系の初発酵素である L-アスパラギン酸オキシダーゼが存在することを明らかにしている。本菌のゲノム情報より、NAD 生合成系関連酵素全てのホモログの存在が確認されており、本菌にもアスパラギン酸からの NAD 生合成系が存在すると考えられる。QS の結晶構造は基質アナログである malate の存在下決定された (1WZU)。全体の構造は alpha-beta-alpha サンドウィッチの 3 回リピートからなるユニークな三角形構造をとっており、これと類似の構造の報告は無かった (下図)。三つのドメインは擬似 3 回対称で関係付けられており、この 3 回軸の上に活性中心のポケットが存在していた。malate 分子はこのポケットの底付近に固定されていた。QS の活性中心の情報新規抗細菌剤の開発に寄与するかもしれない。

H.Sakuraba, K.Yoneda, T.Ohshima, H.Tsuge, N.Katunuma : Crystal structure of the NAD biosynthetic enzyme quinolinate synthase