2P049

MHCクラスIとCLIPの間の相互作用の解析

○竹川 邦子、奥田 有恒、中川 将利、東 隆親、小園 晴生（東京理科大学・生命研）

T細胞を介する免疫応答に関与する蛋白質として主要組織適合抗原（MHC）が存在する。MHCには、それぞれ抗原提示経路が異なるclass Iとclass IIと二種類が存在する。class IIは、小胞体内でインバリアント（Ii）鎖と結合しており、Ii鎖が抗原ペプチドと交換する事により抗原提示を行う。このようにCLIPとMHCとの結合は、class IIに特有の現象と考えられていたが、これまでの研究で、CLIPがclass Iとも結合する事が明らかになった。

そこで本研究では、MHC class Iの中でもマウス由来のH-2K^bを用い、CLIPの結合様式を明らかにすることを目的として、解析を行った。まず、H-2K^bとCLIPを光反応性 cross-linker 試薬で共有結合させた。プロテアーゼによる処理後、TOF-MSを用いてCLIPが結合したH-2K^b断片の同定を行った。その結果、CLIPはペプチド収容溝の内部もしくは周辺に結合する可能性が示唆された。次に、円二色性分散計（CD）を用い、H-2K^bに抗原ペプチドが結合した時の変性温度の解析を行ったところH-2K^bに抗原ペプチドとCLIPが結合した場合、抗原ペプチドのみが結合した場合より、変性温度が約5℃上昇している事を確認した。この結果は、CLIPがH-2K^bの安定性に寄与している事を示しており、H-2K^bのペプチド収容溝付近に結合しているというTOF-MSの結果を支持するものであった。更にCLIPのどのアミノ酸残基が結合に関与しているかについて検討をBIAcoreを用いて行ったのでそれについても併せて報告する。

K.Takekawa,A.Okuda,M.Nakagawa,T.Azuma and H.Kozono : The analysis of the interaction between MHC class I and CLIP

2P051

質量分析法によるジヒドロ葉酸還元酵素42位変異体のH/D交換の研究

○陰野 美由紀¹、山本 竜也²、大前 英司¹、巖倉 正寛³、月向 邦彦¹（¹ 広大院・理、² 広大・QuLiS、³ 産総研）

我々はこれまで質量分析法により、大腸菌ジヒドロ葉酸還元酵素（DHFR, M.W. 18,000）のH/D交換が、わずか1アミノ酸置換により大きく影響を受けることを見出し、構造安定性や機能発現における揺らぎの役割を明らかにしてきた。中でも、進化工学的に酵素活性が上昇する部位として見出されたDHFR Met42のアミノ酸置換は、分子全体の揺らぎを大きく改変し、構造安定性や機能にまで影響を及ぼすことが明らかになっている。本研究では、42位変異体の消化を組み合わせたH/D交換反応に伴う質量の経時変化を質量分析計により測定することで、1アミノ酸置換により影響を受ける部位の特定を行い、機能との関係を考察した。

DHFR水溶液に重水を1:10で混合することでH/D交換反応を開始し（pH 7.0, 15℃）、各時間ごとにpH(2.6)と温度（0℃）で反応をクエンチした後、pepsinによって断片化を行い、質量分析計（MALDI-TOF）で各断片の質量を測定した。各交換反応時間における質量を一次反応式でFittingすることにより、交換速度パラメータを得た。

試料には分子全体のH/D交換で、野生型との差が12.2 Daと最大であり、活性の減少を示した変異体 M42Qを用いた。消化によって得られた18本の断片（f1-f18）の二次構造含有率とH/D交換パラメータとの間に、野生型では相関が見られたが、M42Qではβ-strand含有率との相関が見られないことから、42位へのGlnの導入によってβ-strandの交換に協同性がなくなったと考えられる。また、42位を含むβ-strand（β B）と隣接していないβ-strandを含むf14（β F, β G）、f15（β G）は野生型と比較して交換量の差が大きいこと、機能に重要な役割を果たすMet 20-loopを含む断片 f2,f3の交換量の差が小さいことから、42位のアミノ酸置換により、部位特異的な構造変化が揺らぎの改変を通して機能にまで及ぶことが示唆される。

M.Inno,T.Yamamoto,E.Ohmae,M.Iwakura and K.Gekko : Mass spectrometry on H/D exchange of dihydrofolate reductase mutants at methionine-42

2P050

糖尿病誘導性MHCの1分子レベル動態解析

○植田 純一¹、佐川 琢磨²、東 隆親¹、金川 修身³、佐々木 裕次²、小園 晴生¹（¹ 東京理科大・生命研、² 科技振・高輝度光科学研究セ、³ 理化学研・免疫アレルギー・自己免疫制御）

インスリン依存性糖尿病（IDDM）を引き起こす要因は、遺伝的に雑多であるが、MHCの関与が最も大きいと考えられている。人及びマウスにおいてIDDMの原因となるMHC遺伝子座は同定されている。他のMHCと比べ、疾患感受性MHCであるI-A^{g7}/DQ8ではβ鎖の57番目の残基がAsp以外のSer、Ala等の中性残基に置換されている。この疾患と関連したMHCII分子のX線結晶解析がなされた結果、他のMHC分子で顕著なβ 57-α 76間の水素結合が無く、そのためp9ポケットの入り口がやや広がっていることや、p9ポケットが塩基性であるということが解ったが、それ以外はペプチドの構造を含め、他のI-A分子とほとんど変わっていなかった。一方、EAEやIDDMを引き起こすMHC/ペプチドは、単一のペプチドが、複数のランダムな取り合わせのV α及びV β配列を持つT細胞クローンを活性化することが知られている。そこで、我々はMHCの中で一つのペプチドが自由に動き、いくつかの構造をとりうるのではないかという仮説を立てた。それを検証するために、今回、X線1分子計測を用いたI-A^{g7}或いはそれに結合したペプチドの動きのリアルタイム測定をおこなった。X線1分子計測法（Diffracted X-ray Tracking: DXT）は、標的分子をナノ結晶金コロイドで標識し、その動きを経時的に記録することで、1分子レベルでの分子の速さ、つまりゆらぎ状態の変化を知る方法である。その結果、糖尿病誘起性のペプチドの動きが、コントロールペプチドに比べて大きいことが解った。現在、分子ゆらぎの大きさが、他の物理化学的な性質であるSDS耐性、熱安定性とどのように関連するか検証中である。

J.Makita, T.Sagawa, T.Azuma, O.Kanagawa, Y.Sasaki, H.Kozono : Structural fluctuation of a IDDM inducing MHC at the level of single molecule

2P052

Ubiquitinとユビキチン様蛋白質NEDD8に共通の構造揺らぎ

○北原 亮¹、坂田 絵理²、粕谷 武史²、山口 芳樹²、加藤 晃一^{2,4}、田中 啓二³、横山 茂之^{1,4,5}、赤坂 一之^{1,6}（¹ 理研・播磨、² 名市大院・薬学、³ 臨床研・分子腫瘍学、⁴ 理研・GSC、⁵ 東大院・理、⁶ 近大・生物理工）

圧力は温度と同様に蛋白質の熱力学的状態を規定する。そのため、広い圧力・温度範囲でNMR測定を行うことにより、蛋白質の基底構造から変性構造までの広い構造空間を探索し、エネルギー地形の全体像を理解することが可能となる。本研究は、相動的な一次配列と基底構造を有するUbiquitinとユビキチン様蛋白質NEDD8について、そのエネルギー地形の全体像を比較し蛋白質構造と機能の関係についての理解を目的としている。UbiquitinとNEDD8はアミノ酸配列相同性58%で、いずれも蛋白質の翻訳後修飾や分解に関わり、共有結合による類似の修飾系を持つユビキチン関連モディファイヤーとして知られている。広い圧力（1 bar-3.7 kbar）・温度（-21-90℃）範囲におけるNMR測定から、UbiquitinとNEDD8には共通の構造揺らぎが存在することが明らかになった。すなわち、スピン緩和測定に基づいてαヘリックスとC末端ストランドを含む蛋白質のC末端側でマイクロ秒ーミリ秒オーダーの遅い揺らぎが観測され、さらに圧力・温度可変実験により、C末端側32-42番が局所的に変性状態に移移した局所変性構造の存在が明らかになった。興味深いことに、これらの共通した構造揺らぎは、2つの蛋白質で保存されたアミノ酸配列上で生じていた。一方、NEDD8の基底構造及び局所変性構造の熱力学安定性はUbiquitinに比べ顕著に低く、エネルギー地形の設計が大きく異なることを示した。筆者らは、これらの相違点は、2つの蛋白質の機能発現機構と密接に関わるものと考えている。一般に、蛋白質の構造やエネルギー地形は、自然により設計されたものであり、多彩で制御された蛋白質機能を理解するためには、広い構造空間とエネルギー地形に基づいた議論が必須となるだろう。

R. Kitahara, E. Sakata, T. Kasuya, Y. Yamaguchi, K. Kato, K. Tanaka, S. Yokoyama and K. Akasaka : Variable pressure NMR revealed a conserved excited state conformer between ubiquitin and ubiquitin-like protein NEDD8