

2C1645

ジヒドロ葉酸還元酵素変異体の X 線構造解析

○片柳 克夫、紙谷 康則、佐藤 健大、大前 英司、月向 邦彦 (広島大・院理)

蛋白質の構造・機能相関を考える上で、立体構造のどの部分に柔軟性(揺らぎ)があるかを考えることは重要である。我々は蛋白質のループ部の柔軟性が構造機能相関に及ぼす影響を調べるため、大腸菌ジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)変異体の X 線解析を行い、ループ上のアミノ酸置換が立体構造に及ぼす影響を具体的に調べている。ループ部分として活性部位から遠くかつ温度因子の大きな Gly67, Gly121に着目してこれらの変異体の結晶構造解析を行ってきた。

すでに DHFR の Gly67 を V. A. L. D. S に、また Gly121 を V. A. S に置換した変異体については報告したが今回新たに G67C, G67T, G121H, G121F の X 線解析を行った。これらの変異体はすべて大腸菌で大量発現させた後に精製し、葉酸との複合体を形成した状態で結晶化させた。結晶は 67 位変異体, 121 位変異体すべて同形(空間群 P6₁, a=93 Å, c=74 Å 付近)であり、分子置換法と XPLOR による結晶学的精密化を行った。G121A 以外はすべて 2.1 Å 分解能以上の回折点を得ており R 因子は 20% 以下に収束している。回折データは PF や SPring8 で収集したものをを用いている。

われわれはすでにこれらの変異体について断熱圧縮率の測定を行っている。上記の X 線解析で得た立体構造をもとに 0.8 Å のプローブを用いて分子内部のキャビティの分布を求めた結果、野生型と各変異体ではその分布の違いが分子全体に及んでいることが解った。また各変異体に対してキャビティ体積の総和と断熱圧縮率の関係を調べたところ明らかな相関関係が得られている。従って 1 個のアミノ酸置換が揺らぎという形で分子全体に影響を及ぼしていることが示唆された。これは二重変異体に加成性がないことから示される遠距離相互作用の存在とも一致する結果である。

K.Katayanagi, Y.Kamiya, T.Sato, E.Ohmae and K.Gekko : Crystal structure of dihydrofolate reductase mutants.

2C1715

ヘム代謝系酵素ビリベルジンリダクターゼの構造

○菊地 晶裕¹、朴 三用¹、宮武 秀行¹、城 宜嗣¹、孫 丹宇²、佐藤 道比古²、吉田 匡² (¹播磨理研、²山形大・医)

<目的>

哺乳類に存在するヘムは、ヘムオキシゲナーゼによりビリベルジンに開環され、次いで、ビリベルジンリダクターゼ(BVR)により、ビリベルジンに還元されることにより代謝される。

第 2 段階の還元過程で関与する BVR に関しては、精製法や生化学的な特性・また、医学的な重要性はよく知られているものの、基質であるビリベルジンや NADH などの cofactor の結合部位や電子伝達経路など、BVR の触媒機構そのものに関する研究はあまり進んでいない。詳細な触媒機構を理解するには、構造生物学的観点から研究することが不可欠である。本研究では、BVR の結晶構造を明らかにし、その触媒機構の詳細を明らかにすることを目的とした。

<結果>

大腸菌により発現させたラットの BVR を精製し、結晶化条件の検索を行った。沈殿剤として硫酸アンモニウムを用いた条件から、結晶構造解析に適した良質な単結晶を得ることに成功した。得られた単結晶の X 線回折データを放射光施設 SPring-8 の理研ビームライン BL44B2 において収集した。イリジウム誘導体結晶を用いた多波長異常分散法により位相計算を行ったところ、解釈可能な電子密度マップを得ることに成功した。

本発表では、ビリベルジンリダクターゼの立体構造を基に、基質や NADH などの cofactor の結合部位に関して議論を行う。

A.Kikuchi, S.-Y. Park, H. Miyatake, Y. Shiro, D. Sun, M. Sato, T. Yoshida : Structure of Biliverdin Reductase

2C1700

グルタチオン非依存型ホルムアルデヒド脱水素酵素の結晶構造解析

○田中 信忠¹、日下部 吉男¹、伊藤 潔²、中村 和郎¹ (¹昭和 大・薬、²長崎大・薬)

【目的】*Pseudomonas putida* 由来のホルムアルデヒド脱水素酵素(PFDH)は、各サブユニットが 399 アミノ酸残基からなるホモ 4 量体蛋白質であり、NAD⁺を補酵素とし、中鎖型亜鉛含有アルコール脱水素酵素ファミリーに属することが明らかにされている。一般に広く存在する FDH は反応にグルタチオンを必要とするのに対し、本酵素は反応にグルタチオンを必要とせず、アルデヒドの酸化と還元を触媒する特徴的な酵素である。本酵素の反応機構解明のためには立体構造が不可欠であるため、結晶化および回折強度データの収集を行った。

【結果】ハンギングドロップ蒸気平衡拡散法により、空間群 P3₁12、格子定数 a=b=87.5 Å, c=191 Å の結晶を得ることに成功した(2subunits/asym.)。常温における X 線回折実験では、結晶の放射線損傷が著しかったが、低温回折実験を行ったところ、実験室系で 2.2 Å 分解能までの回折データを収集できるようになった。多重原子同位置換法による位相決定を目指し、重原子誘導体の探索を行ったが、良好な重原子誘導体が得られなかった。そこで、本酵素は各サブユニットに 2 原子の亜鉛を含んでいるため、亜鉛の異常分散効果を利用した、多波長異常分散法により位相決定を行うことにした。PF BL18B において、低温(100 K)下で、一粒の結晶から亜鉛の吸収端付近の 3 波長分のデータを収集したところ、異常分散差および波長間差パターン図共に、非対称単位中の 4 亜鉛原子に由来する明瞭なピークを確認することができた。低温下、同一の結晶で 3 波長分のデータを収集した(同形性が良い)ことが、比較的弱い異常分散シグナルである(2x2Zn, 2x399aa/asym.)にも関わらず、パターン図上で明瞭なピークを得ることができた理由であると考えられる。現状の電子密度図では、分子の輪郭および 2 次構造の一部が明らかになっている。現在、位相の改良を進めている。

N. Tanaka, Y. Kusakabe, K. Ito and K.T. Nakamura : Crystal structure analysis of a glutathione-independent formaldehyde dehydrogenase

2D1315

カルモデュリンの標的認識における静的構造とキネテックス

○和泉 義信¹、神保 雄次¹、桑本 滋生¹、三保 信之¹、能野 秀典²、柘 弓弦³、木原 裕⁴ (¹山形大・院理工、²札幌大・化学、³京大・化研、⁴関西医大・物理)

本研究では、カルモデュリン(CaM)の標的分子認識機構を放射光小角 X 線散乱(SR-SAXS)を用いて静的構造とキネテックスの両面から解明することを試みた。標的ペプチドとして CaM-kinase IV の CaM 結合部位シーケンス(CaMK4P: RRKLKAAVKAVVASSRLGS)を用いた。SR-SAXS 測定は KEK の酵素回折計を用いて行った。標的ペプチド非存在下における CaM の回転半径(Rg)は Ca²⁺ 濃度の増加に伴い僅かに増加し(21.2 Å → 21.5 Å)、その変化は [Ca²⁺]/[CaM]=2 ではほぼ一定となった。これに対し、等モルの標的ペプチド存在下における CaM の Rg は Ca²⁺ 濃度の増加に伴い著しく減少し(22.2 Å → 18.1 Å)、その変化は [Ca²⁺]/[CaM]=4 で一定となった。滴定曲線、Rg など SR-SAXS から得られる構造情報に基づいて CaM/CaMK4P 複合体は 1-5-8-14 モチーフと結論できる。さらに、2Ca²⁺/CaM と 2Ca²⁺/CaM/peptide 複合体の溶液構造はそれぞれ対応するアポ構造と Ca²⁺ 飽和構造の混合物としては表されることが明かとなった。0Ca²⁺/CaM/peptide 複合体の溶液構造はペプチド無しの溶液構造と明らかに異なることが示された。このことから、Ca²⁺ キレート剤で誘起される解離過程の最終構造にはペプチドが結合していることが示唆された。ストップフロー(SF)-SR-SAXS 測定から、4Ca²⁺/CaM/peptide 複合体の Ca²⁺ キレート剤で誘起される解離過程は biphasic kinetics であることが明かとなった。即ち、N ロブの Ca²⁺ が最初に解離し、ついで C ロブの Ca²⁺ が解離する。後者の過程が現在の装置で観測される最初の過程で、その後、さらに活性化された状態を経て、最終的に 0Ca²⁺/CaM/peptide の静的構造に至ると考えられる。他方、4Ca²⁺/CaM と peptide との会合過程は 25nsec 以下で終了すると考えられ、より短時間で SF-SR-SAXS 測定が望まれる。

Y. Izumi, Y. Jinbo, S. Kuwamoto, N. Miho, H. Yoshino, Y. Hiragi and H. Kihara : Static and kinetic SR-SAXS studies of target recognition by calmodulin