3P013

二原子酸素添加酵素メタピロカテカーゼの阻害剤複合体の結晶構造

○喜田 昭子¹、石田 哲夫²、田中 裕之²、森本 幸生¹、堀池 喜八郎²、三木 邦夫^{3,4} (¹京大原子炉、²滋賀医大生化学、³京大院理、⁴理研播磨研)

二原子酸素添加酵素は、分子状酸素を基質に添加する酵素の一つで、代表的な物としてカテコール環を開裂する反応を触媒する酵素が挙げられる。メタピロカテカーゼは二原子酸素添加酵素の一つで、純粋なカテコールを基質とし、その二つの水酸基の隣の結合を開裂する反応を触媒する。*Pseudomonas putida* mt-2由来のこの酵素の野生型の立体構造はすでに明らかになっている(A. Kita *et al.*, *Structure Fold Des.*(1999), 7, 25- 34)。本酵素は四量体で機能しており、その活性部位には、補欠因子として2つのヒスチジンと1つのグルタミン酸に配位された二価鉄を保持している。我々は、本酵素の反応機構を詳細に調べるため、本酵素と阻害剤である2-ヒドロキシピリジン-N-オキシド(2HPNO)との複合体の結晶構造解析を行った。メタピロカテカーゼ-2HPNO複合体の結晶は、酢酸ナトリウムを沈殿剤とした共結晶化法で得ることができた。結晶は空間群 *I*4に属し、格子定数は *a* と *b* が 307.5 Å, *c* が 59.7 Åであった。野生型酵素をモデルとした分子置換法で構造解析を行い、解を得ることができた。この結晶は、非対象単位内に1つの四量体を含んでいる。四量体全ての分子の活性部位に、2HPNO由来と考えられる電子密度を確認することができた。現在、立体構造の精密化を進めている。

A. Kita, T. Ishida, H. Tanaka, Y. Morimoto, K. Horiike and K. Miki : Crystal structure of the complex between metapyrocatechase and its inhibitor.

3P015

Glu-tRNA^{Gln} amidotransferaseの構造解析と反応機構

○中村 彰良、坂井 直樹、姚 閔、田中 勲 (北大院・理・生物科学)

翻訳反応では、はじめに20種のアミノ酸が対応するtRNAへ正確に付加される。この反応は、アミノアシルtRNA合成酵素(aaRS)によって触媒される。生体中には20種のアミノ酸に対応した20種類のaaRSが存在しており、この付加反応の対合性を厳密に制御している。この厳密な対合は遺伝情報の正確な翻訳のための前提条件である。しかし古細菌と一部の真正細菌はGlnRSを欠いており、その為、GluRSによってGluとtRNA^{Gln}との対合産物Glu-tRNA^{Gln}がつくられ、次いでGlu-tRNA^{Gln} amidotransferase (Glu-AdT)がこれを校正するという二段階の反応を経てGln-tRNA^{Gln}がつくられる。真正細菌型Glu-AdTはGatCAB複合体、古細菌型Glu-AdTはGatDE複合体より構成されている。Glu-AdTには3種類の反応が存在する。(1)誤って対合したGlu-tRNA^{Gln}のみを正しく識別するtRNA認識機構 (2)Glu-tRNA^{Gln}のリン酸化による活性化機構 (3)Glnの加水分解からNH₃を生成し、活性化Glu-tRNA^{Gln}をGln-tRNA^{Gln}に校正するアミド基転移反応機構の3種である。Glu-AdTは、これらの反応を正確に制御することにより厳密な校正反応を行う。

本研究では、GatCAB複合体の立体構造を2.3Å分解能で決定した。さらに、アミド基転移反応の基質であるGlnとの複合体の立体構造解析を行い、GatAの中にGlnの加水分解部位を特定することに成功した。またMg²⁺の存在からGatBのATP結合部位を推定し、C末端ドメインがtRNA^{Gln}と結合することを、変異体を作成して確認した。GatCは、GatAとGatBの結合面に巻きついていることから、GatAとGatBの結合の安定化に寄与していると考えられる。

A. Nakamura, N. Sakai, M. Yao and I. Tanaka : Structural and molecular study of Glu-tRNA^{Gln} amidotransferase

3P014

開口放出に働くRab GTPase Sec4のguanine nucleotide exchange factor Sec2のX線結晶構造解析

○佐藤 裕介、深井 周也、濡木 理 (東工大・院生命理工・生命情報)

開口放出は積み荷を載せた小胞が細胞膜と融合することにより起き、膜融合はRabに代表されるsmall GTPase群とそのエフェクターとの相互作用により制御される。出芽酵母の開口放出ではRab GTPaseであるSec4がGTP依存的に分泌小胞を輸送し、多数のタンパク質からなるエクソシスト複合体との相互作用によって分泌小胞を細胞膜の目的の場所へと運ぶ働きをしている。膜融合が完了すると、Sec4は別の分泌小胞と再び結合し、次の開口放出を進める。このSec4のサイクルは、GTPase activating protein (GAP)とguanine nucleotide exchange factor (GEF)の2種のタンパク質によって制御されており、GAPはSec4に結合しているGTPの加水分解を促進し、GEFはSec4に結合したGDPとGTPを交換する働きを持つ。Sec4のGEFとしてはSec2が同定されており、Sec2の1-160アミノ酸残基の領域がSec4と相互作用し、さらにその領域のみでGEF活性を持つことが知られている。このSec2のGEFドメインは、構造既知のGEFドメインと全く相溶性が無い。本研究では、Sec2GEFドメインおよびSec2GEFドメイン・Sec4複合体の結晶構造を決定することにより、GDP-GTP交換とカップルした膜融合制御のメカニズムを明らかにすることを目的としている。これまでに、Sec2GEFドメインの反射データが2.6 Åの分解能で得られており、現在、多波長異常分散法を用いて位相を決定するためにセレンメチオニン置換体のSec2GEFドメインの結晶を調製し、反射データの解析を目指している。また、Sec2GEFドメイン・Sec4複合体の結晶も得られているが、これに関してはまだ結晶が非常に小さく、多結晶であるのでX線回折実験に用いることはできていない。しかし、結晶化条件の改良をさらにし、Sec2GEFドメインもしくはSec4のコンストラクションを変えることで、結果が改善されることを期待している。

Y.Sato, S.Fukai and O.Nureki : Crystallographic study of yeast Sec2, a guanine nucleotide exchange factor (GEF) for yeast Rab GTPase, Sec4.

3P016

アニーリング法を用いたチトクロムc酸化酵素の分解能の改善

○菅 倫寛¹、伊藤・新澤 恭子²、青山 浩³、山下 栄樹¹、吉川 信也²、月原 富武¹ (¹大阪大学蛋白質研究所、²兵庫県立大学理学部生命理科学研究科、³播磨理研)

チトクロムc酸化酵素はミトコンドリア内の呼吸鎖の末端に位置する酵素であり、呼吸によって得られた酸素を水に還元することによってプロトン能動輸送し、プロトン濃度勾配を作り出す。この勾配によってATP合成酵素を駆動させ、ATPが合成されている。我々はチトクロムc酸化酵素のプロトンパスをX線結晶解析によって直接観測することをめざしている。X線結晶解析において電子密度の小さい水素原子を観測するには高分解能のデータが必須である。我々は蛋白質結晶のアニーリングに注目し、一度析出した結晶をアニーリングによってさらに良質なものと変えることを試みている。これまでに、およそ2.0オングストローム分解能の結晶が1.8オングストローム分解能まで良化されることを確認している。また回折強度を処理できない程モザイク幅の大きな結晶も、モザイク幅が減少し処理が可能になったケースもある。今後はこの方法をさらに改良して水素原子が観測できる高分解能のデータを得たい。またこの方法は他の多くの蛋白質の結晶にも利用可能であるので、分解能を必要としている他の蛋白質結晶にも適用する。

M.Suga,K.Ito-Shinzawa,H.Aoyama,E.Yamashita,S.Yoshikawa,T.Tsukih : Improvement of resolution of cytochrome c oxidase crystal using annealing method