最近の研究から

高グリシン血症の原因となる P タンパク質の X 線結晶構造解析

理化学研究所 播磨研究所 放射光科学総合研究センター 中井忠志

Tadashi NAKAI: Crystal Structure of Glycine Cleavage System P-protein Provides Insights into the Molecular Basis of Hyperglycinemia

The crystal structure of the P-protein of the glycine cleavage system from *Thermus thermophilus* HB8 has been determined, which reveals that P-proteins do not involve the α_2 dimer universally observed in the evolutionarily related pyridoxal 5'-phosphate (PLP)-dependent enzymes. Instead, novel $\alpha\beta$ dimers associate to form an $\alpha_2\beta_2$ tetramer. The crystal structure of P-protein without PLP has also been analyzed. These structures allow the identification of functionally important residues involved in recognition of the cofactor and substrates, and show that most of these residues are well conserved among all living organisms. These results provide insights into the molecular basis of hyperglycinemia.

1. 先天代謝異常症・高グリシン血症

私たちの体内では多くの物質が代謝により合成・分解されているが、通常それらの体内濃度は一定の範囲に保たれている。先天代謝異常とは、生まれつき代謝にかかわる何らかのタンパク質（主に酵素）の遺伝子に突然変異をもつために、正常な代謝を行うことができない状態を指し、結果として関連する代謝物質が体内で異常な濃度に達してしまうことが多い。先天代謝異常には疾患であるものとそうでないものがあり、前者は末尾に「症」が添えられて区別されることがある。後者については、日本人の約半数が該当するアルコール紅潮反応（alcohol flush reaction）が最も身近な例であろう。生体内のアルコール分解ではエタノール→アセトアルデヒド→酢酸と代謝されるが、少量の飲酒により顔などが紅潮する人はアルデヒド脱水素酵素の遺伝子に変異をもつ。それらの人はこの酵素の活性が低いため、飲酒によって血中アルデヒド濃度が上昇しやすく、結果として飲酒による影響を受けやすい。この個人差は、遺伝子中のわずか1塩基の変異により酵素の487番目のアミノ酸残基がグルタミン酸からリシンに置換しているために生じる。¹⁾なお、このような1カ所に限定された置換を点変異と呼び、本稿では Glu487→Lys という形式で表記する。

一方、先天代謝異常症である高グリシン血症は、グリシンの代謝にかかわる酵素の変異によって、グリシンの分解反応が正常に行えないために発症する重篤な疾患である。グリシンは食物として摂取したタンパク質中に通常含まれるため、アルコールの場合とは異なり摂取せず防止することは難しい。この異常のために、グリシンが高濃度に血中に蓄積すると、痙攣、呼吸障害などの深刻な神経症状が生じる。²⁾患者の大部分は新生児期に死亡し、生存できても

重篤な精神発達の遅れを伴う。高グリシン血症は、一般的には稀にしか見られない疾患であるが、フィンランド北部では発症頻度がほかの地域より数十倍以上も高く、新生児1万人当たり1人の発症率となっている。³⁾その理由は、グリシン代謝を担う酵素に点変異（Ser564→Ile）が生じた遺伝子の保因者が、その地域に蔓延しているためである。³⁾

2. グリシン開裂系

グリシンは、タンパク質を構成する20種類のアミノ酸の中で唯一不斉炭素原子をもたない最も簡単な構造をもつ。しかし、生体内での分解反応はそれほど簡単ではない。細菌から高等動植物にわたるほとんどの生物では、グリシンは「グリシン開裂系」と呼ばれる多酵素複合体により代謝され、アンモニア、二酸化炭素、メチレン基にまで分解される⁴⁾（図1）。グリシン開裂系は4種類のタンパク質（P・H・T・L）からなる。Pタンパク質はピリドキサ

図1 グリシン開裂系が触媒する反応。(Multistep reaction catalyzed by the glycine cleavage system.)

ールリン酸 (PLP) 依存のグリシン脱水素酵素, H タンパク質は反応中間体の運び手となるリポアミド含有タンパク質, T タンパク質はテトラヒドロ葉酸 (THF) 依存のアミノメチル転移酵素, L タンパク質は FAD および NAD 依存のリポアミド脱水素酵素である。このように, グリシン開裂系は 3 種類の酵素, 1 種類のタンパク質, 5 種類の補酵素が関与する興味深い系である。植物では, グリシン開裂系タンパク質がミトコンドリア中に高濃度で含まれ, 光呼吸経路に関与する。⁴⁾ 植物の光呼吸で発生する二酸化炭素は P タンパク質によるものである (図 1)。また, マメのミトコンドリア抽出液を用いた実験によると, グリシン開裂系は分画分子量 30 万の限外ろ過膜上に保持される。単独ではどの成分も膜を通過するのに対し, 4 成分が混在すると 2P : 27H : 9T : 1L の化学量論比で膜上に保持されるため, 生体内では複合体として存在することが示唆されている。⁵⁾ しかし, 生体外では希釈などによって容易に解離し, H タンパク質はほかの 3 酵素の 1 基質として振る舞う。⁵⁾ 立体構造については, 2 生物種の H タンパク質, 3 生物種の T タンパク質, 7 生物種の L タンパク質の結晶構造が明らかになっているが, 筆者らが解析を行うまでは P タンパク質の構造⁶⁾ が最後まで不明であった。

3. P タンパク質

P タンパク質 (別名グリシン脱水素酵素, EC 1.4.4.2) はビタミン B₆ 誘導体である PLP を補酵素にもつ PLP 依存性酵素 (PLP 酵素) である。PLP 酵素はアミノ酸配列の類縁関係に基づいて 5 つの系統に分類されている。同じ系統に属す酵素は共通の先祖から進化 (分子進化) したと考えられ, 基本骨格というべきフォールド (折り畳み) が共通であるという特徴をもつ。P タンパク質は I 型の系統に属している。⁷⁾ I 型の代表はアスパラギン酸アミノ基転移酵素 (肝機能検査の GOT として有名) であり, 1980 年に PLP 酵素最初の結晶構造として報告された。⁸⁾ それ以来, I 型の PLP 酵素は最も古くから構造解析がなされてきており, 5 つの系統の中で最も生化学・構造生物学の両面で理解が進んでいる。生物種間の違いも計算に含めると, これまで 62 種類の I 型の PLP 酵素の立体構造が決定されている。I 型の立体構造の特徴は, ホモ二量体 (α_2) またはそれを基本単位とする多量体 (α_4 , α_6 , α_{12}) 構造をもつことである。筆者らが構造解析を行った *Thermus thermophilus* (Tth) HB8 由来の P タンパク質は α および β の 2 種類のサブユニットから構成されている。したがって, このサブユニット構成は唯一の例外であり, 酵素の分子進化という立場でも P タンパク質の構造は興味深い。

Tth の P タンパク質は $\alpha_2\beta_2$ 四量体として存在し, 分子量は 20 万 (α 鎖が 4.7 万, 438 残基, β 鎖が 5.3 万, 474 残基) である。高グリシン血症患者の約 8 割が P タンパク質遺伝子に変異をもつため,²⁾ 医学的にも P タンパク質の原子

レベルでの立体構造解析が待ち望まれていた。P タンパク質のアミノ酸配列は Tth とヒトとの間で類縁関係がある (一致度は 34 %) ことから, 両者はよく似た立体構造をもつことが示唆されていた。したがって, Tth の P タンパク質の立体構造を決定できれば, 高グリシン血症を理解するうえで有用なモデルが得られる可能性があった。本稿では, P タンパク質の立体構造の特殊性と分子進化的考察, 立体構造に基づく高グリシン血症の発症メカニズムを中心に紹介する。また, P タンパク質の構造決定に至るまでには, 丸 4 年の試行錯誤が必要であった。その中から, 興味深いと思われる部分についても触れたい。

4. 実験方法

4.1 クローニング, 共発現系構築および精製

筆者は 2000 年 4 月から SPring-8 の敷地内にある理研播磨研でグリシン開裂系の仕事を開始した。播磨研では高度好熱菌丸ごと一匹プロジェクト (www.thermus.org) が開始していたので, 発現プラスミドの構築方法についてはプロジェクトの定法⁹⁾ に従った。定法では 1 つの翻訳領域 (ORF) ごとに発現プラスミドを作成する。グリシン開裂系の H・T・L の 3 タンパク質は, どれも 1 種類のサブユニットからなり, ORF ごとの発現で可溶性タンパク質が得られた。しかし P タンパク質は, α 鎖 ORF と β 鎖 ORF の 2 種類が存在し, 一方の ORF 単独での発現では可溶性タンパク質が得られなかった。このように異種のサブユニットからなるタンパク質は, それらを同一細胞内で同時に発現 (共発現) させるとうまくいく場合がある。本研究では, 最終的には共発現を使うという方針に間違いはなかったが, 最もよく使われていた方法 (その後筆者もほかの系で使用した¹⁰⁾) ではうまくいかず, 独自の共発現系を構築することで十分な量の可溶性タンパク質を得ることができた。¹¹⁾ 得られた P タンパク質は天然のものと同じように熱にも安定であるため, ほかの Tth のタンパク質と同様, 70 °C で熱処理を行うことにより目的タンパク質以外の夾雑物の多くを除くことができ, その後 4 種類のカラムクロマトグラフィーにより純度の高い精製サンプルが得られた。また, P タンパク質は高塩濃度条件でも $\alpha_2\beta_2$ 複合体として安定であるので, 結晶化条件も幅広く検索することができた。

4.2 結晶化段階での試行錯誤および回折データ収集

当時市販の結晶化初期条件検索キットから主要な 4 種類を用いて検索したところ, わずか 1 カ所から有望な結晶が析出した。しかし, その結晶化条件は再現性に乏しいという欠点があった。精製ロットの差によるバラつきはもちろん, 精製ロット・沈殿剤組成などすべて同一の条件を用いても, 結晶になる場合とならない場合があるのが難点であった。さらに悪いことに, 種結晶を使う方法も効果がなく, 核形成には 1 カ月程度要した。にもかかわらず, 精製サンプルは約 1 カ月以内の新鮮なうちに使わないと結晶が出

表1 結晶学的統計値. (Data collection, refinement and model statistics.)

	アポ酵素	ホロ酵素	水銀誘導体
データ収集(括弧内は最外殻の値)			
ビームライン	BL45XU ^a	BL45XU ^a	BL44B2 ^a
測定波長/Å	0.90	1.00	1.00
空間群	<i>P</i> 3 ₁ 2 ₁	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
格子定数	89.6, 89.6,	134.9, 166.7,	135.0,
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> /Å	371.0	189.0	166.6, 189.9
分解能範囲/Å	50.0-2.40	50.0-2.10	50.0-3.38
	(2.49-2.40)	(2.18-2.10)	(3.50-3.38)
総反射数	708,434	1,697,129	420,800
独立反射数	69,153	245,553	60,776
	(6,807)	(23,611)	(5,955)
多重度	10.2 (9.8)	6.9 (5.7)	6.9 (6.4)
完全性/%	99.9 (99.8)	99.0 (96.2)	99.8 (99.5)
<i>R</i> _{merge} 値 ^b /%	14.8 (47.3)	12.4 (67.3)	20.5 (47.9)
平均 $\langle I/\sigma(I) \rangle$	15.3 (5.2)	15.0 (2.6)	10.0 (3.9)
精密化(括弧内は最外殻の値)			
分解能範囲/Å	50.0-2.40	50.0-2.10	
	(2.55-2.40)	(2.23-2.10)	
<i>R</i> _{work} 値 ^c	0.177 (0.214)	0.189 (0.227)	
<i>R</i> _{free} 値 ^c	0.237 (0.309)	0.229 (0.266)	
構造モデル			
理想値からのずれの平均値(rms値)			
結合長/Å	0.006	0.005	
結合角/°	1.3	1.3	
平均温度因子(括弧内は非対称単位中の残基数または分子数)			
主鎖/Å ²	27.89 (1,816)	27.51 (3,640)	
側鎖/Å ²	30.25	30.35	
PLP/Å ²	—	31.43 (4)	
水分子/Å ²	33.01 (1,024)	34.58 (2,145)	

^aすべてSPring-8の理研構造生物学ビームライン^b $R_{\text{merge}} = \sum_{hkl} \sum_i |I_{hkl,i} - \langle I_{hkl} \rangle| / \sum_{hkl} \sum_i I_{hkl,i}$ (I は反射強度, $\langle I \rangle$ は等価な I の平均)^c R_{work} または $R_{\text{free}} = \sum_{hkl} |F_{\text{obs}}| - k|F_{\text{calc}}| / \sum_{hkl} |F_{\text{obs}}|$ (R_{work} は精密化に利用した回折強度データ(全体の95%)を用いて計算した値, R_{free} は精密化に利用しない残りの5%を用いて計算した値)

くいという問題もあった。それでも、限られた数の結晶を使って極低温(90 K)での回折実験条件を決定し、2.4 Å分解能で回折データも収集できたので(表1の三方晶)、その結晶化条件を使って構造決定を目指すことにした。

まず試したことはセレノメチオニン置換タンパク質の調製である。1個でも良好な結晶が出さえすれば、異常分散効果を利用して構造決定ができる可能性があるからである。しかし、この目論見は失敗した。セレノメチオニン置換タンパク質の結晶が得られなかったからである。そこで、通常のPタンパク質を使つての同形置換法による構造決定を目指し、重原子誘導体の検索を始めた。同形置換法を使う場合には適切な重原子の種類、濃度、結晶の浸漬時間などが見つかるまで、通常は大量の結晶を必要とする。この三方晶の場合には、わずか10個程度の結晶で構造決定を目指すに等しく、結局この試みは失敗に終わった。

そのころ、筆者は打開策となりそうな論文の存在に気づいた。緩衝溶液に用いているTrisがPLP酵素を失活させる様子を捉えた三者複合体(酵素・PLP・Tris)の立体

図2 TrisによるPLP酵素の不活性化. (Inactivation of PLP-enzymes caused by Tris.) (a) 分岐鎖アミノ酸アミノ基転移酵素.¹²⁾ (b) Pタンパク質.

構造である¹²⁾(図2a)。以前精製時にPタンパク質の活性を測定した限りではTrisの影響はないと判断していたが、結晶化のための1カ月の静置時に同様のことがPタンパク質で進行している恐れも否定できない。そこで、Trisを使わず精製した標品を用い結晶化を行った。ところがTrisをいっさい含まない条件では、まったく結晶が出なくなってしまった。逆に、Tris濃度を上昇させて、素早く均一に(失活型ということになるが)してはどうかと考え実行したが、どうやら結晶化条件としてのTris濃度には上限があるらしく、この試みも失敗に終わった。そこで方針を大転換し、考え得るすべての条件を検討し直すことで、最終的には再現性が良く、より高分解能の回折を与える斜方晶を得ることができた(表1)。奏功した打開策としては、次の3点が挙げられる。(1) Trisを含まない条件で精製・結晶化。(2) 精製法の改良(微妙な構造の差をもつ分子種(クロマトグラフィーでの溶出位置がわずかに異なる)の存在に気づき、厳密に片方だけ分取するようにした)。(3) 市販スクリーンキットの増加により新しい結晶化条件を検索。

この斜方晶を用いて構造決定した後、分子置換法で三方晶についても構造解析を行ったところ、三方晶に含まれるPタンパク質は補酵素PLPを失ってアポ酵素になっていることが明らかになった。Pタンパク質の場合は前例¹²⁾とは異なり、Trisにより Schiff塩基の交換が起こり(図2b)、生じたPLP-Trisが酵素タンパク質から脱落していったと考えられる。結晶化ドロップ内でこの反応が緩やかに進行し、アポ酵素の存在率が優勢になったところで、アポ酵素の結晶が出始めたと考えれば、核形成に時間を要し種結晶が有効ではなかった理由をうまく説明できる。また後述するように、PLPの有無によりPタンパク質が大きく構造変化することも、この説明を支持する。

4.3 構造決定

構造決定はメチル水銀誘導体結晶を用いて、異常分散効

図3 Pタンパク質の活性部位の構造. (Structure of the active-site pocket of P-protein with electron density map around PLP.) (a) ステレオ図. PLP 付近の電子密度図も示した. (b) グリシンとの反応中間体 (モデル構造) の模式図.

果を利用した単一重原子同相置換法 (SIRAS 法) により行った. 非対称単位に4組の $\alpha\beta$ 二量体が存在することを利用して, 分子平均化法を組み合わせた位相の改良を行ったところ, 良好な電子密度図を得ることができた. プログラム RESOLVE¹³⁾ の分子モデル自動構築機能により, 非対称単位 3648 残基のうち主鎖の 79 %, 側鎖の 62 % を自動構築することができた. 最終的には, 末端の2残基を除く 3640 アミノ酸残基, 4 個の PLP, 2145 個の水分子からなる構造モデルの精密化を行い, 2.1 Å 分解能のホロ酵素の構造を得た (表1). 精密化終了後の PLP 付近の電子密度図を図3に示す. また, ホロ酵素を分子置換法の検索モデルに用いて, アボ酵素の構造を決定し, 2.4 Å 分解能の構造を得た (表1).

5. Pタンパク質の全体構造および分子進化

Pタンパク質は, 2組の $\alpha\beta$ 二量体が二回軸により関係付けられた $\alpha_2\beta_2$ 四量体の構造をもつ (図4a). $\alpha_2\beta_2$ 四量体から密接な側の $\alpha\beta$ 二量体を取り出すと, 構造の似た α および β サブユニットが疑似の二回軸により関係づけられていることがわかる (図4b). Pタンパク質の α 鎖および β 鎖のアミノ酸配列に類縁関係がある (一致度は24 %) ため, 両サブユニットの立体構造も類似していることは特に不思議ではない. サブユニット同士は, 広い会合面 (17,200 Å²) で接しており, その大半 (64 %) が疎水的であることから, 片方のサブユニット単独で存在した場合には溶解度が低いことが想像できる. これが, Pタンパク質の可溶性発現のために共発現が必須であった理由であろう.

Pタンパク質は PLP 酵素の I 型の系統に分類されている.⁷⁾ これまで構造の知られた62個のI型は, すべて α_2 二量体を基本単位にもっていたが (図4c, d), Pタンパク質は $\alpha\beta$ 二量体を基本単位とするという特異な構造をもつ (図4a, b). I型の立体構造の特徴は, 基本単位とする α_2 二量体が分子内二回軸をもち, α - α 境界面に2個の活性部位 (図4dのPLP分子に対応) をもつことである. 対照的

図4 Pタンパク質 (上) およびグルタミン酸脱炭酸酵素 (下) の立体構造. (Crystal structures of P-protein (upper) and glutamate decarboxylase (lower).) Pタンパク質の $\alpha_2\beta_2$ 四量体 (a) および $\alpha\beta$ 二量体 (b). グルタミン酸脱炭酸酵素¹⁶⁾の α_6 六量体 (c) および α_2 二量体 (d). PLPの位置を○で示した.

に, Pタンパク質は α_2 二量体の代わりに $\alpha\beta$ 二量体を基本単位とする (図4b). 各 $\alpha\beta$ 二量体は同様に α - β 境界面に活性部位をもつが, 1個しかもたないのがほかのI型と大きく異なる点である. $\alpha\beta$ 二量体は擬似的な分子内二回軸により関係づけられているので (図4b), 二量体単位と比較すると α_2 二量体とよく似ている (図4d).

分子進化の過程では, 原始Pタンパク質の α 鎖または β 鎖が, 原始I型PLP酵素 (α_2 二量体) の遺伝子重複により発生したと考えられる. その後, 原始Pタンパク質は多酵素複合体の一成分として最も都合よい構造に至るように, 進化していったのだろう. その過程では, 新たな機能の獲得と引き替えに, 二量体の片方の活性部位を失ってしまったと考えられる.

6. Pタンパク質の補酵素および基質の結合

アポ酵素にPLPが結合すると、Pタンパク質はオープン型から閉鎖型に構造変化する(図5)。構造変化部分は2つの領域に分けられる。一方の α -ヘリックス10を含むループは、折り畳みの変化を伴い、移動距離は最も長い場所では13.5 Åに達する。もう一方は、3本の α -ヘリックスと3本

図5 補酵素結合時の構造変化(ステレオ図)。(Conformational changes upon binding of the cofactor PLP (stereoview).)

図6 リポアミド結合トンネルおよびその入り口周辺の分子表面の性質。(Lipoamide-binding channel and the molecular surface properties neighboring its entrance.)

の β -ストランドからなるサブドメインであり、この部分はほぼ剛体として4°回転し、活性部位を閉鎖する。PLPはLys704 β とシッフ塩基により共有結合し、ほか多数の非共有結合的相互作用により、活性部位のポケットに結合する(図3a)。また、本稿では詳細は述べないが、グリシンの構造に類似したPタンパク質阻害剤であるアミノオキシ酢酸とホロ酵素との複合体についても構造解析を行い、グリシンの分子認識にかかわる残基も同定した(図3b)。また、活性部位から分子表面まで続くトンネル(Hタンパク質のリポアミド部分が結合する)についても同定できた(図6)。トンネルの入り口の付近の分子表面の残基は、活性部位の残基と同様に、ほかの生物種でもよく保存されている。トンネル付近の分子表面にはよく保存された塩基性残基が多いため、付近の分子表面は主に正電荷をもつ。一方、Pタンパク質に直接会合することが知られるHタンパク質¹⁴⁾のリポアミド周辺は、主に負電荷をもち、ほかの生物種でも同様によく保存されている。¹⁵⁾したがって、図6に示したトンネルの入り口付近の領域がHタンパク質と会合するために用いられると考えられる。

以上の結果により、補酵素PLPや基質(グリシンおよびHタンパク質)の分子認識に関与する機能上重要な残基やその他反応に必要な不可欠なアミノ酸残基を同定できた。それらのアミノ酸残基はほかの生物種でも高度に保存されていることから、今回明らかになったPタンパク質の触媒反応機構は、細菌からヒトまで基本的には生物種を超えて共通であることが示唆される。

7. Pタンパク質の立体構造に基づく高グリシン血症の発症メカニズム

これまで述べてきた解析結果に基づいて作製したヒトのPタンパク質のモデル構造を図7に示す。現在までに高グリシン血症の患者から、Pタンパク質については10種類の点変異と1種類の1残基欠失変異が同定されている。そこ

図7 ヒトPタンパク質のモデル構造(ステレオ図)。(Hyperglycinemia-causing mutations mapped on a stereoview of the model structure of human P-protein.) 高グリシン血症を引き起こす変異の残基番号を示す。

表2 高グリシン血症を引き起こす変異および変異が立体構造に与える影響。(Hyperglycinemia-causing mutations and their effects on the P-protein structure.)

変異の種類	変異が立体構造に与える影響
Ala283→Pro	α-ヘリックスの中央を破壊
Ala313→Pro	β-ストランドの中央を破壊
Pro329→Thr	補酵素PLPの結合を不安定化
Arg410→Lys	不明(<i>Th</i> ではArg410に対応する残基がLysであるため)
Arg515→Ser	α-ヘリックスの双極子を安定化する塩橋を破壊
Ser564→Ile	活性部位を破壊
Pro700→Ala	活性部位を破壊
Phe756→欠失	活性部位を破壊
Gly761→Arg	活性部位を破壊
Gly762→Arg	活性部位を破壊
Ala802→Val	不明(<i>Th</i> とヒトとの間で、局所的に違いが大きい領域に位置するため)

で、各変異が立体構造に与える影響を考察した。フィンランド北部に多いSer564→Ile変異については、Ser564が活性部位に隣接していることがわかった。Ser564は周囲の活性部位残基と密に接しているため、Ileに置き換わると活性部位の構造が壊れると考えられる。次の例として、ほかの地域で発見されたPro329→Thr変異について述べる。Pro329は全生物種で保存されている。ホロ酵素およびアポ酵素の構造解析により、Gly328-Pro329間のペプチドがPLP結合時の構造変化に伴い、トランス型からシス型に異性化することが判明した。そのためPro329の変異は補酵素の結合に悪影響を与えることが示唆される。同様に、大部分の疾患関連変異について、このモデル構造を用いることにより、各変異がどのようなメカニズムで酵素活性を損なわせ、その結果として高グリシン血症を発症させるかを、立体構造に基づいて説明することができた(表2)。

8. おわりに

今回の結果により、Pタンパク質の触媒反応機構とPタンパク質が機能を発揮するうえで重要な領域が原子レベルで明らかになり、それらが細菌からヒトまで生物種を超えて共通であることを解明できた。さらに、高グリシン血症の発症メカニズムを、立体構造に基づいて説明することに成功した。この構造情報は本疾患を原子レベルで理解するための大きな手掛かりとなり、今後も蓄積されていくであろう変異情報に対しても、それを解釈するうえで有用な基礎情報となるはずである。また、今回の結果によりグリシン開裂系の構成成分のすべての構造が揃ったことになる。現在、筆者は構成タンパク質間の複合体の構造解析を目指して、研究に取り組んでいる。

謝 辞

本研究は、理化学研究所基礎科学特別研究員および日本学術振興会特別研究員の研究テーマとして開始し、現在タ

ンパク3000プロジェクトの一環として行われています。研究の遂行にあたり過分のご支援とご配慮をいただきました神谷信夫教授および倉光成紀教授に、深く感謝いたします。本研究は、両教授をはじめ、大阪大学の増井良治博士および中川紀子博士、理化学研究所の真岡伸子氏との共同研究として行われました。また、回折強度データ収集では理研構造生物学ビームラインの担当の方々に協力いただきました。お世話になった皆様に厚くお礼申し上げます。

文 献

- 1) D. W. Crabb, H. J. Edenberg, W. F. Bosron and T. K. Li: *J. Clin. Invest.* **83**, 314 (1989).
- 2) K. Tada and S. Kure: *J. Inherit. Metab. Dis.* **16**, 691 (1993).
- 3) S. Kure, M. Takayanagi, K. Narisawa, K. Tada and J. Leisti: *J. Clin. Invest.* **90**, 160 (1992).
- 4) R. Douce, J. Bourguignon, M. Neuburger and F. Rebeille: *Trends Plant. Sci.* **6**, 167 (2001).
- 5) D. J. Oliver, M. Neuburger, J. Bourguignon and R. Douce: *Plant Physiol.* **94**, 833 (1990).
- 6) T. Nakai, N. Nakagawa, N. Maoka, R. Masui, S. Kuramitsu and N. Kamiya: *EMBO J.* **24**, 1523 (2005).
- 7) N. V. Grishin, M. A. Phillips and E. J. Goldsmith: *Protein Sci.* **4**, 1291 (1995).
- 8) G. C. Ford, G. Eichele and J. N. Jansonius: *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **77**, 2559 (1980).
- 9) 大谷直人, 中川紀子, 寶関 淳, 海老原章郎, 佐藤伸哉, 上利佳弘, 小林慎一郎, 上利和子, 真岡伸子, 増井良治, 三木邦夫, 横山茂之, 倉光成紀: 蛋白質核酸酵素 **47**, 1009 (2002).
- 10) T. Nakai, N. Nakagawa, N. Maoka, R. Masui, S. Kuramitsu and N. Kamiya: *J. Mol. Biol.* **337**, 1011 (2004).
- 11) T. Nakai, N. Nakagawa, N. Maoka, R. Masui, S. Kuramitsu and N. Kamiya: *Acta Crystallogr D* **59**, 554 (2003).
- 12) N. Yennawar, J. Dunbar, M. Conway, S. Hutson and G. Farber: *Acta Crystallogr D* **57**, 506 (2001).
- 13) T. C. Terwilliger: *Acta Crystallogr D* **58**, 1937 (2002).
- 14) M. Neuburger, A. M. Polidori, E. Pietre, M. Faure, A. Jourdain, J. Bourguignon, B. Pucci and R. Douce: *Eur. J. Biochem.* **267**, 2882 (2000).
- 15) T. Nakai, J. Ishijima, R. Masui, S. Kuramitsu and N. Kamiya: *Acta Crystallogr D* **59**, 1610 (2003).
- 16) G. Capitani, D. De Biase, C. Aurizi, H. Gut, F. Bossa and M. G. Grutter: *EMBO J.* **22**, 4027 (2003).

プロフィール

中井忠志 Tadashi NAKAI
理化学研究所 播磨研究所 放射光科学総合研究センター 先端タンパク質結晶学研究グループ
Advanced Protein Crystallography Research Group, RIKEN SPring-8 Center, Harima Institute
〒679-5148 兵庫県佐用郡佐用町光都1-1-1
1-1-1 Kouto, Sayo, Hyogo 679-5148, Japan
e-mail: nakaix@spring8.or.jp
最終学歴：2000年3月大阪市立大学大学院理学研究科後期博士課程化学専攻修了
専門分野：構造生物学
現在の研究テーマ：多酵素系を構成するタンパク質およびそれらの複合体のX線結晶構造解析
趣味：Webサイトの運営 (www.nakaix.com)