

1P02

ニワトリ卵白リゾチームの中性子結晶構造解析

○田中伊知朗,峯崎義章,唐澤裕子,新村信雄¹原研先端基礎センター,¹原研先端基礎センター (東北大・理)

生体物質やその水和水に含まれる水素原子は、さまざまな形で生体内の機能に関与しているが、実験的に観測する手法が限られているのが現状である。その水素位置を同定することを目的に、世界的にトップクラスの強度を持つ日本原子力研究所 JRR-3M 原子炉に、2 次元検出器を装備した本格的回折計を日本で初めて建設 (生体高分子結晶構造解析用中性子回折計 (BIX-I)) し、リゾチーム蛋白質 (Tetragonal, a=b=79.1 Å, c=37.9 Å, Z=8, 結晶体積約 30mm³) の 2.1 Å 分解能までの回折データの収集を約 50 日で完了したことは昨年の年会で述べた。

その後、高次反射の指数付けや各フレーム間での積分強度のスケールリングなどに問題が生じて、解析が進んでいなかった。これらの問題の解決に際し、最近、東工大の大橋グループとの共同研究で、ビリジン-コバルト錯体 (Monoclinic, a=16.02 Å, b=12.62 Å, c=9.63 Å, Z=4, 分子量約 420) のデータ収集 (結晶体積約 7mm³, 23 日間で 0.9 Å 分解能までの独立反射数は 1578 個) を行い、結晶構造解析 (R-factor は 0.18, 水素位置は全て決まる) に成功した。

この錯体のデータを使って、データ処理ソフトを改良し、ピークのゴーストやスプリット、積分強度計算時のフレーム間のスケールリング不良などを最小限に抑え、ニワトリ卵白リゾチームの指数、強度データに関する問題点を解決する確証が得られた。現在、この改良ソフトを用いてリゾチームのデータ処理を再開した。

I.Tanaka, Y.Minezaki, Y.Karasawa, N.Niimura: Neutron crystallography of hen-egg-white lysozyme

1P04

ビタミン B₁₂ を補酵素とするジオールデヒドラーゼの構造

○安岡則武,増田 純,樋口佳則,山口徹也,柴田直樹,森本幸生,

樋口芳樹¹ (姫路工大,¹京大院理)

本研究の目的は自然界には他に類例を見ないコバルト-炭素 σ 結合を含むビタミン B₁₂ のコバルト-炭素 結合を可逆的に開裂,再生する機構にビタミン B₁₂ 酵素がいかに関与するかに関して構造的な基礎的知見を得ることである。ビタミン B₁₂ 酵素には,アデノシル B₁₂ とメチル B₁₂ の二つの補酵素型が存在し,前者は水素移動を伴う 11 種類の酵素反応に,後者はメチオニンシンターゼのようにメチル基移動を伴う酵素反応にそれぞれ補酵素として関与している。本研究では,前者に属するジオールデヒドラーゼを対象とし,その結晶化と X 線解析による構造研究を行い,補酵素機能発現の本質である アポ酵素が補酵素の Co-C 結合を活性化する機構を分子レベルで解明することを目的とする。

最近に結晶化された膜タンパク質の結晶化条件を探索したところ, n-octyl-β-D-glucoside が大半を占めていた。ついで Lauryl dimethylamine oxide, n-Lauryl-β-D-maltoside, n-Dodecyl-β-D-maltoside が使用されていた。よって,これまでに結晶化が成功した膜タンパク質ではオクタシルグルコシドや LDAO のように,親水性の頭と疎水性のしっぽをもった,おたまじゃくしのような形をした界面活性剤が使われていることがわかった。また,これらの界面活性剤の共通点はミセルサイズが比較的小さく,タンパクに対する変性作用がほとんどないことであった。以上のことをふまえてつぎの界面活性剤を選択して結晶化実験を行った。OTG : n-octyl-β-D-thioglucoiside, OG : n-octyl-β-D-glucoside, SMC : Sucrose Monocapratoe, LDAO : Lauryldimethylamine oxide, DM : n-Dodecyl-β-D-maltoside. 各種の条件のなかで LDAO を用いたばあいに良好な結果を得たので,さらに実験条件を精密化したところ,つぎの条件で板状結晶及び柱状結晶が得られた。この結晶を用いて高エネルギー放射光実験施設において回折実験を行った。高分解能の反射は認められていないが以下のように結晶データを求めることが出来た。crystal system : monoclinic; a = 446.6 Å, b = 73.20 Å, c = 196.2, beta = 91.60 degree. X 線回折に適当な結晶を得るべくさらに実験を行っている。

N.Yasuoka: Crystallographic Study of Diol Dehydrase

1P03

CGTaseY100L 変異体と阻害剤との複合体の構造

○原田一明,石井則行,羽賀敬子¹,坂元 理¹,山根国男¹工技院・生命研,¹筑波大・生物科学

CGTase (Cyclodextrin glucanotransferase) はデンプンを分解して環状オリゴ糖を合成する酵素である。我々は酵素機能の解明を目的として、活性部位の種々のアミノ酸を置換し、その構造と機能を調べてきた。CGTase は活性部位の溝に幾つかの芳香族アミノ酸を有しており、それらの側鎖は基質の結合に重要な役割を担っていると考えられている。我々は、先に 2 個の Phe を Leu で置換した F183L/F259L と阻害剤であるアカボースとの複合体の構造解析を行い、これらの Phe の役割について検討した。ここでは、活性基の近くに存在する Tyr100 の機能を調べるために Leu で置換した変異体タンパク質とアカボースとの複合体の結晶を製作し構造解析を行った。

CGTase の構造に関しては Y100L と野性型とは大きな違いは見られなかった。また、Tyr100 が Leu に変わったことによる活性部位の構造への影響はほとんど無かったが、アカボースの結合様式は大きく変わっていた。野性型の複合体と比較すると、アカボース分子は、そのコンホメーションが変わっているだけでなく、結合の場所が活性部位の外側にずれており、やや浅く結合している。野性型の複合体では、Tyr100 のベンゼン環と糖のピラノース環が平行でありスタックした状態になっているが、Leu100 の側鎖は形状が違っており糖とスタックできないため糖が浮き上がった状態になったものと考えられる。その結果、活性基である Glu257 と糖のグリコシド結合との距離が広がっている。Y100L 変異体は野性型に比べるとほとんど活性が失われているが、以上の結果から、主として基質が正常な位置に結合できないことによるものと考えられる。

K.Harata, N.Ishii, K.Haga, O.Sakamoto, K.Yamane: Structure of CGTaseY100L mutant - inhibitor complex

1P05

高度好熱菌由来メチオニル tRNA 合成酵素の立体構造の特徴

杉浦郁子,宇賀持淑子,○今野美智子,瀧木理¹,横山茂之¹お茶女大院・人間文化,¹東大・理

メチオニル tRNA 合成酵素 (MetRS) は、C 末端に 2 量体形成ドメインを持つ。2 量体形成が、大腸菌由来 Ec-MetRS においては、tRNA のアミノアシル化反応を促進し、高度好熱菌由来 Tt-MetRS においては、ATP の結合を促進することが報告された。C 末端ドメインは、IleRS, ValRS, LueRS においても存在するがその働きは未知である。今回、アミノアシル化反応機構と tRNA 認識機構を明らかにするため、2 量体形成ドメインの欠けた Tt-MetRS (502 アミノ酸残基) の結晶構造を 2.0 Å の分解能、R=0.205 で決定したので報告する。Tt-MetRS は、アミノアシル化反応において Zn²⁺ イオンを必須とする。触媒ドメインを構成するロスマンフォールドの 2 つのユニットの間に 1 個の CP(connective polypeptide) がある。この CP は、2 本の長い逆平行 β ストランドのリボンのアーチ様構造を持ち、ロスマンフォールドの β シートの上下にある 2 本の逆平行 α ヘリックスと 1 本の α ヘリックスがアーチ構造を支える。このアーチ様構造の先端に Zn フィンガー様モチーフ (Cys-X₁-Cys-X₁-Cys-X₂-His) を持ち、3 個のシステインと 1 個のヒスチジンが Zn²⁺ イオンに配位する。触媒ドメインとアンチコドン結合ドメインの間に 40 アミノ酸残基から成る junction サブドメインを形成する。このことは、347-352 番目の ADLADD の並びが、ターンを形成するが α ヘリックスとピッチが異なり、HF と H 1 は繋がった α ヘリックスを作らないことより明らかにされた。この junction サブドメインに類似の構造は、クラス I に属する IleRS, GlnRS, GluRS でも見られる。アミノ酸配列の比較は、ValRS, LueRS, CysRS も同じサブドメインが存在することを示す。アンチコドン結合ドメインは、2 本の長い逆平行 α ヘリックスと短い 3 本の α ヘリックスから成る。これらの α ヘリックスは、主にアルキル鎖を持つアミノ酸の疎水性相互作用により結ばれている。tRNA のアンチコドンの識別に大きく関与すると指摘された Asn354, Arg359, Trp424 は近傍に存在する。

I.Sugiura, Y.Ugaji, M.Konno, O.Nureki, S.Yokoyama: Characteristic structural feature of methionyl-tRNA synthetase from *Thermus thermophilus*