

## 1P06

ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼの X 線結晶構造解析

○松村浩由, 永田隆博, 寺田美香, 井上 豪, 長柄佳孝, 吉永侃夫<sup>1</sup>, 泉井 桂<sup>2</sup>, 甲斐 泰 阪大・院・工,<sup>1</sup>京大・医,<sup>2</sup>京大・農

ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ(PEPC)は、C4植物やCAM植物において空気中の二酸化炭素を炭酸水素イオンの形で最初に固定化する酵素で、分子量約 100,000 Da の同一のサブユニット 4 つから成る複合体分子である。化石燃料の消費による大気中の二酸化炭素量増加が指摘されている現在、PEPC の三次元立体構造を解明することは、炭酸固定機構を研究する上で非常に意義深い。本酵素の構造解析は、X 線結晶構造解析法を用いて行った。回折強度データの測定は、筑波高エネルギー物理学研究所の放射光を用いて行い、初期位相は、重原子多重同位置換(MIR)法により得た。その後、溶媒平滑化による電子密度の改良を試みた。その結果、PEPC の三次元立体構造を世界で初めて明らかにすることに成功した。得られた構造から、8本の $\alpha$ ヘリックスと8本の $\beta$ ストランドからなる $\alpha/\beta$ パレル構造モチーフを有していることが確認できた。また、PEPC のアロステリック制御機構も明らかとなった。PEPC の一次構造上で保存されているGRGGの繰り返し(GRGGSIGRGG)は、PEPC 以外では見られない非常にユニークな配列である。そして、この領域はグリシン残基が多く含まれているため flexible であると考えられ、site-directed mutagenesis などの研究から、この領域のアルギニン残基が活性に必須であることが指摘されてきた。今回、これに相当するループが $\alpha/\beta$ パレルの $\beta$ ストランドの C 末端に存在していることが確認できた。そして、阻害剤である L-Asp の周りの配位構造を調べた結果、主に R587、K773、R832 といった塩基性残基に結合していることが見出された。その配位部位は、活性部位と考えられる $\alpha/\beta$ パレルの $\beta$ ストランドの C 末端付近から 15 Å ほど離れた位置に存在している。R587 は GRGG の繰り返しの構成単位の一つであり、これが L-Asp に配位することによりこの領域全体が活性部位から遠ざかり、結果として、活性が阻害されていると予想される。現在、更に詳細な構造情報を得るために、モデルの精密化を行っている。

H. Matsumura, T. Nagata, M. Terada, T. Inoue, Y. Nagara, T. Yoshinaga, K. Izui, Y. Kai: X-ray crystal structure of phosphoenolpyruvate carboxylase

## 1P08

*Paracoccus denitrificans* 由来 chaperonin60 の結晶構造解析

○深海隆明, 養王田正文<sup>1</sup>, 吉田賢右<sup>2</sup>, 三木邦夫  
京大・院理, <sup>1</sup>理研, <sup>2</sup>東工大・資源研

シャペロニン、タンパク質分子がその正しい立体構造をとるように、ポリペプチド鎖の折れたたみを補助するタンパク質である。我々は、土壌細菌 *Paracoccus denitrificans* 由来のシャペロニン (p.cpn60) について、X 線結晶構造解析を行っている。バクテリア由来のシャペロニンは、7 量体のリングが二層になった構造を取っているが、p.cpn60 はこれに加えて単層のリングでも存在していることが観察されている。

p.cpn60 の結晶は、空間群  $P4_32_1$ 、格子定数  $a = b = 286 \text{ \AA}$ ,  $c = 153 \text{ \AA}$  であり、7 量体のリングが非対称単位中に一つ存在する。放射光を用いて 3.5 Å までの回折データを測定し、このデータに対して、大腸菌由来のシャペロニン GroEL をサーチモデルとした分子置換法を適用したところ、妥当な初期モデルが得られた。p.cpn60 のアミノ酸配列を決定したところ、GroEL との相同性は 62.9% であり、C 末端が 6 残基短い。また、上下のリング間の相互作用に関与している部分のループ付近に 1 残基の挿入が見られる。初期モデルに基づいて計算した電子密度図に対して 7 量体分子の NCS を利用した平均化を行い、改良された電子密度図に対してモデル分子の残基置換を行った。

現在、3.5 Å 分解能でモデル分子の精密化作業を進めている。精密化作業は、単量体分子と各分子間の NCS 行列を対象として行っており、X-PLOR の torsion angle restraints を利用している。GroEL 分子と比べると、二次構造はほとんど保存されており、ドメイン内部の構造はよく似ている。しかし、全体的に見るとアピカルドメインが少し外側にずれ、リング上部が膨らんでいる。

T. A. Fukami, M. Yohcia, M. Yoshida, K. Miki: Crystal structure analysis of chaperonin60 from *Paracoccusdenitrificans*

## 1P07

プロテアソーム活性化因子 PA28 の精製と結晶化

○富杉佳計<sup>1</sup>, 鳴海有剛<sup>1</sup>, 森本幸生<sup>1,2</sup>, 柴田直樹<sup>1</sup>, 棚橋伸行<sup>1,2</sup>, 田中啓二<sup>1,2</sup>, 安岡則武<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>施工大・理,<sup>2</sup>臨床研,<sup>3</sup>CREST-JST

プロテアソームは通常不活性化状態で細胞内に存在しており、その両端に制御ユニットがエネルギー依存的に結合することにより活性化状態となる。こうして、活性化状態となったプロテアソームは多機能性酵素として多くの生命現象に関与している。これまではプロテアソームの制御ユニットとして 25~110 KDa (沈降係数 19~22 S) の不均一なサブユニット群から構成された U 字型の制御ユニットが知られていたが、最近になって U 字型とは異なった制御ユニットの存在が明らかになった。この分子は分子量が 28 KDa のサブユニット群から構成されているため PA28 と呼ばれている。PA28/プロテアソーム複合体は、未変性の蛋白質にはほとんど作用しないが、小さなポリペプチドの分解活性を非常に強く促進する。このこと、PA28 が IFN $\gamma$  に強く応答することから、この複合体はポリペプチドを抗原ペプチドに分解していると推測されている。この PA28 の立体構造を明らかにするために、回折実験に用いることの出来る結晶を得るための精製を行っている。

ウシの肝臓をホモジネートし、遠心分離を行う。こうして得られた粗抽出液を、Q-セファロースに吸着させ、得られた溶出液のうち PA28 の活性をしめす部分をプールし透析を行い、ヘパリンにかける。その後ゲル濾過を行い、ヒドロキシアパタイトを行う。しかし、Q-セファロース終了時に夾雑蛋白も含め蛋白量が非常に多く、その後のヘパリンカラムを困難にした。そこで、硫酸分画と PEG 分画を試みた。その結果、硫酸分画では電気泳動で PA28 相当のバンドが確認でき、失活していないことがわかった。このようにして精製を行った結果、ヒドロキシアパタイトを終了した時点で牛肝臓 1 K g から 25 m g の PA28 が得られた。今後精製の純度を上げ結晶化スクリーニングを行っていく予定である。

Y. Tomisugi, Y. Narumi, N. Shibata, Y. Morimoto, N. Tanahashi, K. Tanaka, N. Yasuoka: Purification and crystallization of Proteasome activator

## 1P09

ピログルタミルペプチダーゼによるピログルタミル基の認識機構

小田垣 良彦, ○広津 建, 芳本 忠<sup>1</sup>, J. Clardy<sup>2</sup>  
大阪市大・理, <sup>1</sup>長崎大・薬, <sup>2</sup>コーネル大・化

生理活性ペプチドホルモンのなかで N 末端にピログルタミン酸 (pGlu) を有するものがいくつか知られている。例えば甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン (TRH) もそのひとつである。このホルモンは pGlu-His-Pro-NH<sub>2</sub> の構造をもつトリペプチドである。生理作用としては、下垂体前葉からの甲状腺刺激ホルモンの分泌を促進する。また TRH は免疫系に関わっており、小腸内の細胞に TRH が作用し T-Cell のリンパ球の一種の増殖を引き起こされる。私たちはペプチドホルモンの N 末端に存在する特異なアミノ酸残基である pGlu がどのように酵素やレセプターに認識されるのかということに興味を持ち、N 末端の pGlu を遊離するエキソプロテアーゼである *Bacillus amyloliquefaciens* 由来のピログルタミルペプチダーゼ (PGP-1) の X 線結晶構造解析を行った。PGP-1 と 1 次構造の相同性を持つ蛋白質の構造解析は今まで報告されておらず、そのため水銀誘導体 (PCMB) を用いて SIR+AS で位相決定を行った。解析には主にプログラム PHASES と X-PLOR を用いた (R-19.5%, FreeR=26.2%)。今回解析した PGP-1 は分子量約 23 KDa のシステインプロテアーゼであり、結晶中では非結晶学的 222 の対称を持つ 4 量体構造をとっている。単量体は  $\alpha/\beta$  構造を中心としており、1 次構造の相同性は全くないにもかかわらず、folding は subtilisin などと似ている。この PGP-1 には単量体当たり 2 個のシステインがあるが、Cys144 が活性残基であることが芳本等によって報告されている。活性部位には Cys144-His168-Glu81 からなる Catalytic triad がある。また活性部位のすぐ近くに pGlu が認識されると思われる疎水孔 (S1 pocket) が存在する。今回この疎水孔がどのように pGlu を認識するかを調べるために、PGP-1 と TRH との複合体モデルをプログラム QUANTA を用いて作成した。その結果 pGlu は F13 と Q71 のメチレン鎖に挟まれる様にして認識されていること等がわかった。

Y. Odagaki, K. Hirotsu, T. Yoshimoto, J. Clardy: Recognition mechanism of pyroglutamyl residue by pyroglutamyl peptidase