

P21

ウマミオグロビン二量体のNMRによる構造研究

○長尾聡, 雨貝真実, 宇仁武史, 廣田俊
奈良先端大・物質創成

Studies on the structure of horse myoglobin dimer by NMR spectroscopy

○Satoshi Nagao, Makoto Amagai, Takeshi Uni, and Shun Hirota

Graduate School of Materials Science, Nara Institute of Science and Technology, Nara, Japan.

Dimerization of myoglobin (Mb) has been reported, but the structure of dimeric Mb is still unclear. In this study, we investigated the structure of dimeric Mb under various states by NMR spectroscopy. Although most of the signals of the amino acid protons nearby heme were similar between the corresponding CN⁻, deoxy, CO-bound forms of monomeric and dimeric Mbs, significant shifts of Trp14 N_εH and Val17 C_γH₃ signals were observed for the CO-bound complex. These results suggest that the A-helix structure of Mb is perturbed by dimerization, whereas the active site structure is similar between monomeric and dimeric Mbs.

【緒言】

タンパク質はアミノ酸残基の一次配列によって特定の立体構造を形成するが、タンパク質が変性し凝集すると、天然状態とは異なる多量体構造を形成することがある。ミオグロビン(Mb, Fig. 1)は酸素貯蔵を機能とする単量体のヘムタンパク質であるが、ウマ骨格筋由来の Mb は凍結乾燥により二量体を形成する。また、ヘムを取り除いたアポ体の Mb は溶液条件を変えることでアミロイド線維を形成する。Mb の凝集のメカニズムは未解明であり、Mb 二量体の構造や機能についても十分な知見が得られていない。そこで、本研究では、¹H NMR 測定によりウマ Mb の様々な配位状態におけるウマ Mb 二量体の構造を調べた。

【実験】

ウマ骨格筋由来 Mb の粉末を 50 mM リン酸カリウム緩衝液(pH 7.0)に溶解し、FPLC

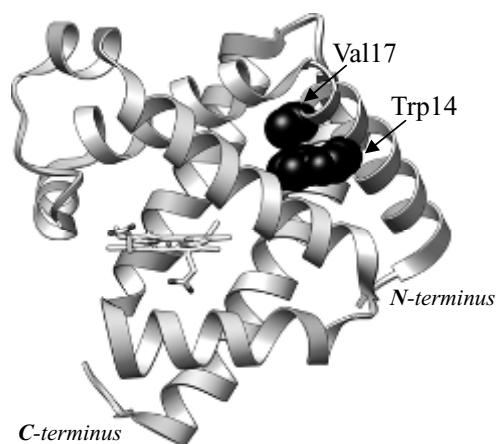


Fig. 1 Structure of horse myoglobin. Heme and amino acid residues (Trp14 and Val17) are represented with stick and space-filling models, respectively.

Myoglobin, Hemoprotein, Oligomer

○ながおさとし, あまがいまこと, うにたけし, ひろたしゅん

を用いたゲルろ過カラムクロマトグラフィーを繰り返すことにより Mb 二量体を精製した。Mb 二量体のメト型、シアノ型、デオキシ型、CO 結合型の試料溶液を調製し、各配位状態における二量体および単量体の NMR スペクトルを測定した。

【結果と考察】

Mb 二量体は 70°C、5 分間の加熱により単量体に解離したが、室温で数時間静置してもほとんど解離しなかった。この結果より、Mb 単量体が非共有結合的に会合して二量体を形成し、室温付近において二量体は安定であることが分かった。

メト型、シアノ型、デオキシ型 Mb の ^1H NMR スペクトルでは、常磁性シフトして観測されたヘム側鎖メチル基やヘム近傍に位置するアミノ酸残基由来のシグナルの化学シフト値は、二量体と単量体で大きな差が見られなかった(Fig. 2)。この結果より、Mb 二量体のヘム近傍の構造は単量体と類似していることが明らかとなった。

次に、CO 結合型 Mb 二量体の ^1H NMR 測定により、ヘム側鎖メチルやヘム近傍のアミノ酸残基のシグナルは他の配位状態と同様に単量体とほぼ一致していたが、Trp14 $\text{N}_\epsilon\text{H}$ と Val17 $\text{C}_\gamma\text{H}_3$ のシグナルは単量体の同シグナルの位置からシフトしていた(Fig. 3)。これらのアミノ酸残基はすべて N 末端に近い A-ヘリックス上に存在していることから、ウマ Mb は二量化するとヘム近傍の構造よりも A-ヘリックスが大きな摂動を受けることが示唆された。

また、すべての配位状態において、Mb 二量体の ^1H NMR シグナルの線幅は、単量体よりも大きくブロードニングして観測された。これは、Mb の二量化に伴う分子量の増大により、Mb 分子の運動性が低下したことに由来すると推測される。

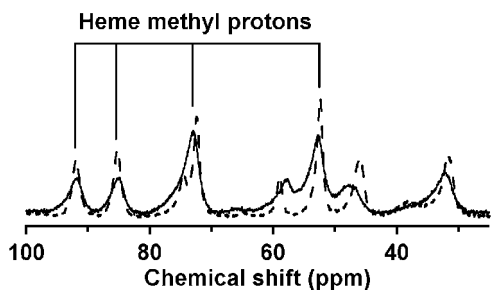


Fig. 2 ^1H NMR spectra of monomeric (broken line) and dimeric (solid line) *met*Mbs.

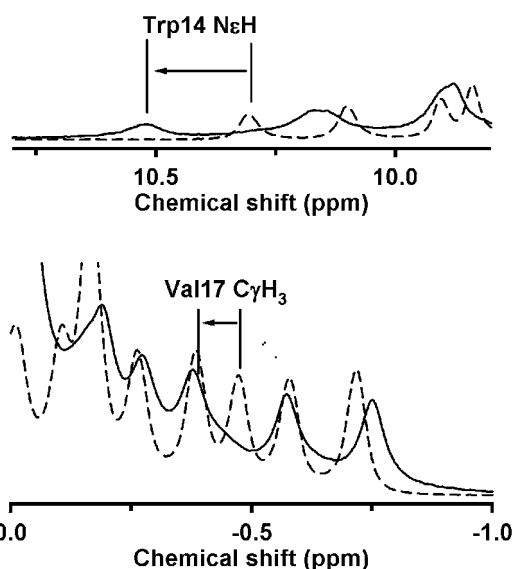


Fig. 3 ^1H signals of Trp14 $\text{N}_\epsilon\text{H}$ and Val17 $\text{C}_\gamma\text{H}_3$ of monomeric (broken line) and dimeric (solid line) CO-bound Mbs.

CO分子を外部配位子とするヘム—四重鎖DNA複合体の構造解析

○齊藤香織¹, 太虎林¹, 長友重紀¹, 三田肇², 山本泰彦¹, 逸見光³
¹筑波大院数物, ²福岡工大工・生命環境, ³農研機構・食総研

Structural characterization of heme-DNA complex possessing CO molecule as an exogenous ligand

○Kaori Saito¹, Hulin Tai¹, Shigenori Nagatomo¹, Yasuhiko Yamamoto¹, and Hikaru Hemmi²
¹Dept. of Chem., Univ. of Tsukuba, ²Dept. of Life, Environ. and Materials Sci., Fukuoka Inst. of Tech., and ³Natl. Food Res. Inst.

A single repeat sequence of the human telomere, d(TTAGGG), has been shown to form all parallel G-quadruplex DNA in the presence of K⁺. We have previously demonstrated that heme, iron(III)-protoporphyrin IX complex, and G-quadruplex DNA assembled from d(TTAGGG) form a stable complex, “heme-DNA complex”. It has been also suggested that, as in the cases of hemoproteins, carbon monoxide (CO) can be bound, as an exogenous ligand, to iron atom of the heme-DNA complex in its reduced state. In this study, we have characterized the solution structure of the CO adduct of the heme-DNA complex using ¹H NMR. Guanine imino protons were ranked as G4 < G5 < G6, in order of increasing shift difference between G-quadruplex DNA and the CO adduct, revealing that heme stacks onto the 3'-terminal G-quartet of G-quadruplex DNA in the CO adduct.

[序論] 四重鎖DNAは、グアニン四量体 (G-カルテット) により形成されるDNAの高次構造の一種である。私共はこれまでの研究において、ヘム (鉄-ポルフィリンIX錯体) がDNA塩基配列d(TTAGGG)により形成される四重鎖に対して特異的に結合し、ヘム-DNA複合体を形成することを報告してきた^{1,2}。さらに、ヘム-DNA複合体における還元型ヘム鉄は周囲の気体分子の種類に応じた様々な配位構造をとることが示唆されており、一酸化炭素 (CO) 雰囲気下ではCO分子がヘムに結合すると考えられている (Fig. 1)³。本研究では、CO分子を外部配位子としてもつヘム-DNA複合体の電子構造および立体構造を¹H NMRにより解析した。

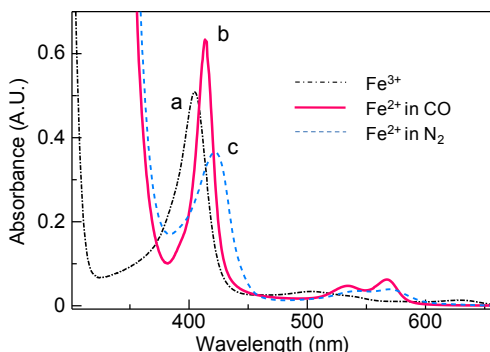


Fig. 1. UV-Vis absorption spectra of heme-DNA complexes with (a) Fe³⁺ (before iron reduction), (b) CO adduct (reduced in CO atmosphere), and (c) Deoxy-form (reduced in N₂ atmosphere).

キーワード：四重鎖DNA, ヘム, 二次元NMR

○さいとうかおり, たいこりん, ながともしげのり, みたはじめ, やまもとやすひこ, へんみひかる

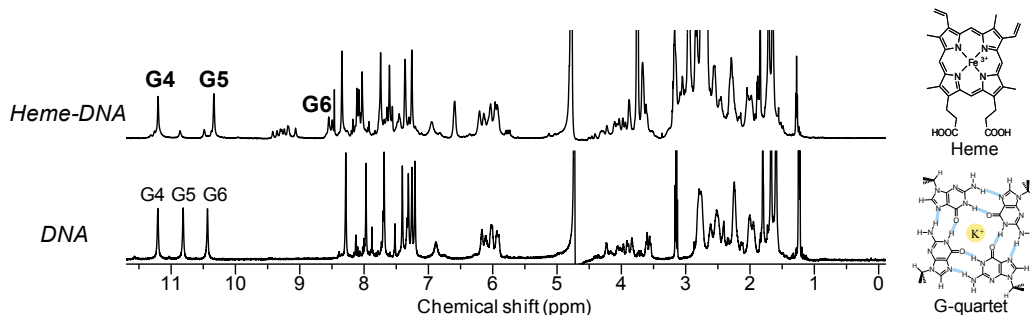


Fig. 2. ^1H NMR spectra of CO adduct of heme-DNA complex (top) and G-quadruplex DNA (bottom) in 90% $\text{H}_2\text{O}/10\%\text{D}_2\text{O}$, at 298K. Heme-DNA complex was reduced by $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, and dithiothreitol was added to maintain the CO adduct throughout the measurements. Signal assignments of guanine imino protons are shown with the spectra.

【結果・考察】 通常の四重鎖 DNA において、 ^1H NMR のシグナルは 0 - 12 ppm に観測される (Fig. 2)。(d(TTAGGG))₄ における DNA 4 分子はすべて等価であり、~10 ppm より低磁場にシフトしたシグナルは、各々の G-カルテット中で水素結合を形成したグアニンのイミノプロトンに由来する。一方、CO 雰囲気下で還元したヘム-DNA 複合体では、イミノプロトンの一つが~8.5 ppm に高磁場シフトして観測された。CO が配位したヘムは鉄二価の低スピン状態で反磁性となるため、不対電子による常磁性シフトは生じない。よってこのシフトは、ヘムのポルフィリン環の環電流効果によるものであると考えられる。

ヘム-DNA 複合体のシグナル帰属は主に NOESY の解析により行った。グアニンのイミノプロトン間では G4-G5-G6 の NOE 相関が確認され、さらに A3 塩基と G4 の NOE 相関から各イミノプロトンシグナルの帰属を得ることができた (Fig. 3)。ヘムと結合していない (d(TTAGGG))₄ と比較して最も高磁場シフトしたイミノプロトンは G6 であり、CO 結合型ヘム-DNA 複合体において、ヘムが DNA の 3' 末端側の G-カルテットにスタッキングしていることが明らかとなった。また、CO 結合型ヘム-DNA 複合体の G6 イミノプロトンシグナルが等強度の 2 本に分裂して観測されることから、ヘムの結合によりシグナルの縮退が解けることが明らかになった。

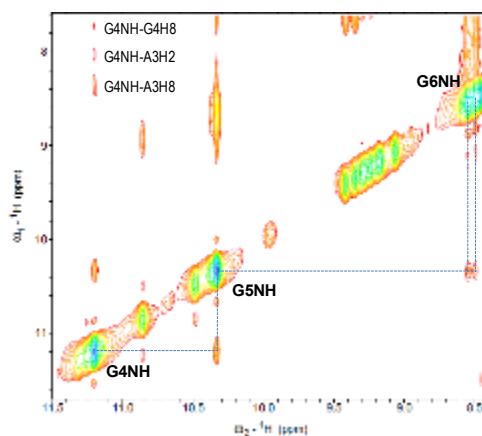


Fig. 3. A portion of NOESY spectrum of CO adduct of heme-DNA complex in 90% $\text{H}_2\text{O}/10\%\text{D}_2\text{O}$, at 298K. A mixing time of 150 ms was used for the measurement.

【結論】 CO 分子を外部配位子としてもつ還元型ヘム-DNA 複合体では、ヘムが DNA の 3' 末端側の G-カルテットにスタッキングして結合していることが明らかとなった。

References

- [1] T. Mikuma *et al.*, *Chem. Commun.*, **2003**, 14, 1708-1709. [2] T. Ohyama *et al.*, *Chem. Lett.*, **2006**, 35, 126-127. [3] K. Saito *et al.*, *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **53**, **2009**, 241-242.

P23

NMRを用いた蛋白質の立体構造解析における非線形サンプリングの有用性の検証

○大西香穂里¹, 重光佳基¹, 土江祐介¹, Daniel Nietlispach²,
三島 正規¹, 池谷 鉄兵¹, 伊藤 隆¹
¹首都大院・理工, ²ケンブリッジ大

Applications of nonlinear sampling scheme to 3D ¹³C or ¹⁵N-separated NOESY experiments

○Kaori Onishi¹, Yoshiki Shigemitsu¹, Yuusuke Tsuchie¹, Daniel Nietlispach², Masaki Mishima¹,
Teppei Ikeya¹ and Yutaka Ito¹
¹Department of Chemistry, Tokyo Metropolitan University
²Department of Biochemistry, University of Cambridge

Nonlinear sampling for indirectly acquired dimensions in combination with maximum entropy (MaxEnt) processing has been shown to provide significant time saving in the measurement of multidimensional NMR experiments. We applied this nonlinear sampling and 2D MaxEnt processing to 3D ¹³C or ¹⁵N-separated NOESY experiments of *T.thermophilus* HB8 TTHA1718 and *Sinorhizobium meliloti* FixJ C-terminal domain. The effect of the artefacts arising by employing nonlinear sampling and 2D MaxEnt processing, such as mis-calibration of intensities and the emergence or disappearance of cross peaks, to 3D NOESY-type spectra was evaluated by calculating structures with distance restraints obtained from simulated 3D NOESY spectra with various amounts of nonlinear sampling points.

【序論】

NMRによる蛋白質の立体構造解析の際には、帰属の曖昧さを避けるための多次元化や、十分な感度を得るために積算回数が増加が必要であり、3D測定に数日要するという制約があった。従って、安定性の低い蛋白質はNMR測定に適さないと考えられてきた。本研究では、近年提案されている迅速かつ高分解能な測定を可能にする様々な手法の一つである非線形サンプリングによる測定と最大エントロピー(MaxEnt)法によるデータ処理に着目し、シグナル強度から立体構造決定に最も重要な核間距離情報を算出するNOESY測定へ試みることで、蛋白質の立体構造解析におけるこのアプローチの有用性の検証を行った。

MaxEnt法によるデータ処理では、特にピーク強度のダイナミックレンジが大きいスペクトルにおいて、シグナル強度の変動やシグナルの消失などのアーティファクトが危惧されているが、それらが実際の構造計算にどれだけ影響を与えるかの議論はこれまでなされていなかった。本研究では、その有用性の検証を行ったので、報告する。

キーワード: 3次元NOESY, 非線形サンプリング, 最大エントロピー法

○おおにし かおり, しげみつ よしき, つちえ ゆうすけ, だにえる にーとりすぱっは,
みしま まさき, いけや てっぺい, いたう ゆたか

【実験】

測定試料には、高度好熱菌由来蛋白質 TTHA1718(66 アミノ酸残基, 7 kDa), 根粒菌 FixJ, C 末端ドメイン(79 アミノ酸残基, 8.6 kDa), の 2 次構造組成の異なる 2 種の蛋白質を用いた. まず従来法を用いて, 3D ^{13}C -separated NOESY 及び 3D ^{15}N -separated NOESY を測定した. このデータを用いて, 非線形サンプリング法によってデータポイントを 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 に削減した再構成データを作製した. 実測データおよび再構成データは観測軸についてフーリエ変換した後 2D MaxEnt 処理を行うことでスペクトルを得た. これらスペクトルを解析し, 距離情報を収集することによって, 構造計算を行った. データ処理には Azara v2.7 を, 解析には ANSIG-for-OpenGL v1.0.6 を, 高次構造計算には CYANA v3.0 を用いた.

【結果・展望】

3D NOESY スペクトルの解析によって得られた距離情報をもとに計算した高次構造は, それぞれのアンサンブルの RMSD, および実測データから計算された高次構造(レファレンス)との RMSD の 2 つのパラメータを指標に評価を行った. その結果, ①非線形サンプリングを用いてデータポイントを削減すればするほど, アンサンブルの RMSD とレファレンスとの RMSD は増大していく傾向があること, ②そうであっても, 実測データの 1/8 に削減した再構成データからでも, TTHA1718, FixJC ともに, 十分に収束して正確な構造が得られること, が判明した. Figure 1(および Table 1)には, 実測データおよび非線形サンプリングを用いて 1/8 にデータポイントを削減した再構成データから得られた構造のうち, 最終 20 個の構造の主鎖原子を重ね合わせたものを示した. 本研究により, 非線形サンプリングを用いることで, 短時間の 3D NOESY 測定でも正確な高次構造を導き出しうることを示すことができた.

今後は, さらに分子量の大きい蛋白質についても, この手法が有用であるかを検証していく. また, 同程度の分子量であっても, 2次構造における α -ヘリックスや β -シートの存在比によっても, 収束の具合も異なることが予測されるので, その検証も行っていきたい.

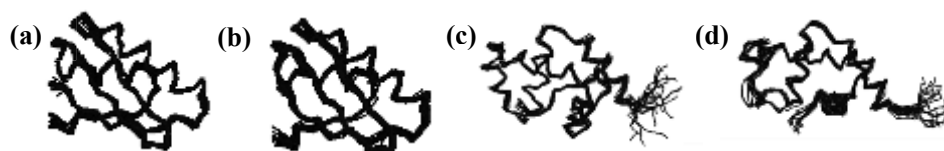


Figure 1 Superposition of 20 final structures of TTHA1718 from full (reference) data (a) and simulated data with 1/8 nonlinear sampling (b), respectively. Superposition of 20 final structures of FixJC from full (reference) data (c) and simulated data with 1/8 nonlinear sampling (d), respectively.

Table 1 RMSD of ensembles and RMSD to references.

	TTHA1718		FixJC	
	reference	1/8	reference	1/8
Backbone RMSD	$0.28 \pm 0.04 \text{ \AA}$	$0.45 \pm 0.11 \text{ \AA}$	$0.33 \pm 0.07 \text{ \AA}$	$0.62 \pm 0.14 \text{ \AA}$
Heavy atom RMSD	$0.78 \pm 0.05 \text{ \AA}$	$0.96 \pm 0.09 \text{ \AA}$	$0.75 \pm 0.04 \text{ \AA}$	$1.10 \pm 0.15 \text{ \AA}$
Backbone RMSD to reference	-	1.11 \AA	-	1.15 \AA
Heavy atom RMSD to reference	-	1.30 \AA	-	1.53 \AA

P24

NMRによるヒストンヌクレオソームコアの構造解析

○森脇義仁¹, 佐藤昌彦¹, 長土居有隆¹, 立和名博昭², 胡桃坂仁志², 西村善文¹

¹横浜市大・生命ナノシステム・生体超分子システム科学

²早稲田大・理工学術院・先進理工学部

The structural analysis of the nucleosome core by NMR spectroscopy

○Yoshihito Moriwaki¹, Masahiko Sato¹, Aritaka Nagadoi¹, Hiroaki Tachiwana², Hitoshi Kurumizaka², Yoshifumi Nishimura¹

¹Lab. of Struct. Biol., Grad. Sch. of Supermol. Biol, Yokohama City University, Kanagawa, Japan.

²Grad. Sch. Of Adv. Sci. and Eng./RISE., Waseda Univ.

In eukaryotic cells, DNA is stably stored in a highly ordered structure, chromatin. Its fundamental repeating structural unit is a nucleosome core, which is comprised of 147 bp of DNA and a histone octamer, consisting of two copies of four kinds of histones, H2A, H2B, H3 and H4. Here, we try to clarify the structure of the H2A/H2B complex in solution by NMR; each molecular weight of H2A and H2B is about 14kDa. At first we prepared the recombinant H2A and H2B proteins in *E. coli* by labeling ¹⁵N or ¹⁵N and ¹³C, however the backbone assignments of the complex was very difficult. So we prepared the ²H, ¹³C, ¹⁵N-labeled H2A/ ²H- labeled H2B complex and obtained the good quality spectra with the TROSY technique. Now we are conducting the backbone assignments of H2A in the H2A/H2B complex.

真核生物のクロマチン構造の単位であるヌクレオソームコアは 147 塩基対の DNA と 4 種類のヒストン H2A、H2B、H3、H4 の各 2 量体からなるヒストン 8 量体で形成されている。ヌクレオソームコア中のヒストンがアセチル化、脱アセチル化、メチル化など様々な修飾を受けることにより、遺伝子の発現は制御されている。

X線結晶構造解析によって、ヒストンオクタマーと同じ73塩基対が回文配列の146または147塩基対からなる二重鎖DNAで構成されたヌクレオソームコアおよび147塩基対が4回繰り返したオリゴマーのヌクレオソームコアの立体構造は既に解かれている。しかし、ヌクレオソームコアの溶液中での詳細構造を解析することは、ヒストンタンパク質の修飾の場所や種類や二重鎖DNAの配列の違いが構造にどのように影響を与えているかを解析し、遺伝子の発現制御を理解する上で必要である。また、遺伝子発現が活発な領域ではヌクレオソームコアの解離と再構成が盛んに繰り返されており、解離したH2A/H2Bヘテロ2量体の挙動を構造的に解析することはクロマチン再

ヒストン, H2A, ヌクレオソームコア, NMR

○もりわきよしひと, さとうまさひこ, ながどいありたか, たちわなひろあき, くるみざかひとし, にしむらよしふみ

構成の観点から不可欠である。よって、我々は先ずH2A/H2Bヘテロ2量体の溶液中での構造を決定し、クロマチン再構成の理解へとつなげることを目的とした。

大腸菌発現系では H2A と H2B は沈殿物に回収されたので、可溶化して H2A/H2B ヘテロ 2 量体を作製した。当初、 ^{15}N , ^{13}C -labeled H2A/nonlabeled H2B を調製し、 ^1H - ^{15}N HSQC 測定、3 次元 NMR 測定を行ったが、良好なスペクトルが得られなかった。H2A/H2B 複合体は H2A、H2B どちらも大きさが約 14kDa であり、複合体では 28kDa になる。そのため ^{13}C , ^{15}N ラベル体にて通常の測定を行ったのでは、シグナルのブロードニング等が起こってしまう。そこで、 ^2H , ^{13}C , ^{15}N -labeled H2A/ ^2H -labeled H2B を調製し、TROSY- ^1H - ^{15}N HSQC 測定を行ったところ、スペクトルが改善され、コアドメインに由来すると思われる分散したシグナルもはっきりと観測できた(Figure 1.)。現在、TROSY 法を用いた各種多次元 NMR 測定を行い、H2A/H2B ヘテロ 2 量体中の H2A における主鎖及び側鎖のシグナル帰属を進めている。また ^{15}N ラベル化 H2A を含むヌクレオソームコアを調製し、 ^1H - ^{15}N HSQC 測定を行った結果、一部の残基のアミドプロトンに由来するシグナルが観測された。このことから、溶液条件等を工夫することでヌクレオソームコアの溶液 NMR による解析も可能になると考えられる。

今後、H2A/H2B ヘテロ 2 量体の溶液構造の解明を進める一方で、帰属データをもとにし、NAP1 や FACT やヌクレオソーム等のヒストンシャペロンと H2A/H2B ヘテロ 2 量体との相互作用を解析する。また、溶液中でのヌクレオソームコアと H2A/H2B ヘテロ 2 量体の NMR シグナルを比較し、ヌクレオソームコアにおける溶液中でのヒストンテールの状態の解明を試みる。

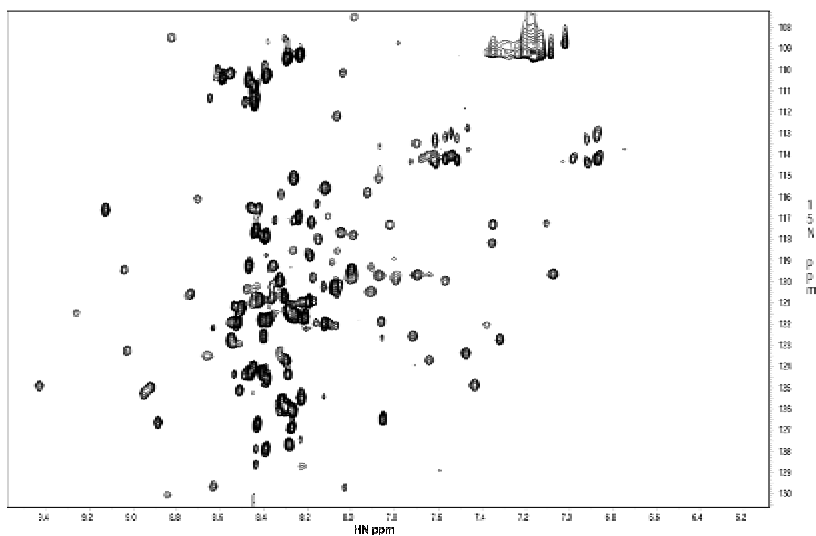


Figure 1. ^1H - ^{15}N HSQC spectrum of the ^2H , ^{13}C , ^{15}N -labeled H2A/ ^2H -labeled H2B complex.

P25

溶液NMRを用いた、人チューブリンチロシン化酵素の構造解析

○佐伯邦道¹, 前崎綾子², 伊藤隆¹, 三島正規¹

¹首都大院・理工

²奈良先端科学技術大学院大学

Structural analysis of the tybulin tyrosine ligase from human by solution NMR spectroscopy

○Kunimichi Saeki¹, Ryoko Maesaki², Yutaka Ito¹, and Masaki Mishima¹

¹ Graduate school of science and engineering, Tokyo Metropolitan University.

² Nara Institute Science and Technology.

Tubulin tyrosine ligase (TTL) is the enzyme that adds tyrosine to the C-terminal end of α -tubulin. It is interesting that CLIP170 protein specifically recognizes tyrosine at the C-terminal end of α -tubulin and binds to it (Mishima M., et .al. (2007) *P.N.A.S.* 104 10346). CLIP-170 bound to C-terminus of α -tubulin accumulates on microtubule and promotes its polymerization. Thus, this tyrosination is one of the key modifications to regulate microtubule dynamics. In physiological aspect, it is known that this tyrosination involves in organization of neuron.

In this study, our purpose is to elucidate the detail of this tyrosination based on the TTL structure using NMR technique. We will report our progress about binding assay between TTL and α -tubulin, and the resonance assignments of NMR signals of TTL.

【序論】

Tubulin tyrosine ligase(TTL)は α -tubulin C末端にチロシンを付加する酵素で、このチロシン化は微小管の伸長制御に大きく関わる。CLIP170は α -tubulin C末端のチロシンを認識して結合することが知られており (Mishima M., et .al. (2007) *P. N. A. S.* 104 10346)、結合したCLIP170が微小管のプラス端に集積することで重合が促進される。その後、 α -tubulinはカルボキシペプチダーゼによってC末端のチロシンが切断され、CLIP170が外れる。このチロシンが切断された α -tubulinに、TTLによってチロシン

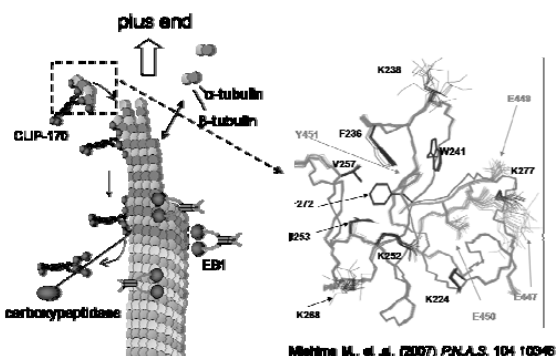


Fig.1 Scheme of polymerization of microtubule

Key word ; tubulin, 酵素

○さえき くにみち, まえさき りょうこ, いたう ゆたか, みしま まさき

が再び付加されることで、tubulinはCLIP170と結合できるようになる(Fig. 1)。生理学的には α -tubulin C末端にチロシンを付加する反応が神経細胞の組織化への関与が明らかになっており、TTLは高等動物にとって極めて重要なタンパク質の一つと考えられている。

本研究では、tubulin tyrosine ligaseの立体構造、及び α -tubulin C末端との相互作用を研究することで、反応機構の詳細を明らかにすることを目的としている。発現系を作成し、発現・精製した試料の測定条件を検討した。並行して、 α -tubulin C末端との結合とチロシン化をNMRによって確認した。本発表では各種NMR信号の帰属や構造解析、測定条件の検討、また、 α -tubulin C末端との結合実験について議論する。

[研究方法]

■NMR測定試料の調製

cDNA mixture(Clontech)から目的遺伝子を増幅し、pET151/D-TOPOに組み込みTTL発現プラスミドを作成した。大腸菌BL21を用いて発現系を作成し、20°Cで一晩発現誘導をかけ大量発現を行った。この際、シャペロンプラスミドpG-KJE8(TAKARA)との共発現を行った。次いでDEAE sepharose、Niアフィニティーカラムに通し、ゲル濾過からむクロマトグラフィーによる精製を行った。しかし、単離、精製されたTTLは凝集を起こしやすく、測定条件の検討が必要であった。

■測定条件の検討

TTLのリガンドとして知られている、 Mg^{2+} 、ATP、Tyrをbufferに加え、bufferのpHと塩濃度を変化させ、TTLの安定性のモニタリングを行った。また、タンパク質の安定化の効果があると言われているアルギニンを加えた測定も試みた。

■安定性の高い変異体の作成

TTLの分子表面に露出している、電荷を持った残基が凝集を引き起こす要因の一つだと考え、変異の導入による改善を試みた。TTLの構造は未知なため、分子表面に露出している残基の特定は出来ず、変異体の有効性の判別には時間がかかる。そこで、GFPの蛍光をもちいた判別法の実験に取り組んだ。

GFPとTTLが同一プラスミド上に存在する発現プラスミドを、In-Fusion Advantage PCR Cloning Kitをもちいて作成し(Fig. 2)、大腸菌BL21に形質転換を行った。発現時の条件を変え、GFPの蛍光の強さを比べTTLの性質を検討した。

■TTLによる α -tubulin C末端領域へのチロシン付加の観測

pGEX 6P-3ベクター、大腸菌BL21を用いて、 ^{15}N 標識した α -tubulin C末端領域の大量発現を行い、GSHアフィニティーカラムに通し、ゲル濾過カラムクロマトグラフィーにより精製を行った。得られたサンプルにTTLを加え、NMRによってそのスペクトルの変化を追った。

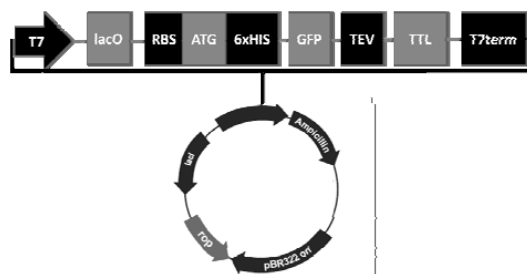


Fig.2 GFP+TTL expression plasmid

更に、TTL の活性を調べるために、上記のサンプルに、反応に必要とされる ATP、Tyr、 Mg^{2+} 、を加えてチロシン化反応を起こし、NMR によって α -tubulin のシグナルの変化を追った。

[結果 考察]

■NMR 測定試料の調製

TTL の大量発現を行った際、TTL の多くがインクルージョンボディを形成し、不溶性画分に存在していた。そこでシャペロンプラスミドとの共発現を行った。その結果、収量は5倍に改善した。

■測定条件の検討

各種 buffer 条件の結果、リガンドとして Mg^{2+} が存在し、弱酸性、高塩濃度下で安定に存在することがわかった。しかし、塩濃度が高いことは NMR 測定の障害になる。よって、NMR 測定条件と、TTL が安定に存在できる条件の最適化を行った。その結果、分離の良いスペクトルを得ることができた (Fig. 3)。またアルギニン buffer に加えることで TTL の安定性の改善は顕著ではなかった。

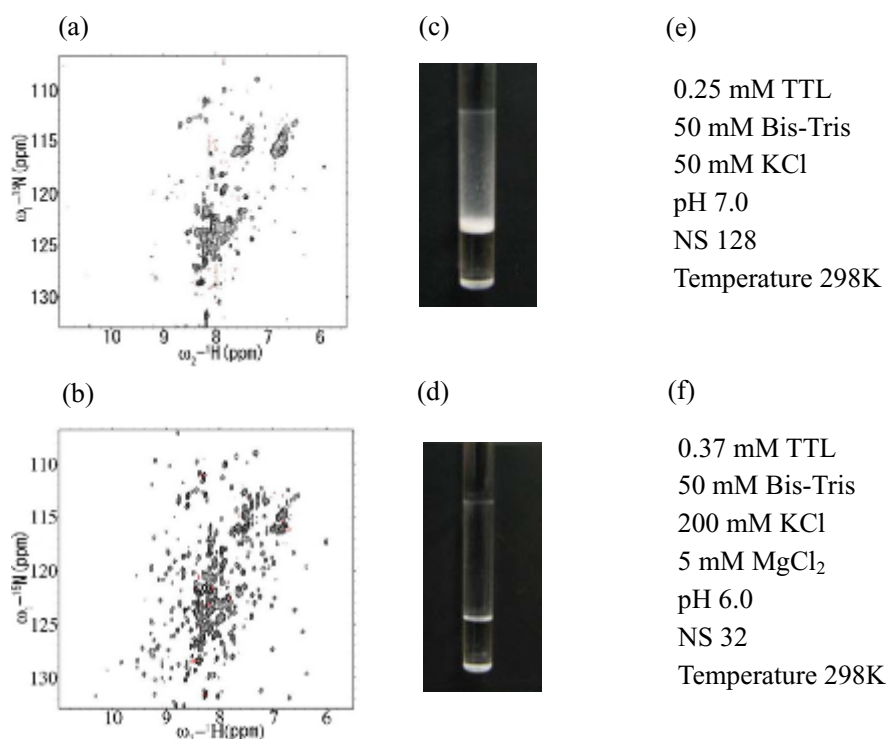


Fig.3 TROSY HSQC before optimization (a) and after optimization (b). Observed aggregations of NMR samples before optimization (c) and after optimization (d). Conditions of measurements (e) and (f).

■安定性の高い変異体の作成

測定条件の検討から、TTLの凝集の要因の一つとして、分子間の静電的相互作用が考えられた。TTLには電荷を持った残基が86存在する。アルギニンがTTLの安定性の向上に効果があったことから、負電荷をもった残基に変異を行うことが有効であると考えた。また、Mg²⁺が活性に必要なことや、配列のアライメント、構造予測サーバーI-TASSARにより信頼度は低いながらも得られたモデル構造等も参考にアミノ酸置換の候補を選んだ。

また、効率のよい変異体の判別のためにデザインしたGFP融合プラスミドをLBプレート上で発現させたところ、TTLがinclusion bodyとなる37度の発現条件では蛍光を發せず、わずかではあるが可溶化する25度では蛍光を發することを確認した(Fig. 4)。この手法を用いて、安定な変異体のスクリーニングを行っていく。

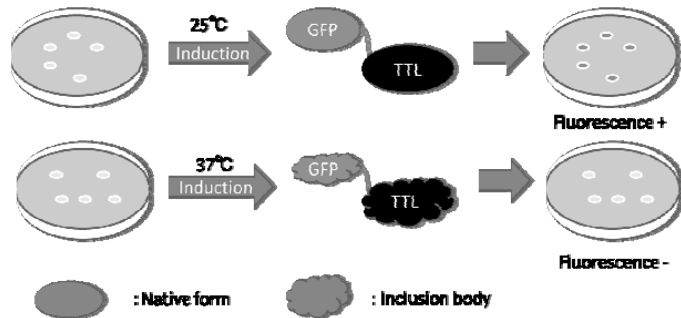


Fig.4 Scheme of monitoring system using GFP

GFP gives green fluorescence, if TTL folds into native form. However, it gives no green fluorescence, if TTL forms inclusion body and folds into non native structures.

■TTLによる α -tubulin C末端領域へのチロシン付加の観測

NMR測定の結果、TTLと α -tubulin C末端領域との結合を確認した。TTLによる α -tubulin C末端へのTyrの付加反応をNMRで測定したところ、時間変化におけるスペクトルの変化が観測できた。

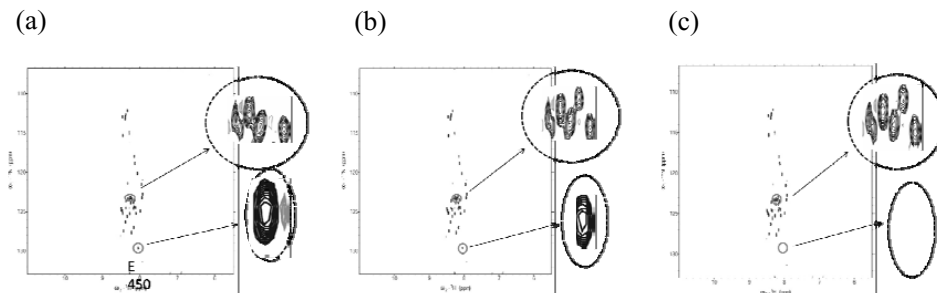


Fig.5 Observation of tyrosination in NMR tube

HSQCs of C-terminus of α -tubulin at 0 h (a), 4 h (b), and 12 h after reaction (c).

[今後の予定]

今回構築したGFPを用いる方法を使って、安定な変異体の作成を行う。得られた変異体を用いて、NMR測定を行い立体構造を解析する。また並行して、野生型のものの、構造解析も進めていく。

P26

準安定状態が安定化されたユビキチン変異体

○北沢創一郎¹、矢木真穂^{2,3}、菅瀬謙治⁴、加藤晃一^{2,3}、北原亮¹

¹立命大・薬、²名市大院・薬、³岡崎統合バイオ・分子研、⁴サントリー生有研

High-energy state mutant of ubiquitin

Soichiro Kitazawa¹, Maho Yagi^{2,3}, Kenji Sugase⁴, Koichi Kato^{2,3}, Ryo Kitahara¹

¹College of Pharmaceutical Sciences, Ritsumeikan University, Kusatsu, Japan, ²Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya-City University, Nagoya, Japan, ³IMS Okazaki National Institute, Okazaki, Japan, ⁴Suntry Institute for Bioorganic Research, Osaka, Japan

High pressure NMR studies have revealed that ubiquitin exists in conformational equilibria among the basic folded (N₁), alternatively folded (N₂), locally disordered (I) and totally unfolded (U) conformers. Here, we show NMR characterizations of the ubiquitin mutants in which the high-energy states are highly populated. A breaking of hydrogen bond, salt bridge or a replacement of Pro-Pro sequence to Ala-Ala (K11A, E34A, Q41N, Q41A and P37A/P38A) brought about significant changes in chemical shifts, ¹⁵N spin-spin relaxation rates *R*₂ and amide proton-water exchange rates at many residues in α-helix and some β-strand regions, indicating a large increase in population of high-energy states in those mutants. In addition, we studied the binding constants of ubiquitin-interacting-motif UIM to ubiquitin and its mutants.

緒言： コンフォメーション平衡の研究に優れた高圧力NMR法により、これまでにユビキチン及び NEDD8、SUMO2 など複数のユビキチン様蛋白質での比較解析を行い、E1-E2-E3 カスケードを有するユビキチンホモログ間にのみ保存された高エネルギー構造（準安定構造 N₂、局所変性構造 I）の存在を明らかにした。高エネルギー構造の機能的意義を生化学的に研究するために、高エネルギー構造が多く分布するモデル変異体の作成を行った。N₂ 構造や I 構造で構造変化が生じる部分の安定性に注目し N₂、I 構造の安定化デザインを行った。

実験： I36C'O と Q41NεH の水素結合、K11 と E34 側鎖間の塩橋に摂動を与えた変異体(K11A, E34A, Q41A, Q41N)を作成した (Fig. 1)。I 構造中で局所変性する部位

高圧力、ポリユビキチン、構造揺らぎ

○きたはらりょう、やぎ・うつみまほ、すがせけんじ、かとうこういち、きたはらりょう

に位置する PP 配列を AA に置換した P37A/P38A を作成した。20 °C, pH 7.2 にて WT 及び全ての変異体について ^{15}N -HSQC 測定、 ^{15}N - T_2 緩和測定、CLEANEX-PM (water-amide proton chemical exchange)測定を行った。ubiquitin-interacting-motif UIM の滴定にともなう化学シフト変化から UIM の解離定数を見積もった。

結果と議論： K11A, E34A, Q41A, Q41N 変異により α ヘリックスと β_3 及び β_5 部分で ^{15}N , ^1H 化学シフトに大きな変化が観測された。これらの部分では、 R_2 値の増加 (~5 Hz, Fig. 2) が観測された他、主鎖アミド水素と水の交換が顕著に速まっていることが分かった。 α ヘリックスと β_3 及び β_5 部位は、 $\text{N}_1 \rightarrow \text{N}_2$ 転移で構造変化が大きい部分に対応することから、これらの変異により圧力同様に N_2 構造の分布が増加したと考えられる。K11A, E34A, Q41A, Q41N, P37A/P38A について UIM の解離定数を調べたところ、WT (250±60 μM)のそれと同程度から 2 倍程度大きな値を得た。いずれの変異体でも WT 程度かやや弱く UIM と結合可能であることが分かった。この結果から N_2 構造は、UIM を含め多くの標的分子の結合部位である疎水パッチの構造には顕著な影響を与えないことが分かった。次にヘリックス部分と C 末ストランドに直接結合する E1-E2-E3 カスケードに注目した。現在、ユビキチン化アッセイによる機能評価実験を行っている。

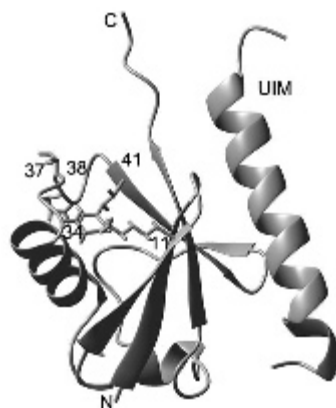


Fig. 1. NMR structure of ubiquitin-UIM complex (PDB 1Q0W, Swanson et al.). Residues substituted by Ala are represented by sticks.

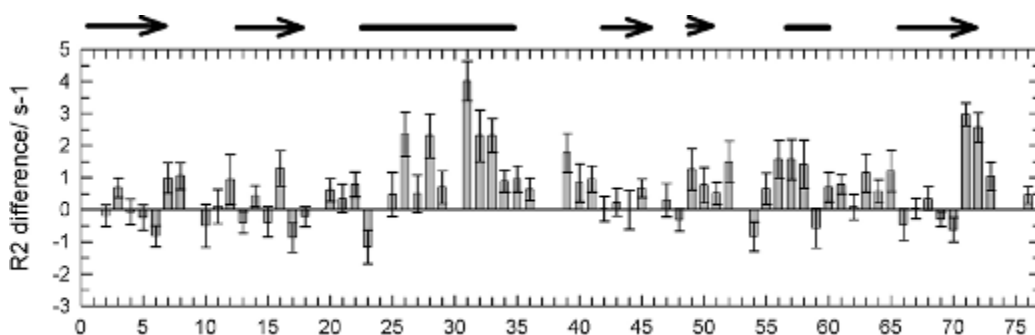


Fig. 2 Differences of R_2 values between Q41A and WT. NMR measurements are carried out at ^1H 600 MHz and 20 °C.

P27

酵母発現系を用いたタンパク質の安定同位体標識法の開発-難発現高分子量タンパク質の立体構造解析に向けて

○大浪真由美¹, 杉木俊彦¹, 竹内恒², 嶋田一夫^{2, 3}, 高橋栄夫^{2, 4}

¹バイオ産業情報化コンソーシアム, ²産総研・バイオメディシナル情報研究センター, ³東大院薬, ⁴横浜市大院・生命ナノ

Development of Isotope Labeling Strategy using Yeast Expression System -for a structural analysis of difficult to express large molecular weight proteins-

○Mayumi Ohnami¹, Toshihiko Sugiki¹, Koh Takeuchi², Ichio Shimada^{2, 3}, and Hideo Takahashi^{2, 4}

¹JBIC, ²BIRC, AIST, ³Grad. Sch. Pharm. Sci., The Univ. of Tokyo, ⁴Grad. Sch. Nanobiosic., Yokohama City Univ.

In a structural analysis of proteins using NMR spectroscopy, we often experience proteins that are large and derived from eukaryote are difficult to express in *Escherichia coli*. Recently, we established a protein expression system using hemiascomycete yeast *Kluyveromyces lactis* (*K.lactis*), which enable the preparation of labeled proteins using glucose and ammonium chloride as a stable isotope source. The yeast expression system expresses some eukaryotic target proteins in larger quantity than in *E.coli* with a comparable amount of stable isotopes.

In this presentation, we established a method to deuterate proteins in *K.lactis*, which would be beneficial for a structural analysis of large molecular weight proteins. We also examined the selective labeling strategy of methyl groups of the Ile ($\delta 1$), Leu, and Val residues using amino-acid precursors under highly deuterated background. These new techniques open up the way for the structural analyses of large and eukaryotic proteins that are important but hard tackle with current prokaryote based-expression systems.

NMRによるタンパク質の構造解析においては安定同位体標識した蛋白質を大量に得ることが研究を遂行するに当たり必須である。蛋白質の安定同位体標識には通常大腸菌が用いられるが、真核細胞由来のタンパク質など目的タンパク質の発現が大腸菌では困難である場合、酵母を用いた発現が有効である。近年、本研究室では酵母株 *K.lactis* に注目し、発現系構築の基盤を築いてきた。*K.lactis* はグルコースを用いた恒常的な分泌発現が可能であり、発現手法としての汎用性が高いことが示されている。本研究では、*K.lactis* を用いたタンパク質発現系を、より高分子量のタンパク質立体構造解析に拡張するため、タンパク質の重水素化条件の確立を行った。さらに重水素化条件下での Ile、Leu および Val の選択的メチル標識の導入を検討した。

[方法および結果] 重水素化培養法および選択的メチル標識の検討には *K.lactis* において高い発現がみられる maltose-binding protein (MBP) を用いた。

Yeast Expression System, Isotope Labeling, large molecular weight proteins

○おおなみまゆみ, すぎきとしひこ, たけうちこう, しまだいちお, たかはしひでお

重水培養条件の検討：

まず菌体の重水への順化の第一段階として、軽水富栄養培地で3日間前培養した高濃度の *K. lactis* の菌体を重水最少培地に培地交換する手法を試みた。軽水高濃度培養から重水最少培地への交換は大腸菌の重水素化の順化第一段階に有効な手法である。しかしながら、*K. lactis* で通常の密閉容器を用いた振とう培養を実施したところ、重水最少培地への培地交換後に菌体の増殖が急激に減少し、MBPの発現も失われることが判明した。このことから酵母の生育には十分な攪拌に加えて、高い溶存酸素濃度が重要であることが推測された。そこで、順化第一段階として空気を培地中に供給しながら三角フラスコで旋回培養し、順化が進んだ菌体をさらに重水最少培地に移し替えてファーメンターで培養した。その結果、MBPの発現を確認することができた。精製したMBPの ^1H NMRスペクトルから、側鎖の非交換性プロトンが高度に重水素化されていることが確認できた (Fig.1)。また、質量分析を行った結果、重水素化率は92.1%であった。このようにして作製した重水素化タンパク質は高度な重水素化が必要な交差飽和実験に適用可能であった。

選択的メチル標識の検討：

上記の重水培養法を用いて、重水素化条件下での Ile、Leu および Val の選択的メチル標識を検討した。まず、重水培養中に前駆体 [methyl- ^{13}C , 3,3-D $_2$] α -Ketobutyrate および [3-methyl- ^{13}C , 3,4,4,4-D $_4$] α -Ketoisovalerate を添加した。その結果、Ile の $\delta 1$ メチルが選択的に標識される一方、Leu および Val のメチルはほとんど標識されない結果となった (Fig.2)。一方、[3- ^{13}C] Sodium Pyruvate を添加したところ、Leu, Val, Ile($\gamma 2$), Ala, Met のメチルが標識されているという大腸菌と同様の結果となった。

[考察および展望] 真核生物である酵母ではアミノ酸合成が細胞質のみならず、ミトコンドリア内でも行われることが知られている。Ile はミトコンドリア外でも合成されるのに対して、Leu および Val はミトコンドリア内でのみ合成されることから、今回の結果は、Leu および Val の前駆体が効率良くミトコンドリアに取り込まれないことを示している。一方、ピルビン酸はミトコンドリア内に取り込まれ、Leu および Val に代謝されていることから、現在異なる前駆体の検討を行っている。

References

1. Sugiki T, Shimada I and Takahashi H (2008) *J Biomol NMR* 42, 159–162
2. Goto NK, Gardner KH, Mueller GA, Willis RC and Kay LE (1999) *J Biomol NMR* 13, 369-374

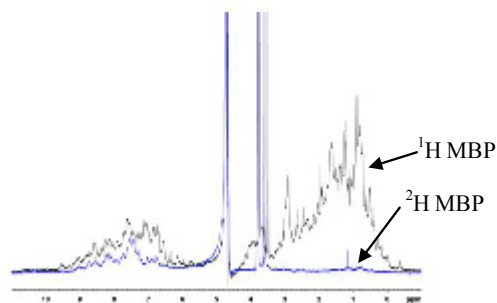


Fig. 1 ^1H NMR Spectra of undeuterated and deuterated MBP

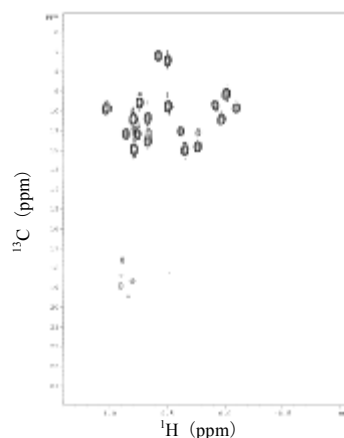


Fig. 2 ^1H - ^{13}C HSQC Spectrum of MBP

イネのSUMO転移反応における結合酵素E2の多重結合部位の役割

○土屋 渉, 神藤平三郎, 鈴木倫太郎, 藤本 瑞, 山崎俊正
農業生物資源研究所・タンパク質機能研究ユニット

Roles of Multi-Binding Sites of Conjugating Enzyme E2 in SUMOylation in Rice

○Wataru Tsuchiya, Heisaburo Shindo, Rintaro Suzuki, Zui Fujimoto, and Toshimasa Yamazaki

Protein Research Unit, National Institute of Agrobiological Sciences, Tsukuba, Japan.

Posttranslational modification of target proteins by the small ubiquitin-like modifier (SUMO) regulates many important cellular pathways. SUMOylation of target proteins requires a multistep process mediated by E1 (the activating enzyme), E2 (conjugating enzyme), and E3 (ligase) enzymes similar to those in the ubiquitylation machinery. In this process, the transfer mechanism of SUMO from E1 to E2 has not been well clarified. In this study, to reveal the functional roles of interaction network among E1, E2 and SUMO, we performed the structure analysis of E2 binding domain (Ubl domain) of E1, E2 and SUMO1 from rice (*Oriza sativa*), and identified the binding sites to each of Ubl and SUMO1 on E2.

【序論】 Small ubiquitin-like modifier (SUMO) は、ubiquitinと構造的に類似した翻訳後修飾に関与するタンパク質であり、真核生物に広く保存されている。多岐にわたる標的タンパク質のSUMO化は、転写制御、細胞周期、DNA修復およびストレス応答など様々な細胞機能調節において重要な役割を担っている。SUMO化は3段階反応によって起こる。ATP存在下において活性化酵素E1がSUMOのC末端カルボキシル基をE1自身の活性部位にチオエステル結合させた後、E1から結合酵素E2へのチオエステル転移反応が起こる。最終段階で、直接あるいはリガーゼE3を介して、SUMOのC末端カルボキシル基が標的タンパク質中の特定のLys残基のε-アミノ基とイソペプチド結合を形成する。

E2はSUMO1、E1、E3および標的タンパク質のそれぞれと相互作用しSUMO転移機構においてSUMO化を仲介する中心的役割を担っているが、現在までにその反応メカニズムを解明するための十分な構造生物学的知見は得られていない。よって、E2と各タンパク質との間の相互作用を明らかにすることは、SUMO化の分子メカニズムを理解する上で重要である。本研究において我々はE1からE2へのSUMO転移機構を明らかにすることを目的とし、イネ (*Oriza sativa*) 由来E2、E1のE2結合ドメイン (Ublドメイン) およびSUMO1の構造解析ならびに結合部位の同定を行ない、E1-E2-SUMO間の相互作用ネットワークの機能的役割について検討した。

SUMO化翻訳後修飾, チオエステル転移反応, 多重結合部位

○ つちやわたる, しんどうへいさぶろう, すずきりんたろう, ふじもとずい, やまざきとしまさ

【結果と考察】 $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 標識したイネ由来のE2を用いて多次元NMR法によりスペクトル帰属を行なった。E2に対するSUMO1の相互作用部位を特定するため、 ^{15}N 標識したE2に対するSUMO1滴定による $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ HSQCの化学シフト変化を測定した。その結果、E2はSUMO1に対して結合能の異なる独立した2つの結合部位を持つことが示された。いずれの相互作用もfast exchange limitであったが、第1群 (第1結合部位) はほぼ2当量のSUMO1の添加で飽和状態に達するのに対し、第2群 (第2結合部位) は2等量を超えてから徐々に変化を示した。E2のN末端付近に存在する第1結合部位においては、Arg14、Lys15、Arg18、Lys19などの残基が関与する一方で、E2のSUMO活性部位Cys94近傍に広がる第2結合部位は、Lys75、Ser90、Thr92、Gln131、Tyr135の残基が結合に寄与している (Fig. 1)。第1結合部位についてはヒトの系において既に報告された結果¹⁾と一致するが、第2結合部位の存在はこれまでに報告は無く、イネ由来E2が新規の発見である。第1および第2結合部位に対する正確な解離定数を得るため、第2結合部位の結合能を欠損させたE2 [K75A/S90A/T92A]変異体、および、第1結合部位の結合能を欠失させたE2 [R18A/K19A]変異体を用いてNMR滴定実験を行った。その結果、第1および第2結合部位に対する解離定数として、それぞれ $K_{d1} = 2.6 \mu\text{M}$ および $K_{d2} = 840 \mu\text{M}$ の値が得られた。

E2とUblドメインについても、UblはE2に対して強い結合を示し、その相互作用がslow exchange limitであることがNMRによって明らかとなった。相互作用による化学シフト変化から、Ubl結合部位はE2におけるSUMO1の第1結合部位と空間的に重複することが明らかとなった。事実、E2第1結合部位に変異を導入した、上記のE2 [R18A/K19A]変異体に対してUblとSUMO1のいずれも結合性を示さないことがITC測定によって明らかとなり、さらに、E2とSUMO1複合体にUblを添加するとSUMO1はUblに置換すること、逆にE2と結合したUblはSUMO1によって置き換わらないことも示された。

上記のように、NMR 測定によってイネ由来 E2 には 2 つの異なる SUMO1 結合部位が存在し、高い結合能を示す第 1 結合部位は触媒活性残基 Cys94 から離れた位置にあること、SUMO1 と Ubl とは第 1 結合部位において競合し、Ubl の結合が優勢であることが明らかとなった。現在、これらの結果に対し、ITC 測定と X 線結晶構造解析によって更なる検証を進めると同時に、SUMO 転移機構に対する E1-E2-SUMO 間の相互作用ネットワーク役割を、イネの *in vitro* SUMO 化のアッセイ系を構築し検討中である。

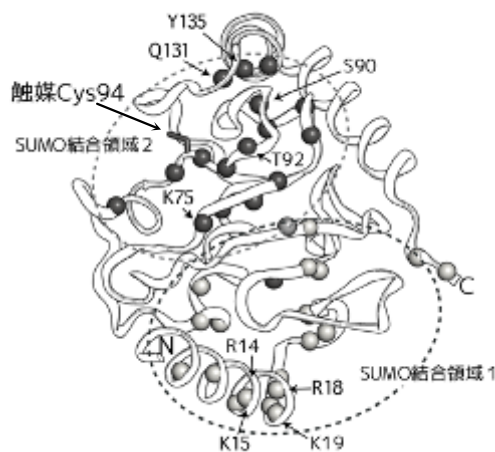


Fig. 1 Mapping of the residues on E2 that showed large chemical shift perturbation upon complex formation with SUMO.

文献1) M. H. Tatham et al., *Biochemistry*, **42**, 9959-9969 (2003).

P29

細菌の走化性における連鎖的なシグナル伝達機構の構造生物学的解明

○湊 雄¹, 町山 麻子¹, 上田 卓見¹, 嶋田 一夫^{1,2}

¹東大・院薬系

²産総研・バイオメディシナル情報研究センター

Structural Elucidation of the Sequential Signal Transduction Mechanism in Bacterial Chemotaxis

○Yuichi Minato¹, Asako Machiyama¹, Takumi Ueda¹, and Ichio Shimada^{1,2}

¹Grad. Sch. of Pharm. Sci., the Univ. of Tokyo, Tokyo, Japan.

²BIRC, AIST, Tokyo, Japan.

The autophosphorylation of the P1 domain by the P4 domain in CheA, and the subsequent phosphotransfer from the P1 domain to CheY bound to CheA on the P2 domain, are important for the rapid signal transduction in bacterial chemotaxis. Here, to clarify the mechanism underlying the rapid sequential signalling, we performed cross-saturation (CS) experiments on the full-length CheA-CheY complex. The resonances from residues located around the catalytic residues of the P1 domain and CheY were significantly affected by the irradiation, in addition to those on the binding surface in the crystal structure of the P2 domain-CheY complex. These results suggest that the P1 domain and CheY interact with each other on their catalytic sites. The intensity reduction of the P1 domain caused by CS was about half of that of the P2 domain, suggesting that the P1 domain is under equilibrium between the CheY-bound state and unbound state, in the full-length CheA-CheY complex. This equilibrium might be important for the P1 domain to interact with both CheY and the P4 domain.

【序】細胞が刺激に対して迅速に応答するためには、多数の分子間で素早く連鎖的にシグナルを伝達することが重要である。原核生物の走化性では、ATP が結合した CheA の P4 ドメインが、P1 ドメイン上の H48 を自己リン酸化する反応、および H48 が P2 ドメインに結合した CheY 上の D57 にリン酸基を転移する反応の両方が、素早く連鎖的に起きることで、迅速なシグナル伝達を達成している。

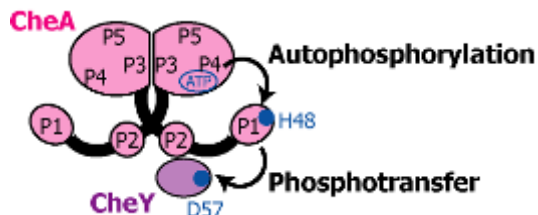


Fig.1 Schematic diagram of the domain structure of CheA and its phosphorylation reactions. The P4 domain binds to ATP, and donates an phosphate to H48 in the P1 domain (autophosphorylation). CheY binds to the P2 domain, and accept an phosphate from the phosphorylated P1 domain (phosphotransfer).

two-component system, cross-saturation, segmental isotope labeling

○みなとゆういち, まちやまあさこ, うえだたくみ, しまだいちお

本研究では CheA と CheY の結合様式を機能ドメインが全て正しく揃った状態で明らかにすることにより、素早く連鎖的なシグナル伝達の機構を解明することを目的とした。

【方法】

《試料調製》大腸菌由来全長 CheA, CheY を大腸菌大量発現系にて発現し、これを硫酸沈殿、ゲル濾過クロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィーにて精製した。Mn²⁺-phos-tagTM SDS-PAGE 解析により、調製した CheA, CheY および ATP の存在下で、リン酸化 CheY が生成することを確認した。

《区分標識法》CheA の P1 ドメインのシグナルを選択的に観測するため、[U-²H, ¹⁵N] 標識を施した P1 ドメインを含むセグメント (a.a. 1-153) および非標識の P2-5 ドメインを含むセグメント (a.a. 154-654) の蛋白質ライゲーションを行った。各セグメントを別々に発現させ、各セグメントに付加した chitin binding domain (CBD) を用いたアフィニティー精製、および CBD の切断の後、200 mM 2-mercaptoethanesulfonate (MESNA) 存在下にて濃縮し、ライゲーション反応を行った。ただし、P1 ドメインを含むセグメントの C 末端、および P2-5 ドメインを含むセグメントの N 末端は、それぞれ Q153G, A154C 変異体を用いた。

《CS 実験》CheA 観測型 CS 実験は、[U-²H, ¹⁵N] CheA 100 μM に対し、非標識 CheY 200 μM を添加したサンプルにて行った。CheY 観測型 CS 実験は、[U-²H, ¹⁵N] CheY 100 μM に対し、非標識 CheA 200 μM を添加したサンプルにて行った。

【結果】

[1] 全長 CheA の NMR スペクトルの取得

CheA 全長の NMR スペクトルを測定したところ、ダイマーで約 14 万の分子量であるにもかかわらず、約 150 個のシグナルが高感度で観測された。区分標識法と三重共鳴実験を組み合わせることでシグナルを帰属した結果、観測されたシグナルは主に P1, P2 ドメインに由来することが示された。

[2] CheA-CheY 間 CS 実験

CheA と CheY の相互作用界面を明らかにするために、全長 CheA, CheY それぞれを観測対象とする交差飽和実験を両方行った。その結果、P2 ドメイン-CheY 複合体の結晶構造における結合界面上の残基の強度減少に加えて、その半分程度の大きさの強度減少が、P1 ドメインの H48 と CheY の D57 近傍の残基にも観測された (Fig.2)。

[3] CheA ならびに P1 ドメインに対する CheY 滴定実験

CS 実験で観測された、全長 CheA-CheY 複合体における、P1 ドメインと CheY の結合様式の詳細を調べるために、全長 CheA ならびに P1 ドメインに対して CheY を滴定する実験を行った。その結果、P1 ドメインだけでは解離定数が 100 μM を下回る相互作用は観測されなかった一方、全長 CheA 中の P1 ドメインのシグナルには、解離定数 1 μM 程度に対応する化学シフト変化が観測された。

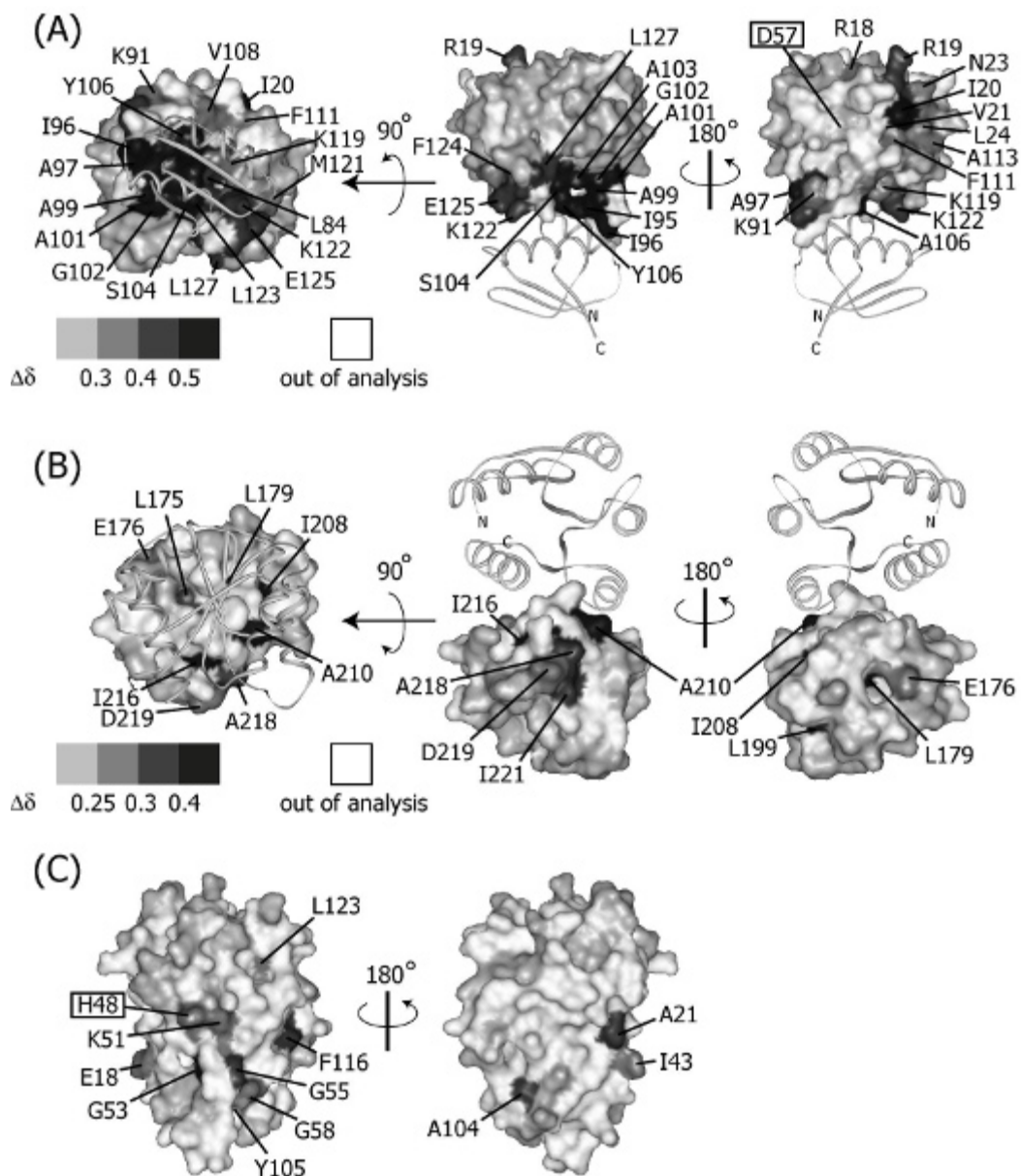


Fig. 2 Results of the affected residues in the CS experiments.

(A) Mapping of the affected residues in the CheY-observed CS experiments.

(B)(C) Mapping of the affected residues in the CheA-observed CS experiments. (B) and (C) are the mapping of the P2 and P1 domains, respectively.

The darker color indicates stronger reduction of signal intensity for corresponding residues. The strongly affected residues are labeled.

In (A) and (B), the ribbon diagrams represent CheY and the P2 domain, respectively.

The residues surrounded by the squares (D57 in (A) and H48 in (C)) are the catalytic residues of CheY and the P1 domain, respectively.

【考察】

滴定実験において、P1 ドメインと CheY の相互作用が、全長 CheA ではじめて観測されたことから、本実験で観測された、P1 ドメインと CheY の反応部位同士の相互作用は、P1 ドメインと、P2 ドメイン上に結合した CheY との間、複合体内相互作用であることが示唆された (Fig.3)。このような、ドメイン単独では親和性が不十分であるが、全長では、複合体内で相互作用することにより、生理的条件下での相互作用が可能となる、という結合様式は、P1 ドメインと CheY が結合・解離を迅速に繰り返して、その結果素早く次の反応を開始する上で重要であると考えた。

また、CheA-CheY 間 CS 実験において、P1 ドメインの強度減少率が P2 ドメインの半分程度であったことから、全長 CheA-CheY 複合体における、P1 ドメインと CheY の結合飽和度は 50%程度であることが示唆された (Fig.3)。P1 ドメインと CheY の結合が飽和していないことは、P1 ドメインが、CheY だけでなく P4 ドメインとも反応を行う上で重要であると考えた。

現在、区分標識法を利用し、CheY と P1 ドメイン、P2 ドメインそれぞれとの相互作用に由来する CheY 上への強度減少を別々に抽出することを試みている。

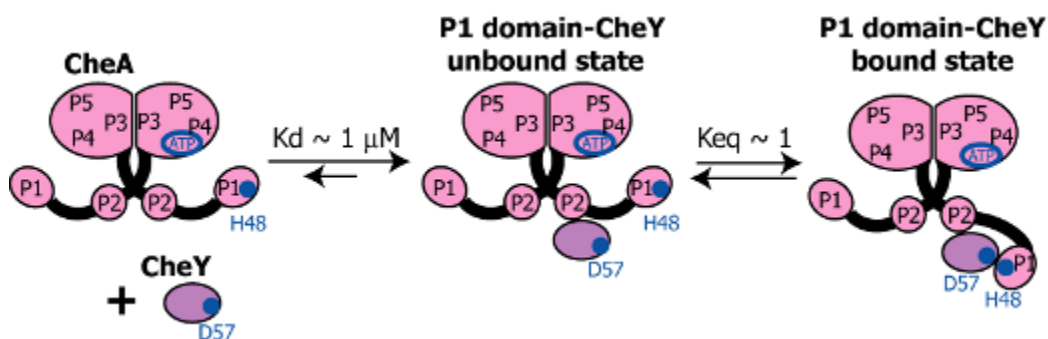


Fig.3 Proposed CheA-CheY interaction model.

We propose that the P1 domain is under equilibrium between the CheY-bound state and unbound state in the full-length CheA-CheY complex, and about half of the P1 domain is under the CheY-bound state ($K_{eq} \sim 1$).

P30

平行型四重鎖DNAで形成されるアデニン四量体 (A-カルテット)の研究

○中野佑亮, 太 虎林、長友重紀、山本泰彦
筑波大院数物

Structural characterization of A-quartet formed in all-parallel G-quadruplex DNA

○Yusuke Nakano, Hulin Tai, Shigenori Nagatomo, and Yasuhiko Yamamoto
Dept. of Chem., Univ. of Tsukuba

A G-quadruplex DNA is composed of stacked G-quartets, each of which involves the planar association of four guanine bases. In the center of each G-quartet, electrostatic repulsions among four closely-spaced carbonyl groups are reduced by a nearby cation. Similarly to the case of G-quartet, four adenine bases have been shown to be associated to form A-quartets in G-quadruplex DNAs. We have characterized the molecular structures of G-quadruplex DNAs formed from various DNA sequences such as d(TTAGGG), d(TTGAGG), and d(TTGAGGT), in order to elucidate the effects of the sequence on the G-quadruplex DNA structure possessing an A-quartet. In addition, NMR characterization using $^{15}\text{NH}_4^+$ revealed the cation binding sites in the G-quadruplex DNAs.

序論

四重鎖DNAは、グアニンが連続する配列をもつDNAにより形成される特異的構造である。四重鎖DNAでは、グアニン4つが Hoogsteen型塩基対により同一平面内で環状に連結したグアニン四量体構造 (G-quartet (Fig. 1)) が形成され、G-quartet が複数存在する場合には、それらの π 平面のスタッキングが四重鎖DNAの立体構造の安定化に寄与している。また、四重鎖DNAの3'末端にG-カルテットが存在する場合には、3'末端のG-quartet同士のスタッキングにより、四重鎖DNAが二量体を形成することも明らかになっている¹。さらに、隣接するG-quartet間にはカチオンが存在し、グアニンの酸素原子間の静電的反発を低減することにより四重鎖DNAの安定化に役立っている。本研究では、ヒトテロメアにおける繰り返し配列の基本単位であるd(TTAGGG)をモチーフとして設計した d(TTGAGG)とd(TTGAGGT)により形成される平行型四重鎖DNAで、アデニン四量体構造 (A-quartet (Fig. 1)) が形成することを明らかにすると共に、カチオンとして $^{15}\text{NH}_4^+$ を用いることで、四重鎖DNA内部のカチオン結合部位を特定し、A-quartetをもつ四重鎖DNAとカチオンの相互作用について解析した。

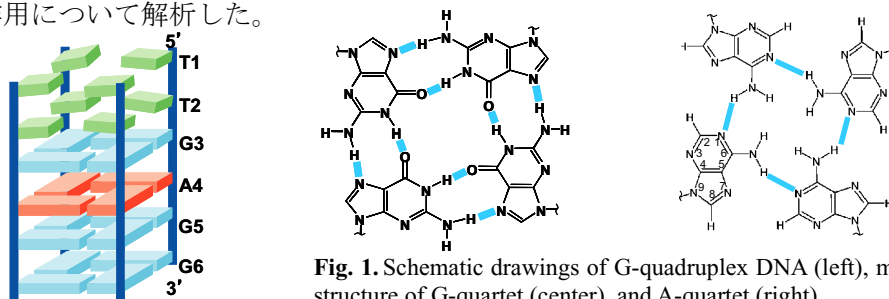


Fig. 1. Schematic drawings of G-quadruplex DNA (left), molecular structure of G-quartet (center), and A-quartet (right).

G-quartet, A-quartet, π - π stacking

○なかのゆうすけ、たいこりん、ながともしげのり、やまもとやすひこ

結果・考察

用いたDNA配列の ^1H NMRスペクトルでは、グアニンのNHプロトンに由来するシグナル (G_{NH}) 3つが、10–12 ppmに観測され (Fig. 2)、いずれのDNAでも対称性の高い平行型四重鎖DNA ($(\text{d}(\text{TTAGGG}))_4$ 、 $(\text{d}(\text{TTGAGG}))_4$ 、 $(\text{d}(\text{TTGAGGT}))_4$) が形成されることが確認された。また、 $(\text{d}(\text{TTGAGG}))_4$ と $(\text{d}(\text{TTGAGGT}))_4$ のアデニンH2 (A4H2)に由来するシグナルが、このシグナルの通常のシフト値に比べて約 1.2 ppmの低磁場シフトを示した。この結果から、 $(\text{d}(\text{TTGAGG}))_4$ と $(\text{d}(\text{TTGAGGT}))_4$ のアデニンは、隣接するG-quartetとのスタッキングによりA-quartetを形成することが示唆された。また、 $(\text{d}(\text{TTGAGGT}))_4$ のスペクトルでは、 G_{NH} シグナルとA4H2シグナルの分裂が観測された。NOESYによる解析の結果、分裂したそれぞれの G_{NH} シグナルの間で化学交換によるクロスピークが観測され、対応するA4H2とNOEが観測されたことから、 $(\text{d}(\text{TTGAGGT}))_4$ には、相互変換する二つのコンフォメーションの存在が示された。また、 K^+ 濃度の増大に伴い、相互変換反応の平衡に変化が生じたことから、これらのコンフォメーションは、 K^+ の結合部位の違いによって誘起されたものであることが示唆された。

次に、 $^{15}\text{NH}_4^+$ を用いて各種NMR測定を行い、四重鎖DNA内部のカチオン結合部位を決定した。 $(\text{d}(\text{TTGAGG}))_4$ - $^{15}\text{NH}_4^+$ の ^1H NMRスペクトルと、 ^{15}N -filteredスペクトル、NOESY、 ^{15}N - ^1H HSQCによる解析の結果から (Fig. 3)、 $(\text{d}(\text{TTGAGG}))_4$ のカチオンの結合部位には2組の異なる様式が存在することが明らかになった (Fig. 4)。

結論

本研究で用いたDNA塩基配列により生じる平行型四重鎖DNAでは、G-quartetとの π - π スタッキングによりA-quartetが形成することが明らかになった。また、 $^{15}\text{NH}_4^+$ を用いた解析により、A-quartetをもつ四重鎖DNAのカチオン結合部位を決定することに成功した。

Reference

1. Y. Kato, T. Ohyama, H. Mita, and Y. Yamamoto, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127, 9980-9981

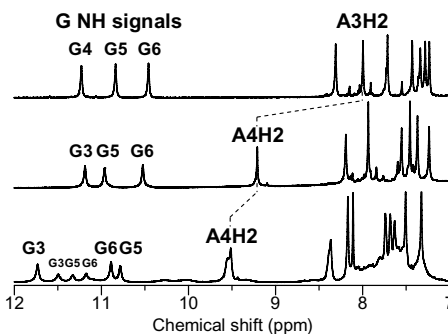


Fig. 2. ^1H NMR spectra of G-quadruplex DNAs formed from $\text{d}(\text{TTAGGG})_4$ (top), $\text{d}(\text{TTGAGG})_4$ (middle), and $\text{d}(\text{TTGAGGT})_4$ (bottom) at pH 6.80 and 25°C (top and middle), and 5°C (bottom), respectively.

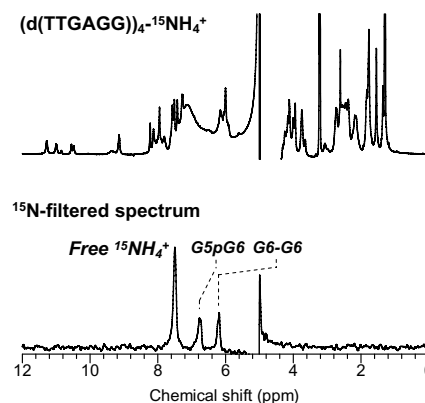


Fig. 3. ^1H NMR spectra of $(\text{d}(\text{TTGAGG}))_4$ in 200 mM $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ at pH 6.30 and 5°C .

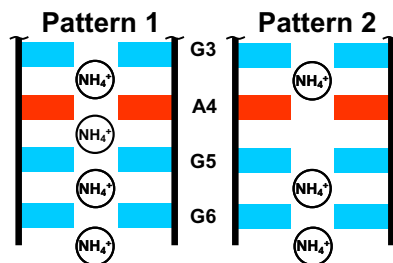


Fig. 4. Schematic drawings of the G3-G6 region of $(\text{d}(\text{TTGAGG}))_4$ and NH_4^+ binding sites. Two different binding patterns were determined.

P31

EB1による微小管ダイナミクス制御についての構造研究

○金場哲平¹、森智行²、前崎綾子²、伊藤隆¹、箱嶋敏雄²、三島正規¹

¹首都大、理工

²奈良先端大、情報科学

Structural studies of the regulation of microtubule dynamics by EB1

○Tepei Kanaba¹, Tomoyuki Mori², Ryoko Maesaki², Yutaka Ito¹, Toshio Hakoshima² and Masaki Mishima¹

¹Department of Science and Engineering, Tokyo Metropolitan University

²Department of Information Science, Nara Institute of Science and Technology

End-binding 1(EB1) is a key molecule in the regulation of microtubule(MT) dynamics. EB1 binds to MT with its N-terminal CH domain. Further, EB1 is thought to lead MTs to cell peripherals by interactions between its C-terminal domain and other plus-end tracking proteins, APC and CLIPs and cytoskeletal proteins that locate cell membrane.

We have attempted to reveal the molecular basis of MT-regulating mechanisms by EB1 using NMR. Chemical shift perturbation experiments of CH domain with tubulin, we found that CH domain bound to only polymerized tubulin specifically in solution. To identify the binding interface of EB1 CH domain with tubulin, we conducted the transferred-cross saturation measurements. In addition, we performed chemical shift perturbation experiments of EB1 C-terminal domain with APC C-terminal region and identified their binding regions.

【序論】

EB1は微小管集積因子(+TIPs)による微小管ダイナミクスの制御機構において中心的な役割を果たしている。EB1はN末端のCHドメインにより微小管を特異的に認識し、結合する。極低温電子顕微鏡による解析から、EB1は微小管の縫い目に当たるA格子に特異的に結合、安定化することで微小管全体を安定化していると考えられている⁽¹⁾。また微小管と結合したEB1はそのC末端ドメインによりAPCやCLIPなどの他の+TIPsや細胞表層に位置する細胞骨格蛋白質と結合することにより微小管先端をその伸長の目的地の一つである細胞膜に導く(アンカリング)。しかしこれらEB1による微小管の認識機構や、アンカリング機構の詳細な分子機構は未だ明らかとなっていない。

本研究の目的はEB1による微小管ダイナミクスの制御機構の詳細な分子機構を明らかにすることである。EB1による微小管の認識機構について調べるため、化学シフト摂動法やtransferred-cross saturation法⁽²⁾によるEB1のCHドメインと微小管を構成する蛋白質tubulinとの相互作用解析を行った。またEB1による微小管アンカリング機構について調べるため、EB1と結合する+TIPsとして癌抑制遺伝子産物APCに着目し、化学シフト摂動法による相互作用の解析を行った。

EB1 +TIPs 相互作用解析

○ かなばてっぺい、もりともゆき、まえさきりょうこ、いとうゆたか、はこしまとしお、みしままさき

【実験】

・EB1のCHドメインとtubulinの相互作用解析

EB1のCHドメイン(1-130)のクローニングを行い、発現系を作成した。作成した発現系を用いて大量発現、精製を行いNMRサンプルを調製した。CHドメインによる微小管認識機構の詳細を調べるため、tubulin脱重合阻害剤taxolによって重合させたtubulinとの結合実験、重合阻害剤colchicineによって脱重合させたtubulinとの結合実験を行った。またtransferred-cross saturation法による結合界面の特定を行った。

・EB1とAPCの相互作用解析

EB1のC末端ドメイン(189-268)とAPCのC末端領域(2781-2819)について、化学シフト摂動法による両者の相互作用領域の特定を行った。

【結果・考察】

・EB1のCHドメインとtubulinの相互作用解析

CHドメインとtaxolにより重合させたtubulinとの結合実験を行ったところ、シグナルの消失が見られたことから両者の結合を確認した。また脱重合させたtubulinとの結合実験では非結合型のスペクトルが得られた。このことから溶液状態においてもCHドメインは重合したtubulinに特異的に結合することを、NMRを用いて直接明らかにすることが出来た。

重水素化したCHドメインのサンプルを用いてtransferred-cross saturation法によるtubulinとの結合界面の特定を行った(Fig.1)。その結果をCHドメインの結晶構造にマッピングを行った所(Fig.2)、結合界面は分子表面全体に分散していた。過去のmutation実験においてもCHドメインのtubulinとの結合に重要な残基は分子全体に点在していた事から⁽⁴⁾、CHドメインは分子表面全体を用いて重合したtubulinと結合していると予想される。

・EB1とAPCの相互作用解析

NMRを用いた結合実験からEB1のC末端ドメインとAPCのC末端領域の結合領域を特定することができた。またEB1のAPCとの結合領域は、微小管上を移動するモーター蛋白質dynactinのサブユニットp150^{glued}との結合領域と一致していた。このことからAPCとp150^{glued}は競合的にEB1と結合している可能性があるといえる。これら相互作用については今後分子生物学的な実験等により明らかにしていく必要があるが、本研究の結果はdynactinの運動開始のメカニズムについての知見を与える貴重な結果である。

- (1)Sandblad, L., *et al.* (2006). *Cell* 127, 1415-1424
- (2)Takahashi, H., *et al.* (2000). *Nat. Struct. Biol.* 1,53-58
- (3)Hayashi, I. and Ikura, M. (2003). *J. Biol. Chem.* 278, 36430-36434
- (4)Slep, K. C. and Vale, R. D. (2007). *Mol. Cell* 27, 976-991

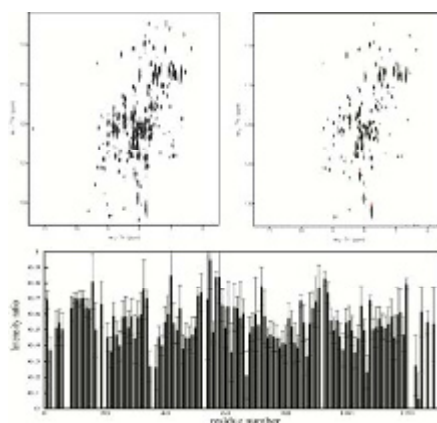


Fig.1 transferred-cross saturation experiment

(top)¹H-¹⁵N HSQC spectra of CH domain with irradiation (right) and without irradiation (left). (bottom) The plot of signal intensity ratio.

$$\text{Intensity ratio} = I_{\text{saturation}} / I_{\text{reference}}$$

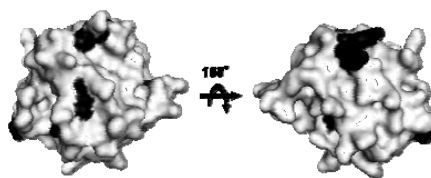


Fig.2 3D structures of CH domain

Crystal structure of EB1 CH domain⁽³⁾.

The binding regions are dark.

P32

溶液NMR法によるMBF1/Jun/Fos/DNA転写因子複合体の構造解析

○川崎久美子¹, 永井義崇¹, 広瀬進², 白川昌宏³, 伊藤隆¹, 三島正規¹

¹首都大・理工, ²国立遺伝研, ³京大・工

Structural studies of the MBF1/Jun/Fos/DNA transcription factor complex by solution NMR

○Kumiko Kawasaki¹, Yoshitaka Nagai¹, Susumu Hirose², Masahiro Shirakawa³, Yutaka Ito¹ and Masaki Mishima¹

¹Graduated School of Science and Engineering, Tokyo Metropolitan University, Hachioji, Japan.

²National Institute of genetics, Mishima, Japan.

³Graduated School of Engineering, Kyoto University, Kyoto, Japan.

Transcriptional coactivator MBF1 interacts with bZIP-type transcription factor and general transcription factor TBP. From recent studies, it is revealed that mbf1-null *Drosophila* mutants became shorter lifetime under conditions of oxidative stress.

In the present study, we performed structural studies of *Drosophila* MBF1/Jun/Fos/DNA quaternary complex. Our purpose is to reveal how MBF1 protects Jun from oxidation and interacts with Jun/fos/DNA and TBP. At present, we have succeeded to reconstruct the Jun/Fos/DNA complex and obtain its NMR spectra. We will discuss investigation of preparation quaternary complex sample, and MBF1 interaction with Jun/Fos/DNA and with TBP by NMR.

◆研究の背景と目的

転写コアクチベーターMBF1は、bZIP型転写因子と相互作用する。最近の研究からMBF1欠損のショウジョウバエは酸化ストレス環境下で短寿命になることがわかっており、MBF1が酸化ストレス防御の役割を持つと示唆されている。Jun, Fos蛋白質はヘテロ二量体をとるbZIP型転写因子で、エンハンサー領域であるDNAのAP-1siteへ結合し、転写を活性化させるが、Junの229番目のシステインが酸化修飾されるとDNAへの結合できなくなり、活性を失う。MBF1の存在下では、MBF1が229番目のシステインの酸化を防ぎ、JunのDNAへの結合活性を保つという報告がある。

本研究では、MBF1/Jun/Fos/DNAの4者複合体の立体構造解析を行い分子レベルでMBF1がJunの酸化を防御する機構を解明することを目的とする。またMBF1は当初、基本転写因子TBPと共精製され、TBPと直接相互作用する因子として発見されており、TBPとの相互作用も興味深い。そこでMBF1とTBP相互作用をNMRにより観測し、その詳細に明らかにすることも目的としている。

Transcriptional coactivator, Transcription Factor Complex

○かわさきくみこ, ながいよしたか, ひろせすすむ, しらかわまさひろ, いうゆたか, みしままさき

現在までに MBF1 単体の立体構造解析と Jun/Fos/DNA の再構成と NMR スペクトル取得 (Fig. 1) に成功している。

◆ Jun/Fos/DNA 複合体試料の調製

ショウジョウバエ由来の Jun/Fos/DNA 複合体試料 (Fig. 1) の収量は極めて低く、構造解析や相互作用を議論できるような NMR 測定は困難であった。特に Fos の分解が問題であった。そこで、Fos の発現系の再構築に取り掛かった。チオレドキシシタグとの融合蛋白質として発現させ、Fos の構造をより安定化させ分解を防ぐことを試みた。

まず、fos 遺伝子を pET-48 ベクターへクローニングし、His タグ、チオレドキシシ融合蛋白質発現できる発現系を作成した。

その結果、チオレドキシシ融合の Fos と見られるタンパク質が発現しており、可溶性画分に存在することが確認できた。今後、jun 遺伝子が組み込まれたプラスミドをさらに大腸菌内へ組み込み、Fos との共発現、DNA との共精製を行っていく。

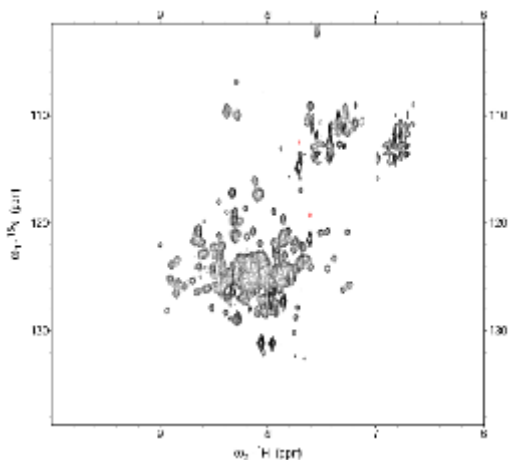


Fig. 1 ^1H - ^{15}N TROSY
0.05 mM D ^{15}N -labeled Jun/Fos/CRE

◆ TBP の試料調製、MBF1 との相互作用実験

はじめにショウジョウバエ由来 TBP の発現・精製を行ったところ、TBP の多くが不溶性画分に存在し、容易に凝集、分解を起こし蛋白質の回収が極めて困難であった。そこで、TBP の安定化を図るため、DNA との共精製を試みた。TBP を大腸菌内で GST タグ融合タンパク質として発現させ、大腸菌を超音波破碎し、可溶性画分を用いて陰イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーを行った。GST タグ融合 TBP が存在する分画を回収し、TATA box の配列を含む短い二本鎖 DNA を加えた。DNA はパリンδροミックな配列を用い、1 種類の一本鎖 DNA 同士で二本鎖を形成させたのち、NMR の 1D 測定でイミノ領域のシグナルがでていることを先に確認済みである。その後、GST タグを

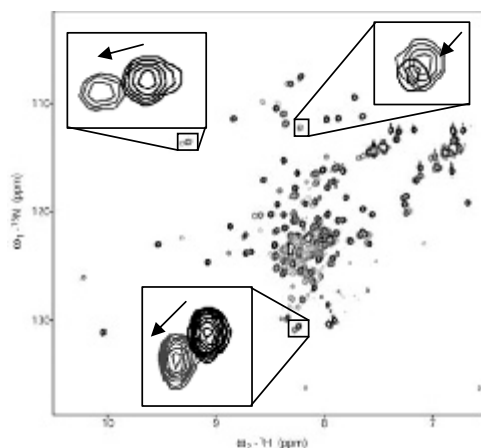


Fig. 2 ^1H - ^{15}N HSQC
black: 0.025 mM ^{15}N -labeled MBF1.
gray: 0.025 mM ^{15}N -labeled MBF1 with
TBP/DNA (1:1).

切断し、ゲル濾過クロマトグラフィーを行った。DNA を加えない場合には二量体の分子量の分画に存在していた TBP が、DNA との共精製では、より低分子量の分画に存在し、TBP/DNA 複合体の単量体として回収することに成功した。 ^{15}N ラベル MBF1 試料、 ^{15}N ラベル MBF1 と TBP/DNA を 1:1 の比で調製した試料を準備し、NMR で ^1H - ^{15}N HSQC を測定した。

MBF1 と TBP/DNA が 1:1 で存在する試料では、スペクトルにシグナル強度変化と化学シフト変化が見られた (Fig. 2)。結果を解析し、MBF1 が TBP/DNA と相互作用する部位を調べていく。

P33

Dynamics Study of Aromatic Rings by the SAIL-NMR Method upon Ligand Binding

○楊淳竣¹, 武田光広², JunGoo Jee¹, 小野明³, 寺内勉³, 甲斐荘 正恒^{1,2}
¹首都大院・理工 ²名大院・理 ³SAILテクノロジーズ (株)

Dynamics Study of Aromatic Rings by the SAIL-NMR Method upon Ligand Binding

○Chun-Jiun Yang¹, Mitsuhiro Takeda², JunGoo Jee¹, Akira Mei Ono³, Tsutomu Terauchi³, and Masatsune Kainosho^{1,2}

¹Graduate School of Science and Engineering, Tokyo Metropolitan University. ²Graduate School of Science, University of Nagoya. ³SAIL Technologies.

Abstract

SAIL (Stereo-Array Isotope Labeling) provides new opportunities for studies of biomolecules by NMR. For instance, considerable information can be obtained by studying aromatic side-chains. Besides simplifying the signals, SAIL can suppress unwanted tight couplings, which are difficult to avoid with conventional labeling. The resultant superb qualities facilitate the characterization of the ring flipping in Phe and Tyr. Here, we report the application of the SAIL method to study protein-ligand interactions. Using proteins labeled by various SAIL-Phe and SAIL-Tyr residues, we observed the changes of the NMR signals upon ligand binding. The underlying dynamics will also be discussed.

An intimate relationship exists between the dynamics and the biological functions of proteins. NMR is an excellent tool for studying protein dynamics. NMR experiments can detect site-specific motions over a large timescale, ranging from picoseconds to seconds, with the aid of isotope labeling. However, studies of aromatic side-chain dynamics by NMR have been difficult, although non-covalent interactions through aromatic side-chains are crucial for structural stability and protein-ligand recognition. Insufficient chemical shift dispersion hampers the analysis or even the assignment of chemical shifts with conventional uniformly-labeled samples. The existence of tight couplings further hinders unambiguous interpretation. SAIL (Stereo-Array Isotope Labeling), which is well-known as an optimal isotope labeling strategy for protein structure determination by NMR, provides excellent probes to study protein motion. In the case of aromatic amino acids, the alternative ²H, ¹³C-labeling patterns (Fig. 1) lead to not only NMR signal simplification, but also superb

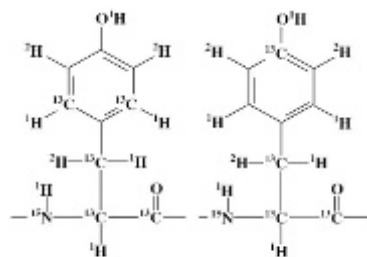


Fig. 1 δ -SAIL Tyr (left) and ζ -SAIL Tyr (right)

Keywords: SAIL, Protein-ligand interaction

○やんちゅんじん, たけだみつひろ, じゅんぐーじー, おのあきら, てらうちつとむ, かいのしょう まさつね

spectral qualities, by removing the tight couplings. By taking full advantage of SAIL-Phe and SAIL-Tyr, we have studied aromatic motions upon ligand binding. We analyzed FK506-binding protein 12.6 (FKBP12.6) in this study. FKBP12.6 is a member of the FKBP family, and it also exhibits peptidyl-prolyl isomerase activity. It shares 83% sequence identity to FKBP12, has a nearly identical structure, and binds to the same immunosuppressive drugs (e.g. FK506 and rapamycin) with comparable affinities. Samples labeled with various types of SAIL-Phe or SAIL-Tyr were prepared, and we monitored the signal changes upon binding to two ligands, FK506 and rapamycin. Interestingly, the two ligands caused different changes in the aromatic flipping rates of a Tyr residue, although they showed almost identical binding modes in the crystal structures with FKBP12 (Fig. 2). Even though we observed line broadening in the case of rapamycin, FK506 generated separated peaks in $^1\text{H}_\delta\text{-}^{13}\text{C}_\delta\text{1}/^1\text{H}_\delta\text{-}^{13}\text{C}_\delta\text{2}$ and $^1\text{H}_\varepsilon\text{1-}^{13}\text{C}_\varepsilon\text{1}/^1\text{H}_\varepsilon\text{2-}^{13}\text{C}_\varepsilon\text{2}$ spectra, even at ambient temperature, suggesting a slower flipping rate. On the other hand, both ligands considerably reduced the hydroxyl proton exchange rates in all of the Tyr residues (Fig. 3). The complexes in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (1:1) caused splitting in the $^{13}\text{C}_\zeta$ chemical shifts, originating from the two-bond isotope effect, which was not averaged due to the slow H-D exchange. We will discuss the relationship between the motions of the aromatic side-chains and the ligand binding.

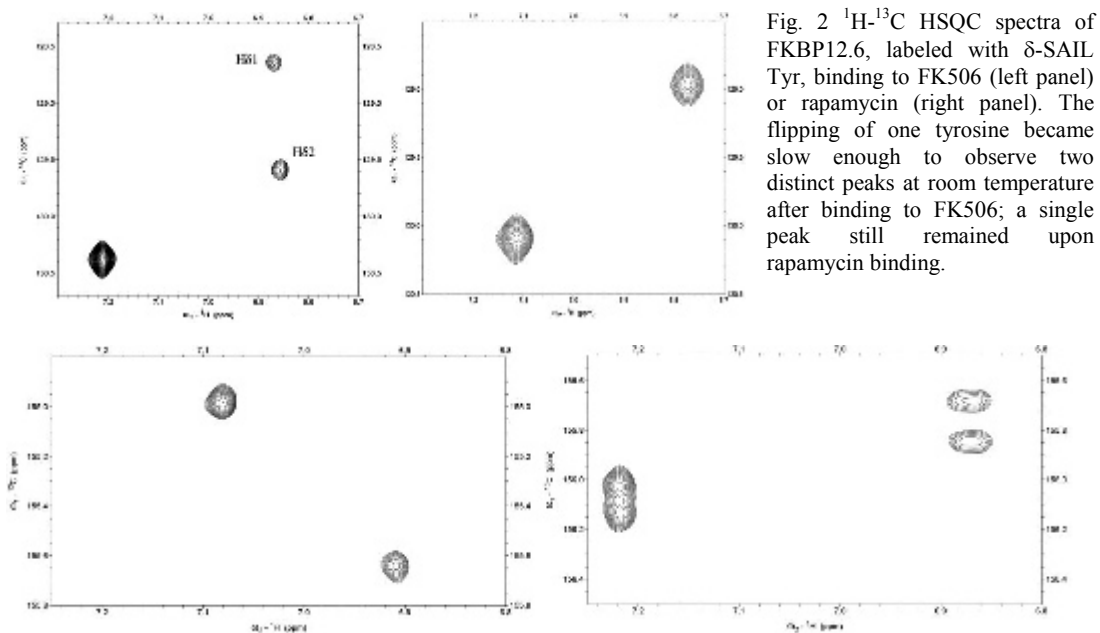


Fig. 2 ^1H - ^{13}C HSQC spectra of FKBP12.6, labeled with δ -SAIL Tyr, binding to FK506 (left panel) or rapamycin (right panel). The flipping of one tyrosine became slow enough to observe two distinct peaks at room temperature after binding to FK506; a single peak still remained upon rapamycin binding.

Fig. 3 ^1H - ^{13}C HSQC spectra of FKBP12.6 labeled with ζ -SAIL Tyr in an $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (1:1) solution, at 30 degrees. Cross peaks indicate correlations through long-range coupling between $^1\text{H}_\delta$ and $^{13}\text{C}_\zeta$. Left and right panels represent free and FK506-complexed FKBP12.6, respectively.

References

1. Kainosho, M. et al. (2006) *Nature*, 440, 52-57.
2. Takeda, M., Ono, A. M., Terauchi, T. & Kainosho, M. (2009) *J Biomol NMR*, 46, 45-49.
3. Takeda, M., Jee, J., Ono, A. M., Terauchi, T. & Kainosho, M. (2009) *J Am Chem Soc*, 131, 18556-18562.

P34

タキプレシンとリポ多糖複合体の構造解析

榎引崇弘¹、○神谷昌克¹、相沢智康¹、熊木康裕²、菊川峰志¹、出村誠¹、川畑俊一郎³、河野敬一¹

¹北大・院生命

²北大・院理

³九大・院理

Structural analysis of Tachyplestin-LPS complex

Takahiro Kushibiki¹, ○Masakatsu Kamiya¹, Tomoyasu Aizawa¹, Yasuhiro Kumaki², Takashi Kikukawa¹, Makoto Demura¹, Shun-ichiro³ Kawabata, and Keiichi Kawano¹

¹Graduate School of Life Science, Hokkaido University, Sapporo, Japan.

²Graduate School of Science, Hokkaido University, Sapporo, Japan.

³Graduate School of Science, Kyushu University, Fukuoka, Japan.

Tachyplestin (TP) is an antimicrobial peptide found in hemocytes of the horseshoe crab *Tachypleus tridentatus*. TP is a 17-residue peptide containing six cationic residues and two disulfide bonds, amidated its C termini. It has been reported that TP binds to lipopolysaccharide (LPS), a major component of Gram-negative bacteria. LPS-binding antimicrobial peptides can neutralize LPS-induced toxicity and thus are potentially useful for treatment of septic shock. To gain a better understanding of the LPS recognition of TP, we performed the structural analysis of TP in the presence of LPS.

In this study, we performed CD, fluorescence and NMR spectroscopies for TP with LPS. Based on these results, the model structure of TP-LPS complex was proposed by docking simulation.

【緒言】グラム陰性菌の外膜にはリポ多糖(LPS)が含まれており、敗血症を引き起こすことが知られている。敗血症は世界的に深刻な病気であり、未だ有効な治療法は確立されていない。そのため、LPSをターゲットとしている抗菌ペプチドの研究は、新たな治療薬の開発に繋がると期待されている。しかし、抗菌ペプチド

の構造と活性の相関およびLPSに対する作用機構の詳細については不明な点が多い。本研究ではカプトガニ由来の抗菌ペプチドであるタキプレシンI (TP) (Fig. 1)とLPSの複合体の立体構造解析を行い、抗菌ペプチドの構造と機能の詳細な関係を明らかにし、細菌に対する抗菌ペプチドの作用機序の一端を明らかにすることを目的とする。

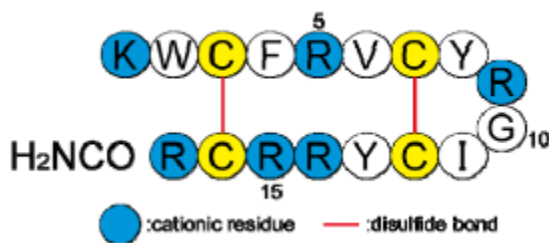


Fig. 1 Primary structure of tachyplestin I

Antimicrobial peptide, LPS, trNOE

○くしびきたかひろ、かみやまさかつ、あいざわともやす、くまきやすひろ、きくかわたかし、でむらまこと、かわばたしゅんいちろう、かわのけいいち

【実験】LPSによるTPの構造変化を調べるために、紫外波長領域(190-250 nm)のCD測定を行った。次にTPの内部トリプトファンの蛍光およびアクリルアミドによる蛍光の消光を、LPS存在下・非存在下で測定した。さらにTPにLPSを滴定し、1D-NMRおよびTr-NOESYの測定も行った。Tr-NOESYの結果を用いてLPS結合状態でのTPの立体構造を計算し、ドッキングソフト(AutoDock)によりLPSとTPの複合体構造を求めた。

【結果と考察】TPの紫外部CDスペクトルは逆平行 β シートとターン構造を示す。LPSの添加により、スペクトルは変化するが、CDバンドの波長はおおよそ同様の値を示した。このことはLPS存在下でTPの構造変化は小さいことを示唆する。次に蛍光スペクトルを測定した。TPの蛍光スペクトルはLPSの添加により30 nmほどブルーシフトした。このことは、TPのトリプトファン残基がLPSとの相互作用に関わっていることを示す。また、アクリルアミドによる蛍光消光実験の結果はTPのトリプトファン残基がアクリルアミドから保護された状態にあることを示し、LPSミセル内部にトリプトファン残基が埋もれた状態にあることを示唆した。NMRによるLPSの滴定実験により、TPのN、C末端領域のアミノ酸残基の原子に帰属されるピークが選択的に幅広化し、TPの両末端部分の領域がLPSとの結合部位であることが示唆された。LPS存在下でのtrNOE測定によりLPS結合状態でのTPの構造計算を行った(Fig. 2)。最終的にこれらの結果を元にTP-LPS複合体のドッキング計算を行った。

ドッキング計算で得られた複合体構造からTPの塩基性残基がLPSの糖部分に、Trp2やPhe4が脂肪鎖に配向することが示唆された(Fig. 3)。

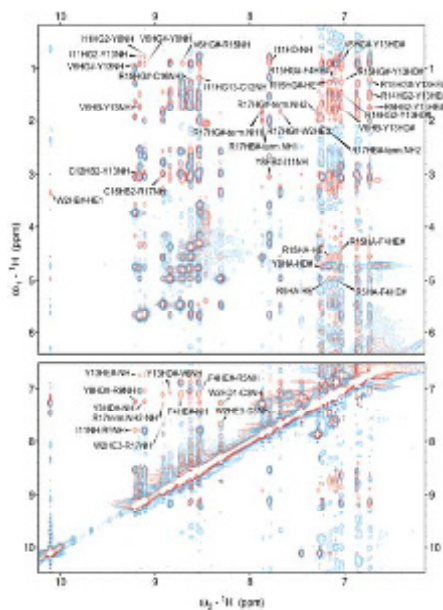


Fig. 2 NOESY spectra for TP and TP-LPS.

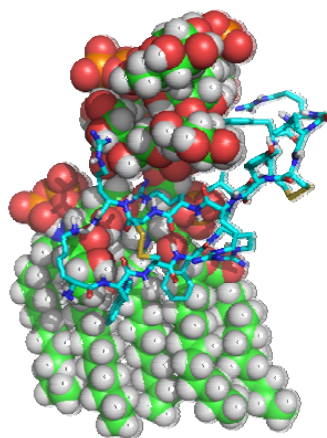


Fig. 3 Model structure of TP-LPS complex.

P35

NMR 解析に基づくマウス外分泌ペプチド ESP4 の立体構造と受容体特異的認識に関する研究

○谷口 雅浩¹、吉永 壮佐¹、はが 紗智子²、東原 和成²、
寺沢 宏明¹

¹熊本大学大学院薬学教育部、²東京大学大学院農学生命科学研究科

Structure and specific ligand-receptor recognition mechanism of mouse peptide ESP4 based on NMR analyses

○Masahiro Taniguchi¹, Sosuke Yoshinaga¹, Sachiko Haga², Kazushige Touhara²,
Hiroaki Terasawa¹

¹Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kumamoto University

²Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo

Pheromones are defined as chemical substances that convey information about social and reproductive behaviours in the same species. Recently, we identified a male-specific 7 kDa peptide from the extraorbital lacrimal gland (ELG) and named the peptide exocrine gland-secreting peptide 1 (ESP1). ESP1 is a member of a new multigene family, which consists of 38 genes². ESP4 is expressed in ELG, Harderian gland and submaxillary gland of both male and female. The aim of this study is to elucidate a ligand-receptor recognition mechanism of the ESP family based on structural analyses. We found that distribution of electrostatic surface potential of ESP4 is quite different from that of ESP1, which is important for the VSNs-stimulating activity of ESP1. We discuss about structure-activity relationship of ESP4 and ESP1 based on NMR analyses.

【序論】

フェロモンとは、同じ種の間で、社会行動や生殖行動に影響を与える物質である。多くの哺乳動物は、鼻腔下部にある鋤鼻器官でフェロモンを感知すると考えられている。フェロモンの重要な働きとして、同種の別個体を正確に認識する役割がある。個体認識の仕組みを理解する上で、受容体がどのようにしてフェロモンを厳密に認識するかを理解することは重要であるが、特異性発現のメカニズムの理解は十分でない。

東原らは、オスマウスの涙より分泌される新規ペプチドを同定した¹。このペプチドが外分泌腺に分泌されることから、ESP (exocrine gland-secreting peptide) 1 と命名し、38種類からなる新規の多重遺伝子ファミリー (ESP ファミリー) を構成することを明らかにした²。ESP4 は、外分泌腺のうち、眼窩外涙腺、顎下腺、ハーダー腺に分泌されており、ESP1 とのアミノ酸配列の相同性が高い。我々は、ESP4 が ESP1 と異なる受容体で認識されることを示唆する結果を得ている。

フェロモン、ESPファミリー、特異的認識

○たにぐちまさひろ、よしながそうすけ、はがさちこ、とうはらかずしげ、てらさわひろあき

本研究は、ESP4 の立体構造および受容体認識機構を解明し、構造生物学の観点から、受容体の厳密なリガンド識別機構を明らかにすることを目的とする。

【実験】

$^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 標識した ESP4 を大腸菌の発現系により大量に発現させ、ニッケルアフィニティクロマトグラフィーにより粗精製を行い、ゲル濾過クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィーにて精製した。精製した試料を用いて、各種の多核多次元 NMR 測定を行い、信号の帰属を行った。また、詳細な立体構造情報を得るために、遠距離の ^1H 間 NOE 信号を取得することを目的として、 α -ケト酸を用いて Ile/Val/Leu のメチルを選択的に標識した試料を調製し 3D-NOESY 測定を行った。NMR 測定は Bruker 社製クライオプローブ付属 AVANCE600 を用い、スペクトル解析には Olivia を使用した。

【結果と考察】

大腸菌を用いて発現した結果、ESP4 は単量体とジスルフィド結合に起因する二量体を形成していた。逆相クロマトグラフィーにて単量体と二量体を分離・精製し、マウス鋤鼻器官における鋤鼻神経系刺激活性を調べたところ、単量体のみが活性を持つことが分かった。また、単量体 ESP4 による刺激を受けた細胞は、ESP1 受容体を発現している細胞とは異なることから、これらの受容体が異なることが強く示唆された。

ESP4 単量体の立体構造決定に向けて、 $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 標識した ESP4 を用いて 各種の三次元測定を行い、NMR シグナルの帰属を完了した。 ^{15}N および ^{13}C -NOESY スペクトルから得られる ^1H 間の距離情報と、HNHA スペクトルおよび化学シフト値から得られる主鎖二面角の情報をもとに立体構造解析を行った結果、ESP4 は C 末端領域に ESP1 には見られないヘリックス構造を持つことが示唆された。当研究室で立体構造を決定した ESP1 と比較すると、ESP4 の表面における電荷分布は、ESP1 の受容体結合面における電荷分布と大きく異なることが推察された。ESP4 に特徴的な C 末端領域のヘリックス構造の存在と、分子表面における電荷分布の違いの関与を明らかにするために、ESP4 の立体構造決定に向けて NMR 解析を進めている。

【展望】

今後は、「1つのリガンドに対して受容体は1つである」というフェロモン認識における仮説³⁾を解明するために、ESP4 と ESP1 での受容体認識の差異を構造生物学的観点から明らかにしていく。

【参考文献】

- ¹⁾ Kimoto H. *et al.*, *Nature*, **437**, 898-901 (2005)
- ²⁾ Kimoto H. *et al.*, *Current biology*, **17**, 1879-1884 (2007)
- ³⁾ Luo M. *et al.*, *Current Opinion in Neurobiology*, **14**, 428-434 (2004)

P36

ピロ化A β のオリゴマー形成に関する構造生物学的研究

○岩本 成人¹、斉藤 貴志²、河野 俊之³、西道 隆臣²、
寺沢 宏明¹

¹熊大院・薬、²理研・BSI、³三菱化学・生命研

Structural study for oligomerization of pyroglutamyl-amyloid beta peptides

○Shigeto Iwamoto¹, Takashi Saito², Toshiyuki Kohno³, Takaomi C. Saido², Hiroaki Terasawa¹

¹Facul. of Life Sci., Kumamoto Univ., ²RIKEN BSI, ³Mitsubishi Kagaku Inst., Life Sciences

Amyloid beta peptides (A β) are thought to be neurotoxic polypeptide in Alzheimer's disease (AD), one of the most common pathology of late-onset dementia. Previously, it was said that neurotoxicity of AD was caused by amyloid fibrils. However, recent physiological studies indicate that A β oligomers, intermediates in the formation of amyloid fibrils, may be potent neurotoxins in AD patients. N-terminal pyroglutamyl-A β peptides (A β (3pE)) have been reported to be resistant to degradation and prone to aggregation. Moreover, A β (3pE) predominantly comprises senile plaques in AD patients. In order to elucidate the role of A β (3pE) on the formation of A β oligomers, we performed solution NMR analyses of A β (3pE) and A β . Our results indicate that A β (3pE) may play a critical role in the formation of A β oligomers by forming a β -sheet at the N-terminal regions.

【背景・目的】

社会の高齢化とともに、認知症の患者数は増加の一途をたどっている。主要な認知症の一つであるアルツハイマー病 (AD) は、患者数が世界で1800万人に達しており、早期の診断・予防・治療法の確立が求められている。アミロイドベータペプチド (A β) は、アルツハイマー病 (AD) 患者に典型的病理として認められる老人斑の構成主体である。従来、老人斑を形成するアミロイド線維が、ADの神経毒性の原因と考えられてきた。しかし、近年、アミロイド線維を形成する前の中間体であるA β オリゴマーが、より強い毒性を有するということが示されてきた[1]。A β は主に、カルボキシル末端の長さが異なるA β (1-40) とA β (1-42) からなり、A β (1-42) は凝集性が高いことが知られている。また、A β はアミノ末端のピロ化により、さらに毒性が強まるといふ報告もある[2]。ピロ化A β は、アミノ末端の1, 2番目のアミノ酸がアミノペプチダーゼによって切断され、3番目に位置するグルタミン酸の側鎖がグルタミルシクラーゼにより環化されることで生じる。さらに、老人斑を構成するA β には様々な分子種が存在するが、ピロ化A β は健常者に比べてAD患者に多いことも知られている[3]。本研究は、毒性が強いとされるピロ化A β についてNMR解析を行い、オリゴマー形成におけるピロ化A β の果たす役割を明らかにすることを目的とする。

キーワード：アミロイドベータペプチド、アルツハイマー病、NMR

○いわもとしげと、さいとうたかし、こうのとしゆき、さいどうたかおみ、
てらさわひろあき

【実験】

^{15}N 標識、 ^{13}C , ^{15}N 標識 A β を遺伝子組換え大腸菌を用いて大量発現させた。ニックルアフィニティークロマトグラフィーによる粗精製の後、YUH (Yeast Ubiquitin Hydrolase) によってタグ部を切断し、逆相クロマトグラフィーを用いて精製を行った。得られた安定同位体標識 A β を用いて、 ^1H - ^{15}N HSQC 測定、各種 3 次元測定を行った。また、凝集能の高いピロ化 A β についても、同様に精製法を確立した。さらに、安定同位体標識したピロ化 A β を用いて、 ^1H - ^{15}N HSQC 測定、各種 3 次元測定による主鎖帰属を進めた。NMR 測定は、Bruker 社の 500 MHz, 600 MHz (CRYOPROBE 付) の NMR 装置を用いて行い、スペクトル解析には NMRPipe, Olivia を使用した。

【結果・考察】

安定同位体標識した A β を大量に得るため、ユビキチン融合タンパク質として A β を大量発現できる発現系を構築した。そして、融合タンパク質として A β を発現することで、A β の凝集抑制・発現量増加を達成した。A β は、ピロ化によって、アミノ末端の電荷減少・疎水性の増大が見られ、その凝集能が増大することが知られている。そのため、変性剤である尿素を精製段階に加え、A β の凝集を抑制することができた。さらに、アミノ末端のピロ化を促進する溶液条件についても検討を行った。

安定同位体標識 A β を用いた各種多核多次元 NMR 測定の結果、ピロ化 A β のモノマー状態のコンフォメーションは、その毒性に強く関与しないことが示唆された。さらに、化学シフト値に基づく二次構造予測を行ったところ、ピロ化 A β では、A β と比較して、アミノ末端領域が β ストランド傾向に大きく変化していることが分かった。また、様々な温度条件下で ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルを測定したところ、ピロ化 A β では、A β に比べ、アミノ末端領域のシグナル強度が、温度上昇に伴い著しく減少した。これらの結果から、ピロ化 A β は、アミノ末端における β シート構造の形成と、アミノ末端同士の分子間相互作用によって、低分子オリゴマーを形成しやすくなっている可能性が示唆された。

さらに、光架橋法である PICUP (Photo-Induced Cross-linking of Unmodified Proteins) [4] を行った結果、A β (1-40) では、ピロ化によって低分子オリゴマーの形成が促進されることが分かった。その一方、A β (1-42) では、高分子量のオリゴマー形成が抑制され、4 量体以下の低分子オリゴマーが増加する可能性が示唆された。また、PICUP によって架橋した A β (1-40) オリゴマーについて、逆相クロマトグラフィーを用いることで、モノマーとダイマー、トライマーを分離することができた。

【展望】

PICUP によって安定化した A β オリゴマーについて NMR 測定を行い、A β のオリゴマー化に関与するアミノ酸残基を特定する。また、A β とピロ化 A β 、および各 A β オリゴマーをラット脳内に投与した後、行動実験と MRI 測定によって、神経毒性を発現する A β 分子種を同定する。さらに、神経障害を引き起こす A β オリゴマーのサイズを同定する。

【参考文献】

- [1] Hardy, J. *et al.*, *Science*, **297**, 353-356, (2002)
- [2] Saido, T.C. *et al.*, *Neuron*, **14**, 457-466, (1995)
- [3] Piccini, A. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **280**, 34186-34192, (2005)
- [4] Bitan, G. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **276**, 35176-35184, (2001)

P37

Mal TIRドメインの溶液構造

狩野裕考¹ 榎園能章² ○久米田博之² 小椋賢治² 瀬谷司³
稲垣冬彦²

¹北海道大学大学院 生命科学院 構造生物学研究室

²北海道大学大学院 先端生命科学研究院 構造生物学研究室

³北海道大学大学院 医学研究科免疫学分野

Solution structure of Mal TIR domain.

Hiroataka Kanou¹, Yoshiaki Enokizono², ○Hiroyuki Kumeta², Kenji Ogura²,
Tsukasa Seya³, and Fuyuhiko Inagaki²

¹*Lab. Struct. Biol., Grad. Sch. Life Sci., Hokkaido Univ.*

²*Lab. Struct. Biol., Advanced Life Sci., Hokkaido Univ.*

³*Dep. Microbiol. Immunol., Grad. Sch. Med.*

Toll / interleukin-1 receptor (TIR) domain is a key mediator in the Toll-like receptor (TLR) signaling. The adaptor protein MyD88 adapter-like (Mal) is involved in the MyD88-dependent pathway downstream of TLR2 and TLR4. It acts as a bridging adapter between the receptor and the sorting adapter MyD88. The homo- and hetero-oligomerization of the TIR domains of these receptors and adaptors brings about the activation of NF- κ B and IRF-3, which regulate the synthesis of pro-inflammatory cytokines and IFN- β , respectively. Here, we solved the solution structure of the homo-oligomerization defective mutant of TIR domain of Mal, and will discuss the TIR-TIR interaction of the TLRs and adaptor proteins.

Toll / interleukin-1 receptor (TIR)ドメインは自然免疫応答である Toll-like receptor (TLR)シグナルにおいて重要な役割を担っている。膜外領域で病原体由来刺激を受けた TLR は、刺激依存的にホモまたはヘテロ二量体を形成し、その結果、細胞内領域にある TIR ドメインが近接する事で活性化する。活性化した TLR の TIR ドメインは細胞内アダプター分子の TIR ドメインとヘテロオリゴマーを形成し、下流へとシグナルを伝達する。

TIRドメインを含む細胞内アダプター分子には、Myeloid differentiation primary response gene88 (MyD88), MyD88 adaptor-like (MalまたはTIRAP), TIR containing adaptor molecule-1 (TICAM-1またはTRIF)および2 (TICAM-2またはTRAM) , とsterile α -motif and HEAT/armadillo repeats (SARM)の5種がある。MalはTLR-1/TLR-2またはTLR-6/TLR-2ヘテロダイマーおよびTLR4の下流に存在し、MyD88を経由しNF- κ Bを産生する。TICAM-1はTLR3またはTLR4の下流に存在し、Mal / MyD88経路とは独立に機能し、インターフェロンを産生する。TICAM-2はTLR-4からTICAM-1へのシグナル伝達を仲介する。このように各TIRドメインは、厳密に相互作用相手となる他のTIRドメインを識別してシグナルを正確に下流へと伝達する。

キーワード : Mal, TIRドメイン

かのう ひろたか, えのきぞの よしあき, ○くめた ひろゆき, おぐら けんじ, せや つかさ, いながき ふゆひこ

これらのアダプターTIR ドメインのうち MyD88 の構造が他のグループから既に報告されており、我々が昨年の NMR 討論会において、TICAM-1 および TICAM-2 について報告した。本発表では、Mal-TIR の構造解析を行い、MyD88 およびレセプターTIR ドメインとの相互作用について考察を行う。また、他のレセプターおよびアダプター TIR ドメインとの構造比較から、TLR 下流における TIR ドメインを介したシグナル伝達機構全般について考察を行う。

[結果・考察] 野生型ヒト由来MalのTIRドメインは他の多くのTIRドメインと同様に高い濃度域 (μM オーダー) において自己会合性を示すため、構造解析が困難であった。我々が以前に作成したTICAM-1-TIRおよびTICAM-2-TIRの自己会合体形成を抑制するBB-loop上の一アミノ酸変異体をMal-TIRに導入しても、自己会合性を抑制できなかった。そこで、他のアダプターTIRドメインをベースにしたMalの立体構造予測およびオルソログを用いた変異実験による検討、さらに $[^1\text{H}-^{15}\text{N}]$ HSQCを用いた溶液条件の検討を行う事で、高い濃度域においても自己会合を抑制したヒト由来Mal TIRドメインの変異体を得る事に成功した。この変異体を用いて各種NMR測定による信号帰属およびCYANAを用いた立体構造決定を行った (下図)。

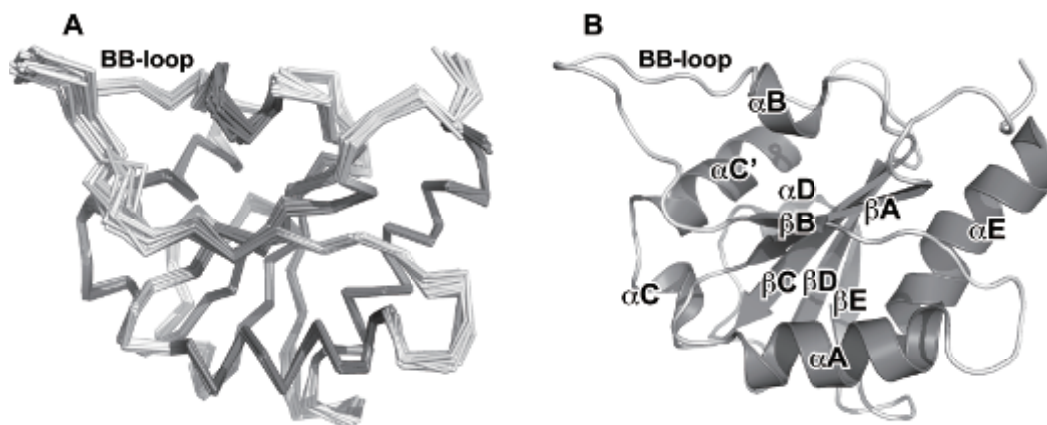


Fig. Solution structures of Mal TIR domain. (A; 20 ensemble, B; ribbon diagram)

得られたMalのTIRドメインの立体構造は、レセプターおよびアダプター由来のTIRドメイン同様に $\alpha/\beta/\alpha$ の三層からなるflavodoxin-like foldを有していた。そして静電ポテンシャルを分子表面にマッピングしたところ、変異箇所周辺は大きく塩基性面を呈していた。この事からTICAM-1およびTICAM-2とは異なる面で、静電相互作用を介した自己会合が示唆された。現在、得られた構造を基にレセプターからMyD88へとシグナルを伝達する分子機構についてMalの機能解析を行っている。

In-cell NMR を用いた生細胞内におけるカルモジュリン N 末端ドメインの高次構造解析

○細谷沙織¹, 濱津順平¹, 佐々木敦子¹, 榊原大介¹, 三島正規¹,
吉益雅俊², 林 宣宏³, 伊藤 隆¹
¹首都大院・理工, ²理研・生体超分子, ³東工大院・生命理工

Structural analysis of Calmodulin N-terminal domain in living cells by in-cell NMR spectroscopy

○Hosoya Saori¹, Hamatsu Junpei¹, Atsuko Sasaki¹, Daisuke Sakakibara¹, Masaki Mishima¹,
Masatoshi Yoshimasu², Nobuhiro Hayashi³ and Yutaka Ito¹
¹Department of Chemistry, Tokyo Metropolitan University;
²Research Group for Bio-supramolecular structure and function, RIKEN;
³Department of Life Science, Graduate School of Bioscience and Biotechnology, Tokyo
Institute of Technology

Recently we showed the structure of the putative heavy-metal binding protein TTHA1718 from *Thermus thermophilus* HB8 overexpressed in *Escherichia coli* cells, which is the world first 3D protein structure calculated exclusively on the basis of information obtained in living cells. In this presentation, as one of the examples of the application of our strategies, we report our recent in-cell NMR studies of the N-terminal domain of rat Calmodulin (CaM-N) overexpressed in *E. coli* cells. Rapid data collection using nonlinear sampling with maximum entropy processing was employed for the measurement of 3D triple-resonance NMR spectra. Approximately 70% of backbone resonances of CaM-N were assigned exclusively from the data obtained in living *E. coli* cells. Side-chain resonance assignment and the analysis of 3D NOESY spectra of CaM-N in *E. coli* cells are in progress.

【序】

カルシウム結合蛋白質であるカルモジュリン(以下CaMと略記)は真核細胞内に普遍的に存在しており, 既知のカルシウム依存性の細胞機能のほとんどに関与している. CaMのN末端およびC末端はそれぞれ2つのEFハンドを持つ球状ドメインで構成され, これら2つの球状ドメインは中心が折れ曲がりフレキシブルに動く α -ヘリックスによって結ばれている.

CaMについては, Ca²⁺と結合していないapo-form, Ca²⁺と結合したholo-formの双方で構造生物学的研究がなされており, Ca²⁺と結合することによって, EFハンドを構成するヘリックスの配向が変わって疎水部分が外側にむき出しになり, 他の蛋白質と相互作用することで活性調節を行うことが明らかになっている. このように, CaMは周囲のCa²⁺の濃度変化に反応して立体

キーワード: In-cell NMR, 異種核多次元NMR, 立体構造

○ほそや さおり, はまつ じゅんぺい, ささき あつこ, さかきばら だいすけ,
みしま まさき, よしまた まさとし, はやし のぶひろ, いたう ゆたか

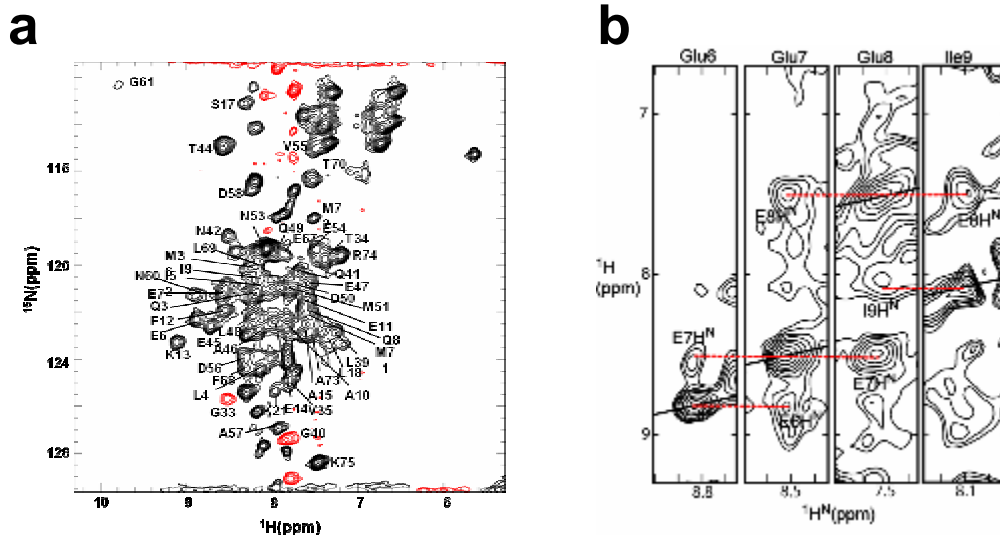
構造を変化させることで機能を発揮すると考えられることから、細胞内の環境変化に伴うCaMの実際の挙動を生細胞内において「その場観察」することに対する関心が高まっている。

そこで本研究では、CaMのN末端ドメイン(以下CaM-Nと略記)に着目し、in-cell NMRによる高次構造解析を試みた。In-cell NMRは生細胞内から蛋白質のNMRシグナルを観測する手法で、本研究室ではこのin-cell NMRを利用し世界で初めて生細胞内における蛋白質の高次構造解析に成功している[Sakakibara et al. 2009]。

【実験、結果、および今後の展望】

大腸菌内大量発現系を用いて、in-cell NMR法による細胞内CaM-Nの ^1H - ^{15}N HSQC測定、および3D HNCA, HN(CO)CA, HNCO, CBCANH, CBCA(CO)NHの測定を行った。3D 三重共鳴 NMR の間接観測軸には非線形サンプリング法を用い、短時間で良好なスペクトルを得ることに成功した。スペクトルを解析した結果、主鎖シグナルの約70%の帰属に成功した(Figure 1a)。帰属されなかった約30%の領域は Ca^{2+} 結合領域に近接しており、当該領域が Ca^{2+} 非存在下でフレキシブルな性質を示すことにより、主鎖 NMR シグナルがブロードニングしている可能性が考えられる。

さらに、NOE由来の高次構造情報の取得を試みた。同様に非線形サンプリング法を適用することによって、短時間で良好な3D ^{15}N -separated NOESY-HSQC スペクトルを得た。シーケンシャルな $\text{H}^{\text{N}}\text{-H}^{\text{N}}$ NOE(Figure 1b)に加えて long range の NOE も観測されていることから、in-cell NMR を用いた CaM-N の立体構造解析は十分可能であることが示唆される。現在、3D 三重共鳴 NMR を用いて蛋白質側鎖 NMR シグナルの帰属を進めるとともに、3D ^{15}N -separated NOESY-HSQC スペクトルの解析を行っている。さらに、メチル基選択的 $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ 標識試料を用いた、メチル基間の距離情報の選択的解析も計画しており、生細胞内環境での立体構造解析を目指す。



a. 2D ^1H - ^{15}N HSQC spectrum of the $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -labelled CaM-N in living *E.coli* cells. Cross peaks are labelled with their corresponding backbone assignments.

b. ^1H - ^1H cross-sections of the 3D ^{15}N -separated NOESY-HSQC spectrum corresponding to the ^{15}N frequencies of residues from Glu6 to Ile9. Sequential $\text{H}^{\text{N}}\text{-H}^{\text{N}}$ NOEs are represented by lines.

P39

(発表取消のため欠番)

P40

¹⁹F 標識タンパク質を用いたヒト細胞における in-cell NMR

○村山秀平¹, 猪股晃介¹, 大野綾子², 大西 秀典³, 朽尾豪人¹,
白川昌宏¹

¹京大・工学研究科

²徳大・ヘルスバイオサイエンス研究部

³岐阜大・医・小児科

¹⁹F NMR spectroscopy of proteins in human cells

○Syuhei Murayama¹, Kohsuke Inomata¹, Ohno Ayako², Hidehito Tochio¹, Masahiro Shirakawa¹

¹Graduate School of Engineering, Kyoto University, Japan.

²Graduate School of Nutrition, The University of Tokushima, Tokushima, Japan.

³Department of Pediatrics Graduate School of Medicine, Gifu University, Gifu, Japan

In-cell NMR is an isotope-aided NMR technique that enables observations of conformations and functions of proteins in living cells at the atomic level. So far, the method has relied on 2D ¹H-¹⁵N correlation spectra of uniformly ¹⁵N-labeled proteins in cells. However, by employing site-specifically labeled proteins, in-cell spectra are expected to be greatly simplified, and thus the analysis will be facilitated. Shorter measurement time is also expected as 1D NMR is enough to resolve all NMR signals in such systems. To this end, in this study, we examine in-cell ¹⁹F 1D NMR spectroscopy for proteins that are labeled with ¹⁹F. We employed FKBP12, a target protein of various immunosuppressants, and its in-cell ¹⁹F NMR successfully demonstrated the formation of specific complexes between the protein and extracellularly administered immunosuppressants. Moreover, it was suggested by the in-cell experiments that the FKBP12-rapamycin complex interacted with endogenous proteins, which was not seen for the FKBP12-FK506 complex in the cells.

緒言

哺乳動物 in-cell NMR により、生きた細胞内におけるタンパク質の安定性やタンパク質・分子間の相互作用などが解析されてきた [Inomata, K. et al. Nature 458, 106-109 (2009)]. これまでの方法では、¹⁵N により均一に同位体標識されたタンパク質を細胞内に導入し、これを二次元 ¹H-¹⁵N 相関スペクトルにより観察していたが、細胞内のタンパク質濃度が低い (10 μM 以下) ため、現状では数時間の測定を要するという問題があり、測定時間の短縮が求められていた。本研究

in-cell NMR, ¹⁹F 標識タンパク質, FKBP12

○むらやましゅうへい, いのまたこうすけ, おおのあやこ, とちおひでひと,
しらかわまさひろ

では、アミノ酸選択的に ^{19}F 標識したタンパク質を用い、一次元 ^{19}F NMRを適用することにより、in-cellスペクトルの単純化、解析の簡便化を図り、測定時間の短縮を目指した。

^{19}F 核は元来生体内にほとんど存在しないため、生体由来のバックグラウンドシグナルがほとんどなく、in-cell NMRに有利であると考えられる。モデルタンパク質として、FKBP12を選び、細胞内における免疫抑制剤との相互作用検出を試みた。

タンパク質の ^{19}F 標識法

タンパク質を発現させる大腸菌の培地に、p-フルオロ-L-フェニルアラニン(p-F-Phe)を加えておくことでタンパク質のフェニルアラニン部位に誘導体であるp-F-Pheを導入できる。この際、芳香族アミノ酸の生合成阻害剤であるグリフォサートイソプロピルアミン塩を培地に加えておくことで大腸菌の芳香族アミノ酸生合成を阻害し、p-F-Pheの取り込み効率が向上する [Schönbrunn E. et al. PNAS February 13, 2001 vol. 98 no. 4 1376-1380]。

実験と結果

観測対象であるFKBP12は、5つのフェニルアラニン残基を有しており、一次元NMR測定により、これらの残基に由来する5つのNMRシグナルが得られた (Fig. 1)。遺伝子工学的手法により、フェニルアラニン(Phe)をチロシンに置換した変異体を作成し、各シグナルの帰属を行った。なお、これら主たるピーク以外にマイナーコンフォメーションによるものと思われるPhe36のシグナルも観測された。

次に、HeLa細胞へ ^{19}F -FKBP12を導入し、in-cell ^{19}F NMRの測定を行なった。さらに、この細胞に免疫抑制剤(FK506 或いは rapamycin)を投与したところ、細胞内でのFKBP12とこれらリガンドの相互作用を検出することができた。興味深いことに、FKBP12-Rapamycin複合体のin-cellスペクトルと *in vitro* での NMR スペクトルに有意な差異が観察された。これは、FKBP12-Rapamycin複合体がHeLa細胞内在性の他のタンパク質と相互作用している可能性を示唆している。

結論

In-cell ^{19}F NMR法により、生きたHeLa細胞内におけるタンパク質のNMRスペクトルを得ることに成功した。測定時間は、3時間であり、二次元の ^1H - ^{15}N 相関を用いた場合 (~6時間) よりも大きく短縮できた。また、タンパク質-リガンド相互作用を検出することにも成功した。今回、FKBP12-rapamycin複合体が、細胞内在性のタンパク質と相互作用している可能性が示唆されたが、FKBP12-rapamycin複合体は、FKBP-Rapamycin binding (FRB) domain と結合することが知られていることから、この結果はFRBとの相互作用を見ていると考えられる。一般的に、 ^{19}F 核は化学シフトの異方性異方性が大きく、環境の変化に非常に敏感であるため、リガンド結合による構造変化を鋭敏に検出することができた。一方で、その敏感さのために、複数のコンフォメーションの間の交換が存在する場合には、シグナルが大きくブロードニングしてしまうという欠点もみられた。

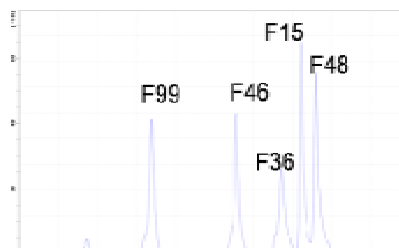


Fig. 1. *in vitro* ^{19}F NMR spectrum of ^{19}F -labeled FKBP12