

# P41

## HMGB2タンパク質に含まれる2つのドメインの相対配向とリンカーの役割

○上脇隼一<sup>1</sup>, 楯 直子<sup>2</sup>, 楯 真一<sup>1,3</sup>

(<sup>1</sup>広島大院・理, <sup>2</sup>武蔵野大・薬, <sup>3</sup>JST・先端計測)

### Preferential domain orientation of a full length HMGB2 protein and the role of the linker region

○Jun-ichi Uewaki<sup>1</sup>, Naoko Utsunomiya-Tate<sup>2</sup>, and Shin-ichi Tate<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Dept. Mathematical and Life Sciences, School of Science, Hiroshima University,

<sup>2</sup> Research Institute of Pharmaceutical Sciences, Musashino University,

<sup>3</sup> SENTAN/JST

HMGB2 protein has two DNA binding domains that are connected by a ten-residue-long linker. We found that this short linker specifically interacts with N-terminal HMG-box (A-domain) without any apparent contact to the other HMG-box (B-domain). To analyze the interaction between the linker and the A-domain, with focusing on its functional significance, we made various HMGB2 linker mutants. Among them, only P80G/P81G mutant has shown significant spectral changes relative to the wild-type, and the observed signals were identical to those for the isolated A-domain. Using DIORITE analyses, we also found that the P80G/P81G mutant had different domain orientation from that for the wild-type; the difference was 46 degrees in hinge rotation angle. The present results may suggest the inter-domain linker, particularly the XPP conserved sequence, should have a role to define the relative domain orientation, which presumably facilitates HMGB2 binding to DNA.

タンパク質はドメインの再配向を伴う大きな分子形態変化を伴って機能を発現する場合が多くある。そのため、タンパク質の機能制御機構の研究にはドメイン相対配向の定量的解析が必要である。私たちは、DIORITE法を用いたHMGB2タンパク質中の2つのHMG-boxのドメイン相対配向解析を行い、各HMG-boxが持つDNA結合ループ (binding wedge) は、分子の同じ側に向く性質があることを見つけた。これは、HMGB2には効率的にDNA結合できるように2つのドメインの向きを規定する性質が備わっていることを示唆していると考えられる。どのような機構により2つのドメイン配向が規定されているかを解析する中で、2つのHMG-boxをつなぐリンカーの役割について着目した。今回は、リンカー変異体を用いてリンカーのドメイン配向規定に関する役割とその機構解明を行ったので報告する。

HMGB2は2つのドメイン (N末端側 : Aドメイン, C末端側 : Bドメイン) の間に、XPPという特徴的な保存配列を含む塩基性に富んだ10残基のリンカーを持つ。これまでの研究で、このリンカー部がN末端側ドメインにのみ選択的に相互作用していることを

---

**Keyword** : NMR, HMG, domain orientation

うえわき じゅんいち、 たて なおこ、 たて しんいち

みいだしている。リンカー配列を持つペプチドを<sup>15</sup>N標識したAドメインに滴定したが、スペクトル変化は観測されなかった。リンカーとAドメインの間には特異的な相互作用が存在しないことがわかった。さらに解析を進めるためにAドメインに直接リンカーをつなげた(A1)フラグメントを作成し、Aドメイン単独の場合とのスペクトルの相違を解析した。測定の結果、A1フラグメントのNMRスペクトルはHMGB2全長のAドメイン領域のスペクトルとよく一致した。このことから、リンカー単独ではAドメインとは相互作用しないが、Aドメインと直接つながることでHMGB2全長の時と同じ相互作用が可能になることがわかった。リンカーのAドメインに対する空間的な制約が必要であるといえる。リンカー内のどのアミノ酸残基がAドメインとの相互作用に重要であるかを調べるため、リンカー内のアミノ酸を置換した複数の変異体を作成し、そのNMRスペクトルの比較を行った。

HMGB2のリンカー変異体は5種類作製した(K86G, K85G, D84G, K82G, P80G/P81G) P80G/P81G変異体のみAドメインに大きな化学シフト変化が見られた。DIORITEにより野生型HMGB2とP80G/P81G変異体についてドメイン間相対配向解析を行った。野生型では各ドメインのDNA相互作用部位が同じ方向を向いており、DNA結合を促進する形態をしていることを以前見つけている。P80G/P81G変異体は、野生型と比べ、明らかなドメイン相対配向の違いを示した。Bドメインに対するAドメインの配向を比較すると、46度のヒンジ回転角を持つ違いがあった(Fig. 1)。リンカーに含まれるPP配列は種を超えてHMGタンパク質に保存されている。XPP配列は、コラーゲン中に見られる特徴的な配列であり、堅い構造ユニットであることが知られている。XPP配列の直前にあるTyrがN末端リンカー部と疎水性相互作用をする可能性を現在解析しており、この疎水性相互作用を介したXPP配列のAドメインへの固定化がドメイン相対配向を決定すると考えている。発表ではこの結果を含めドメイン相対配向を決める構造的要因について議論する。

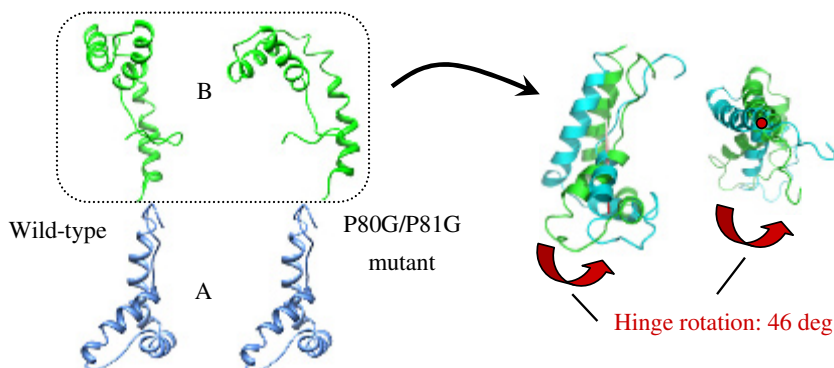


Fig. 1: Comparison of the domain orientation between the wild-type and P80G/P81G mutant HMGB2s.

謝辞： 本研究で用いたデータの一部は、九州大学・生体防医研・共同利用実験施設の700MHz NMR装置で取得しました。測定にご協力いただいた、神田教授、斎藤博士に感謝致します。

## P42

### NMR を用いたフラグメント化および再統合による 低分子阻害剤の構築

○小野 克輝<sup>1,2</sup>、上田 寛<sup>3</sup>、加藤一高垣 こずえ<sup>1,3</sup>、谷村 隆次<sup>3</sup>、  
竹内 恒<sup>2</sup>、嶋田 一夫<sup>2,4</sup>、高橋 栄夫<sup>2,5</sup>

<sup>1</sup>JBIC、<sup>2</sup>産総研・バイオメディシナル情報研究センター、

<sup>3</sup>JBIC・東レ分室、<sup>4</sup>東大・院薬系、<sup>5</sup>横浜市大院・生命ナノ

#### Development of the low molecular weight inhibitor by NMR-based fragmentation and defragmentation strategy

○Katsuki Ono<sup>1,2</sup>, Hiroshi Ueda<sup>3</sup>, Kozue Kato-Takagaki<sup>1,3</sup>, Ryuji Tanimura<sup>3</sup>,  
Koh Takeuchi<sup>2</sup>, Ichio Shimada<sup>2,4</sup>, and Hideo Takahashi<sup>2,5</sup>

<sup>1</sup>JBIC, <sup>2</sup>Biomedical Information Research Center, AIST, <sup>3</sup>Toray Branch Office of JBIC,

<sup>4</sup>Grad. Sch. of Pharm. Sci., The Univ. of Tokyo, and <sup>5</sup>Grad. Sch. of Nanobiosci., Yokohama City Univ.

Development of a novel inhibitor of a protein-protein interaction (PPI) has been challenging in drug discovery. *De novo* design of synthetic molecules that target surface-exposed regions of a protein is currently difficult. Chemical structure libraries of drug-like compounds do not necessarily give high-affinity ligands in a high throughput screening of novel PPI inhibitors with high efficiency. In this study, we propose a novel “fragment-defragment” strategy for a development of PPI inhibitor. In this approach, one performs a rational fragmentation of drug-like compounds or peptide and integrates these fragments into a novel low molecular weight inhibitor in a structure-guided manner. We applied this approach to the GPVI-collagen interaction to improve the affinity of a “coincident” inhibitor, losartan, and successfully improved the affinity by introducing a binding fragment from a peptide inhibitor.

タンパク質-タンパク質相互作用を阻害するリガンドを新たに開発することは、創薬において重要な課題となっている。しかしながら、タンパク質表面上に露出した部位の形状から低分子化合物を新たにデザインすることは容易ではなく、また、必ずしも低分子化合物ライブラリーの中からタンパク質間相互作用を阻害する化合物を効率よく探索できるわけではない。一方、標的タンパク質に結合するペプチドの構造を基に新たなリガンドをデザインする方法も報告されているが、タンパク質-ペプチド複合体構造が決定されていることが前提となる等の理由から、汎用的な開発方法として確立していない。

一方、様々なスクリーニング法により標的タンパク質に対する低親和性のリガンドやペプチドが同定されることは多い。また NMR 法などを用いればそれらのどの部分が結合を担っているのかを明らかにすることは比較的容易である。今回我々は、そのような系のモデルとして血栓症に係わる GPVI-collagen 相互作用系を取り上げる。これまでに我々は GPVI-collagen 相互作用阻害分子として、アンギオテンシン II 拮抗薬にも拘わらず、臨床的な知見からその機能が偶然発見された losartan<sup>[1]</sup>、およびファージライブラリーより得られた 12 残基からなるペプチド(pep-10L)<sup>[2]</sup>の解析を行ってき

キーワード： INPHARMA、阻害剤構築、GPVI

おの かつき、うえだ ひろし、かとう-たかがき こずえ、たにむら りゅうじ、たけうち こう、  
しまだ いちお、たかはし ひでお

た。これら 2 つの分子は GPVI に対し弱く相互作用し、競合関係にある。

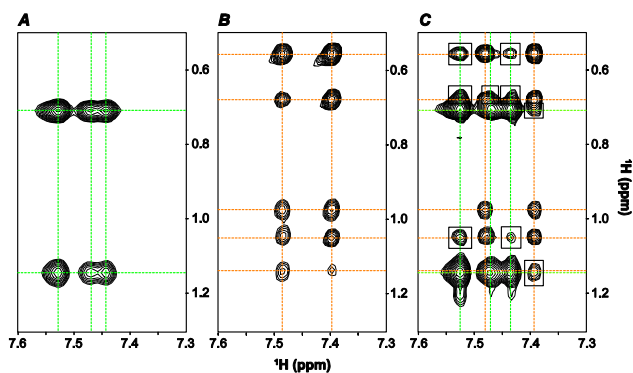
Losartan は、GPVI 上の strand C'および E からなる疎水表面に結合することで血小板凝集を阻害する。さらに、同分子内のフェニルテトラゾール基は GPVI との結合に重要であることが既に明らかとなっている。一方、pep-10L は STD 実験や alanine scanning による結合能測定から、GPVI との結合に必須な残基が特定されているとともに、複合体形成時における立体構造も TrNOE の解析により決定されている。そこで我々は、losartan の GPVI 結合に重要な部分を残した形で分解し、pep-10L において GPVI との結合に重要なフラグメントを再導入することで、より高い活性を持った新たな阻害剤を構築することを試みた。

初めに pep-10L と losartan の INPHARMA 測定を行い、GPVI 上で losartan のフェニルテトラゾール基と pep-10L の Trp6 側鎖が共通した領域に結合していることを明らかにした(Figure)。次に共通骨格である losartan のフェニルテトラゾール基を残し(fragmentation)、pep-10L 上へのみ付加的に存在するフェニル基の導入(defragmentation)を行った。新たに得られた化合物は GPVI に対する滴定実験の結果から  $K_D$  値が  $5.2 \times 10^{-5}$  M であった。このことは、新規低分子化合物が pep-10L と同程度の親和性( $K_D$  値:  $8.2 \times 10^{-5}$  M)を持ち、losartan の親和性( $K_D$  値:  $1.7 \times 10^{-4}$  M)以上の結合能を得たことになる。

Losartan のように他の作用機序を持つ薬が、標的以外のタンパク質に対し弱く結合し機能することは少なくない。しかしその場合、分子全体が受容体との結合に重要ではないと考えられる。本手法は、このような薬の持つ“副作用”をうまく利用し、断片化により必要な部分だけを残して他のペプチドリガンド等から得られる情報と再統合することで目的タンパク質に対する特異性を有する新たな低分子化合物を創製するものである。この手法は既存の薬の薬理活性を再検証しようとする近年の創薬業界の流れと相まって、創薬基盤技術として有効であると考えられる。

#### 《参考文献》

- [1] K. Ono *et al.*, *J Med Chem* **2010**, 53, 2087-2093.
- [2] K. Kato-Takagaki *et al.*, *J Biol Chem* **2009**, 284, 10720-10727.



**Figure.** Expanded region of the  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY spectra recorded for a mixture of 1.4 mM losartan and 25  $\mu\text{M}$  GPVI-Fc (A), 0.9 mM pep-10L and 25  $\mu\text{M}$  GPVI-Fc (B), and 1.4 mM losartan, 0.9 mM pep-10L, and 25  $\mu\text{M}$  GPVI-Fc (C). Signals of orthogonally-crossed broken lines in panels A and B indicate intramolecular TrNOE peaks of losartan and pep-10L, respectively. Signals in boxes in a panel C presented interligand TrNOE peaks mediated by the GPVI-Fc protons. NMR data were collected at Avance 800 MHz with a cryogenically-cooled probe head with a mixing time ( $\tau_m$ ) of 200 ms, using buffered solutions with 20 mM NaPi (pH 6.5) in  $\text{D}_2\text{O}$ .

# P43

## 主鎖 $^{15}\text{N}$ 核の緩和時間測定による脂肪酸結合タンパク質FABP4の運動性の解析

○森戸 昭等<sup>1</sup>, 猪股 晃介<sup>1</sup>, 森川 耿右<sup>2</sup>, 朽尾 豪人<sup>1</sup>, 白川 昌宏<sup>1</sup>

<sup>1</sup>京大院・工

<sup>2</sup>阪大・蛋白研

### Backbone dynamics of free and ligand-bound FABP4 studied by $^{15}\text{N}$ relaxation

○Akira Morito<sup>1</sup>, Kohsuke Inomata<sup>1</sup>, Kosuke Morikawa<sup>2</sup>, Hidehito Tochio<sup>1</sup>, Masahiro Shirakawa<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Grad. Sch. Eng., Kyoto Univ.

<sup>2</sup>Insti. Protein Research, Osaka Univ.

Although there are many studies reported about protein dynamics, almost all of them have been carried out *in vitro*. Thus, little is known about protein dynamics in living cells. Setting our goal as studying their dynamics in living human cell using in-cell NMR spectroscopy, in this study, we have performed  $^{15}\text{N}$  relaxation experiments to characterize the backbone dynamics of free (apo-) and ligand-bound (holo-) human FABP4 (Fatty Acid Binding Protein 4) *in vitro*.  $^{15}\text{N}$   $T_1$  and  $T_2$  values, and  $\{^1\text{H}\}$ - $^{15}\text{N}$  heteronuclear NOEs of FABP4 were analyzed using model-free approach. As a result, apo FABP4 was found to have a mobile region whose time scale is in microseconds to milliseconds. The mobility was suppressed in the holo FABP4. As the region corresponds to the nuclear localization signal (NLS), binding of fatty acid to FABP4 is thought to induce stabilization of the helical structure of NLS.

### 緒言

脂肪酸結合タンパク質4 (Fatty Acid Binding Protein 4 or adipocyte protein 2) は細胞内脂質結合タンパク質ファミリーに属するタンパク質で、脂質代謝における正確な役割は未だ不明ながら、主に脂肪細胞中で発現し、脂肪酸の結合、運搬を行っていると考えられている。またマウスでFABP4の発現を抑制するとインスリン抵抗性をもつことが示されており、他にもアテローム性動脈硬化との関連も指摘されているなど、その機能が注目されている。

こうした理由からFABP4の構造学的研究は盛んに行われているが、その研究の多くは *in vitro* で行われている。しかし、タンパク質が本来働く細胞内の環境はタンパク質や脂質が多数存在する濃密な環境であり、試験管中と比べてタンパク質の性質が異なる可能性がある。例えば、in-cell NMR を用いた実験により、HeLa細胞内では *in vitro* に比べてユビキチンの構造安定性が大きく低下していることが明らかにされている [Inomata, K. *et al.* High-resolution multi-dimensional NMR spectroscopy of proteins in human cells. *Nature* **458**, 107-110 (2009)]. 細胞内には多種多様な脂質分子が混在することから、試験管内の実験では、FABP4と脂質の本来の相互作用を再現できない可能性があり、細胞内での相互作用解析が重要であると考えられる。

FABP4, 緩和時間測定

○もりと あきら, いのまた こうすけ, もりかわ こうすけ, とちお ひでひと, しらかわ まさひろ

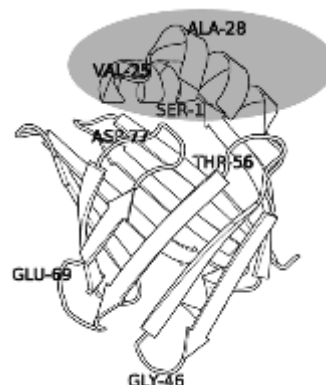


Fig.1 FABP4 (PDB: 2HNX)  
The helix-loop-helix region is in a gray oval.

また、様々なタンパク質の機能の発現は、構造ゆらぎと密接に関連しているとされる。よって細胞内でのタンパク質の運動性を解析することは細胞中のタンパク質の性質を調べる上で重要であると考えられる。本研究では細胞内での運動性を調べることを念頭に置き、*in vitro* においてFABP4の主鎖アミド<sup>15</sup>Nの緩和時間を測定することによって主鎖の運動性を調べた。

## 実験と結果

基質非結合状態の(apo)FABP4と8-anilino-naphthalene-1-sulfonic acid (1,8-ANS)結合状態(holo)FABP4について運動性を調べるために<sup>15</sup>N標識したFABP4を用いて主鎖のアミド<sup>15</sup>N核のT1、T2、{<sup>1</sup>H}-<sup>15</sup>NヘテロNOEを測定し、モデルフリーアプローチによって運動性を表わす各種のパラメータ(分子の回転相関時間 $\tau_c$ 、オーダーパラメータ $S^2$ 、分子内部運動の相関時間 $\tau_e$ 、化学交換・構造変換の寄与 $R_{ex}$ など)を求めた。各種NMRの測定は700 MHzと600 MHzのNMR装置(Bruker AVANCE series)でそれぞれ2回行った。

その結果、apo FABP4はヘリックス-ループ-ヘリックスの領域(Fig. 1)において顕著な $R_{ex}$ の値を有することが明らかとなった(Fig. 2(a))。 $R_{ex}$ はアミドN-Hベクトルがミリ秒からマイクロ秒の遅い時間スケールの運動を行っていることを示しており、apoFABP4はこの領域において遅い時間スケールの運動性を有することが分かった。この領域は基質結合時に核内移行シグナル(Nuclear Localization Signal, NLS)を形成する領域と合致する。一方holo FABP4では、この領域の遅い時間スケールの運動性は大きく低下した(Fig. 2(b))。

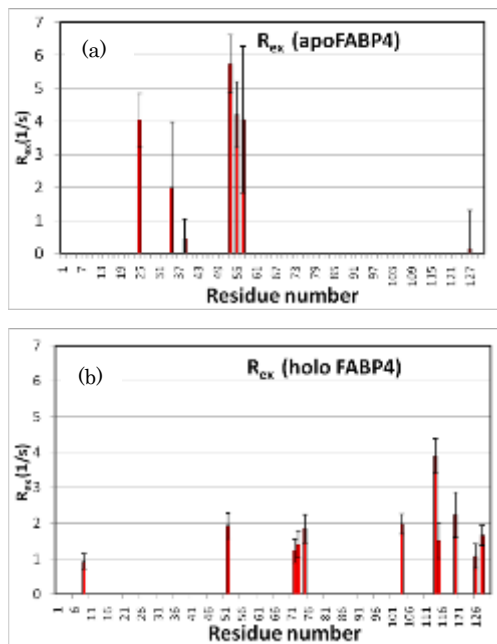


Fig.2  $R_{ex}$  values of (a)apo- and (b)holo- FABP4

## 考察と今後の展望

apo FABP4がヘリックス-ループ-ヘリックスの領域で有意な構造揺らぎを持つことから、FABP4は基質非結合状態において基質結合状態の構造をあらかじめ有していることが示唆される。また、holo FABP4の解析結果で分かったこの領域の運動性の低下は、基質との結合によってNLSの構造形成が起きたことを示唆する。

今後はFABP4の細胞内への導入条件の検討、細胞中のタンパク質のNMRの測定時間の迅速化を行う予定である。

水野志乃<sup>2</sup>, ○編田宏一<sup>1</sup>, 小林直宏<sup>3</sup>, 藤原敏道<sup>3</sup>, 相沢慎一<sup>2</sup>,  
楯 真一<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>広島大・院理, <sup>2</sup>県立広島大・生命環境, <sup>3</sup>阪大・蛋白研)

### Structure analysis of the flagellar hook length regulatory factor, FliK, by NMR

Shino Mizuno<sup>2</sup>, ○Hirokazu Amida<sup>1</sup>, Naohiro Kobayashi<sup>3</sup>, Toshimichi Fuziwara<sup>3</sup>,  
Shin-ichi Aizawa<sup>2</sup>, and Shin-ichi Tate<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Dept. Mathematical and Life Sciences, Hiroshima University.*

<sup>2</sup>*Prefectural University of Hiroshima.*

<sup>3</sup>*Institute for Protein Research, Osaka University.*

Many motile bacteria harbor helical flagellar filaments to gain motility. The bacterial flagellum consists of three parts, which include basal body, hook, and filament. The hook functions as a universal joint to link filament to the basal body that functions as motor. It is well known the length of hook is controlled to have a defined value with narrow distribution. In the case of *Salmonella typhimurium*, the length is known to be centered at 55 nm with deviation of 6nm. FliK protein has been evidenced to be involved in the hook length regulation, but its mechanism is not well understood, although several apparently contradictory functional models on FliK have been proposed. To progress our insight into the hook length regulation by FliK, we conducted the structural studies on FliK using NMR. As expected from the sequence characteristics, so called intrinsically disordered properties, of FliK (405 residues), approximately 80% of the residues within were non-structured. The remaining 20% part located in the C-terminal region was found to be structured, of which part we have determined the structure by NMR. The obtained structural features on FliK will be reported on both structured and unstructured parts.

バクテリアの多くはべん毛と呼ばれる運動器官を用いて移動する。べん毛は基部体、フック、べん毛繊維の大きく3つに分けられる。フックは、モーターとして働く基部体とスクリューとして働くべん毛繊維をつなぐ。*Salmonella typhimurium*のフックの長さは $55 \pm 6$  nmに制御されていることが知られている。これまでの研究により、フックの長さ制御はFliKとべん毛タンパク質輸送を担う超分子構造体Cリングが関与していると考えられている<sup>(1)(2)</sup>。しかし、フック長制御の分子レベルでの機構は明らかになっていない。

FliKは405残基のアミノ酸から成る可溶性タンパク質である。プロテアーゼ限定分解から、FliKはN末端とC末端の半々に分けられる2つのドメイン構造を持つことが示べん毛, FliK, 天然変性タンパク質

みずのしの, ○あみだひろかず, こばやしなひろ, ふじわらとしみち,  
あいざわしんいち, たてしんいち

されている。しかし、N末端ドメインはプロリン、グリシンが多く存在し、プロテアーゼに対する弱い抵抗性を示すものの単独では安定な立体構造を持たない天然変性構造を持つことが予測される。C末端ドメイン側にもQ-rich部位が見つかるなど全体的には天然変性構造に富んだ部位であることが予測される (Fig. 1)。しかし、PONDRの予測からは、C末端部にはやや構造的に安定な部位が存在することも予測されている。このように天然変性領域に富んだFliKがどのようにフック長制御に関わるかを解明するために、我々はFliKの構造解析を開始した。

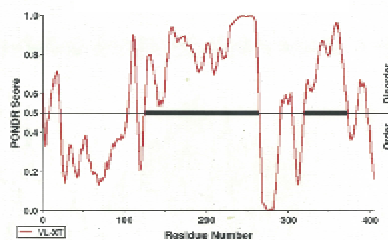


Fig. 1 PONDR prediction of full-length FliK

今回の発表では、FliK全長構造についてNMRから明らかにできた性質について報告するとともに、C末端部に見つかった安定な構造を形成する部分についての立体構造決定を行ったので報告する。得られたFliKの立体構造情報から考えられるFliKによるべん毛フック構造制御機構についても議論する予定である。

FliKの完全長、N末端部、C末端部の三種類のNMRスペクトルを比較した。N末端部、C末端部の重ね合わせとして完全長のNMRシグナルが説明できたために2つのドメインは独立な構造単位であることがわかった。また、 $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQCスペクトル上でのシグナル分散から、N末端部は全体的に安定な構造を持たない部分であることが示唆された。C末端部のスペクトルからは半分程度は安定な構造を持たないが、残る半分は安定な構造を持つことを示すスペクトルの特徴が観測された。 $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  異種核NOE測定の結果から、シグナル分散の低いN末、およびC末ドメインでは負あるいは0.2以下のシグナル強度比 ( $I_{\text{noe}}/I_{\text{ref}}$ ) を与えたことから安定な立体構造を持たないことが確認できた (Fig. 2)。この結果はPONDRの予測と一致した。

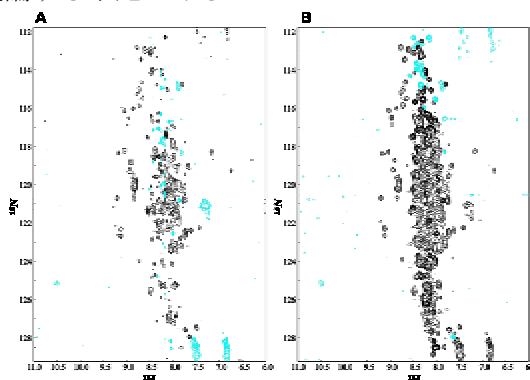


Fig. 2 Comparison of  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  correlation map in presence

(A) and absence (B) of  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  NOE

C末端部には上記のごとく安定な立体構造をもつ部分と、天然変性領域としての特徴を持つ部分が共存していることがわかったが、本研究ではこのC末端部ドメイン全長を対象として立体構造解析を進めた。

定法にしたがった立体構造解析から、C末端部の中央部約100残基に安定な立体構造が存在し、明瞭なNOEシグナルが観測できた。NOEによる $^1\text{H}$ 間距離、強度変調法による $^3J_{\text{NH},\text{Ha}}$ およびTALOSによる主鎖二面角制約、残余双極子効果 $^1D_{\text{NH}}$ を用いてこの領域の立体構造決定を行った。構造解析は、Kujira<sup>(3)</sup>/CYANA/X-PLORにより行った。立体構造の詳細は、ポスターにて示す。

発表では、C末端部に存在する安定な立体構造部の意味を議論すると同時に、FliKに存在する天然変性領域の役割についてもフック長さ制御の観点で議論する。

参考文献

- (1) Makishima, S. *et al.*, *Science*, **291**, 2411-3, (2001)
- (2) Minamino, T. *et al.*, *Mol. Microbiol.*, **56**, 303-8, (2005)
- (3) Kobayashi, N. *et al.*, *J. Biomol. NMR*, **39**, 31-52, (2007)



## P45

### 高等植物フィトクロム・ヒスチジンキナーゼ様ドメインのATPase活性と構造解析

○西ヶ谷有輝<sup>1,2</sup>, Jee JunGoo<sup>1,3</sup>, 田中利好<sup>4</sup>, 河野俊之<sup>4</sup>, 倉田理恵<sup>1</sup>, 深尾陽一朗<sup>1</sup>, 加藤悦子<sup>5,6</sup>, 高野誠<sup>5</sup>, 山崎俊正<sup>5</sup>, 児嶋長次郎<sup>1,2</sup>  
<sup>1</sup>奈良先端大・バイオ, <sup>2</sup>阪大・蛋白研, <sup>3</sup>首都大・戦略研究センター, <sup>4</sup>三菱化学生命科学研, <sup>5</sup>農業生物資源研, <sup>6</sup>名大院・生命農

### ATPase activity and structure analysis for histidine kinase like domain of higher plant phytochrome

○Yuki Nishigaya<sup>1,2</sup>, JunGoo Jee<sup>3</sup>, Rikou Tanaka<sup>4</sup>, Toshiyuki Kohno<sup>4</sup>, Rie Kurata<sup>1</sup>, Yoichiro Fukao<sup>1</sup>, Etsuko Katoh<sup>5,6</sup>, Makoto Takano<sup>5</sup>, Toshimasa Yamazaki<sup>5</sup> and Chojiro Kojima<sup>1,2</sup>  
<sup>1</sup>Grad. Sch. Biol. Sci., NAIST, <sup>2</sup>Inst. Prot. Res. Osaka Univ., <sup>3</sup>Center for Priority Areas, Tokyo Metro. Univ. <sup>4</sup>MITILS, <sup>5</sup>NIAS, <sup>6</sup>Grad. Sch. Bioagric. Sci., Nagoya Univ.

Phytochrome is the red/far-red photoreceptor and regulates many aspects of the life cycle in plants. The C-terminal histidine kinase like domain (HKLD) shows sequence homology to histidine kinases, but only Ser/Thr kinase activity is known in higher plant phytochromes. In order to investigate structure and function of the HKLD, the over expression and purification systems of HKLD were established for *Oryza sativa* (rice) phyB. Rice phyB HKLD displayed weak but significant ATPase activity. NMR assignments were performed employing the selective labeling and non-linear sampling methods. Model structure refined by NMR chemical shifts and torsion angle restraints suggested the structural similarity between HKLD and GHKL kinase/ATPase superfamily including histidine kinases.

#### [序論]

光は植物において発芽から花茎誘導まで多様な反応を制御する環境因子として重要である。高等植物の赤色・遠赤色光受容体であるフィトクロムは安定な二量体を形成する約1200アミノ酸残基の可溶性のセリン・スレオニンキナーゼである。しかしながら、そのキナーゼ活性ドメインは明らかにされていない。フィトクロムの構造は発色団を共有結合し光受容能を持つN末端ドメインと安定な二量体を形成するC末端ドメインにおおきく分かれる。C末端ドメインに存在する Histidine Kinase Like Domain (HKLD)はヒスチジンキナーゼと相同性を有する。しかし、フィトクロムからヒスチジンキナーゼ活性は報告されておらず、キナーゼドメイン候補として有力であるが、その機能は未解明な部分が多い。そこで本研究では溶液NMRおよび生化学実験により、高等植物フィトクロムHKLDの構造と機能の解明を目指した。

---

#### 光受容体, フィトクロム, キナーゼ

○にしがや ゆうき, じー じゅんぐー, たなか りこう, こうの としゆき, くらた りえ, ふかお よういちろう, かとう えつこ, たかの まこと, やまざき としまさ, こじま ちょうじろう

## [結果と考察]

イネ (*Oryza sativa*) phyB HKLDはヒスチジンキナーゼとの相同性から2つのサブドメイン(二量体化ドメイン、ATP結合ドメイン)に分かれるが、本研究ではATP結合ドメインと考えられる領域を使用した。大腸菌のコールドショック発現系を用い発現・精製系を確立した。高度に精製されたHKLDは低濃度(17  $\mu\text{M}$ )では良好な $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQCスペクトルを与えたが、それ以上の濃度では会合によりシグナルの増加やブロードニングが見られた。会合を起こさず高濃度化することはできなかったが、HKLDは溶媒がほぼ水の条件でも長期間安定であった。そこで、シグナルの帰属には水で透析したサンプルを用い、またタイトレーション用の溶媒として塩を加えていないTris-HCl緩衝液を用いることにより、クライオプローブの感度が最大限に発揮できる条件でNMR測定を行った。これにより、タンパク質濃度10  $\mu\text{M}$ の $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQCがクライオプローブ付800 MHz NMRを使用して1時間程度で測定可能になった(Fig. 1)。さらに非線形サンプリングおよびアミノ酸選択標識技術を併用し、タンパク質濃度が17  $\mu\text{M}$ という条件で主鎖帰属に成功した。HKLDのモデル構造を化学シフトおよび二面角情報を元により精密化したところ、HKLDの構造はヒスチジンキナーゼも含まれるGHKL kinase/ATPase superfamilyに属する事が示唆された。続いてATPアナログのタイトレーション実験を溶液NMRで行ったところ、GHKL特異的なATP/Mg<sup>2+</sup>結合モチーフ(N box, G1 box, F box, G2 box)近傍に複数の残基がマッピングされ(Fig. 2)、HKLDにATPが結合することが示唆された。

次にHKLDの活性の検討を行った。フィトクロム全長の基質として報告されているBovine HistoneH1を基質に、リン酸化タンパク質特異的な蛍光染色剤であるProQ Diamondを用いて検出を試みたがリン酸化は観測されなかった。そこで、ATP加水分解活性を測定したところ、弱いながらも他のGHKL型ATPaseと同程度の活性が検出された。これらのことから、イネphyB HKLDはATP加水分解活性をもつGHKL型のドメインであることが示唆された。

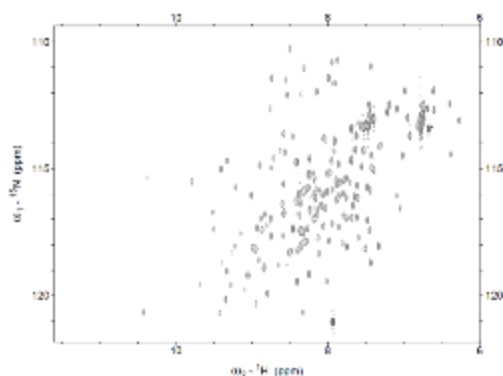


Fig.1  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spectrum (ns=16, 2048x256 pts, 1h18m) of 10  $\mu\text{M}$  phyB HKLD (pH 7.5, 20 mM Tris-HCl, 2 mM DTT) on a Bruker 800 MHz NMR equipped with a cryogenic probe.

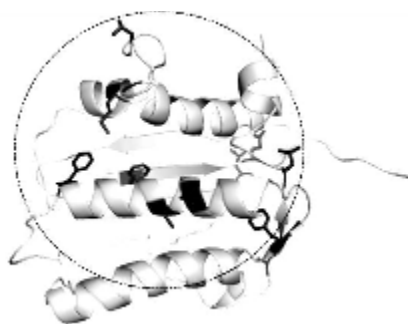


Fig.2 Perturbed residues by ATP analog titration mapped on a refined model structure.

## P46 バイセルに結合したマガイニン2の構造解析

○細田 和男<sup>1</sup>、向 隴<sup>1</sup>、稲岡 斉彦<sup>1</sup>、河野 俊之<sup>2</sup>、若松 馨<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>群大工、<sup>2</sup>三菱化学生命研)

### Structural analysis of magainin 2 bound to phospholipid bicelles

○Kazuo Hosoda<sup>1</sup>, Long Xiang<sup>1</sup>, Yoshihiko Inaoka<sup>1</sup>, Toshiyuki Kohno<sup>2</sup>, Kaori Wakamatsu<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Grad. Sch. Eng., Gunma Univ., <sup>2</sup>Mitsubishi Kagaku Inst. Life Sci.

Magainin 2, a 23-residue peptide, isolated from skins of frog *Xenopus laevis*, exhibit antimicrobial activity through the perturbation of microbial plasma membranes. Although magainin 2 forms a monomeric  $\alpha$ -helix when bound to phospholipid micelles and in TFE solution, this peptide was shown to form an antiparallel coiled-coil dimer on binding to zwitterionic phospholipid vesicles by our TRNOE measurement. To analyze the membrane-bound structure more directly and in more detail, we started to analyze the structure of isotope-labeled magainin 2 bound to anionic phospholipid bicelles. First, by optimizing the kind of long-chain phospholipid and detergents as well as the peptide/phospholipid ratio, we successfully determined the conditions that give a well-resolved <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC spectrum. Having assigned the backbone and side-chain resonances, we are now calculating the 3D structure of magainin 2 bound to the anionic phospholipid bicelles.

【はじめに】 アフリカツメカエルの皮膚に含まれる抗菌性ペプチド、マガイニン2はアミノ酸23残基の短いペプチドで、細菌の細胞膜の透過性を高めることによってその抗菌活性を発揮する。膜障害活性のより高いペプチドをデザインするために、膜に結合した時の構造が解析されてきた。リン脂質のミセルに結合したマガイニン2はモノマーの $\alpha$ ヘリックスを形成する事がCDやNMRで示されていたが、酸性の脂質二重膜に結合した時では、coiled-coilを形成する事がCDによって示唆されていた。実際に、重水素化したホスファチジルコリンのベシクルの存在下でTRNOEを測定する事によりマガイニン2が逆平行のcoiled-coilを形成する事を我々は既に示している。しかし、より生理的な条件である酸性リン脂質の存在下ではペプチドの解離が極度に遅くなり、TRNOE測定は行なえなかった。そこで、酸性リン脂質の二重膜に結合した時の構造を詳細に決定するために、酸性リン脂質を含むバイセルに結合したマガイニン2の構造を直接解析することにした。

---

ペプチド、脂質、サンプル調製

○ほそだ かずお、こう りゅう、いなおか よしひこ、こうの としゆき、  
わかまつ かおり

【結果】 マガイニン2はユビキチンとの融合タンパク質としても細胞障害活性があるので、通常の大腸菌の発現系では全く発現しなかったが、発現制御の厳密なホストと栄養価の高い培地を使用することにより、実用的に発現量させられるようになった。

バイセルの側面を構成する界面活性剤としてはCHAPSOとDHPCが頻用される。DHPCを含むバイセルは低温で凝集する傾向があるので、低温でも安定なCHAPSOでまずバイセルを調製したが、CHAPSOと酸性リン脂質(PS, PG)を含むバイセルは、マガイニン2を加えると不安定になり凝集してしまう事がわかった。そこで、CHAPSOをDHPCに変更したところ安定なバイセルができ、特にPG存在下では高分解能のHSQCスペクトル (Fig. 1) を与えた。なお、coiled-coilの形成はCDで確認してある。

主鎖・側鎖のシグナルはHNCO/HNCOCA/HNCA/HNCACO/CBCACONH/HNCACB/<sup>15</sup>N-NOESY/<sup>13</sup>C-NOESY測定等による定法にて帰属した。次に<sup>15</sup>N-NOESYのシグナル帰属・解析を行ったが、 $\alpha$ ヘリックス/ $\beta$ シート構造を強く示唆するような特徴的なパターンは観測されなかった。より詳細な構造の情報を得るために、構造計算を開始した。ダイマー形成を示唆するNOEも得られているが、まずは主に残基内および隣接残基間に帰属されるNOEによる距離拘束を用いてモノマーでの計算を行った。計算にはTALOSにより得られた主鎖の二面角情報も使い、XPOLRにて構造を計算した。ペプチド単体の構造である程度の収束がみられたので、現在、分子間NOEを示唆するシグナルについて、構造計算の結果との整合性の確認を行いながら同定を行っている。

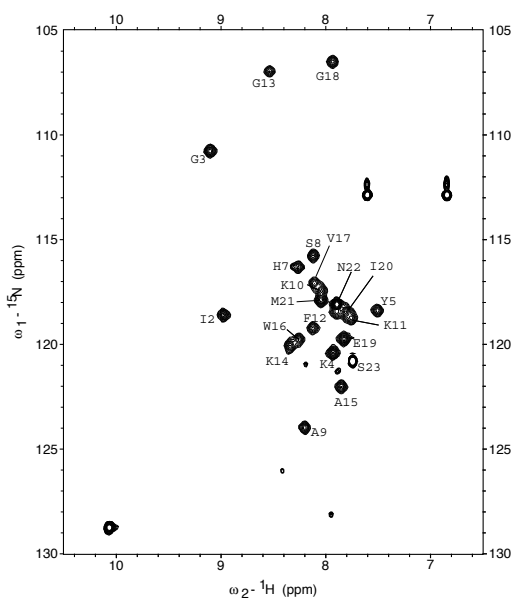


Fig. 1 <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC spectrum of magainin2 bound to PG/DHPC bicelles.

# P47

## Zc3h12a N末端ドメインの溶液構造

○津嶋 崇<sup>1</sup>、榎園 能章<sup>2</sup>、足立 わかな<sup>2</sup>、横地 政志<sup>2</sup>、  
竹内 理<sup>3,4</sup>、審良 静男<sup>3,4</sup>、稲垣 冬彦<sup>2</sup>

<sup>1</sup>北大院生命科学構造生物、<sup>2</sup>北大先端生命構造生物、<sup>3</sup>阪大微  
研自然免疫、<sup>4</sup>阪大免疫学フロンティア研究センター自然免疫

### Solution structure of Zc3h12a N-terminal domain

○Takashi Tsushima<sup>1</sup>, Yoshiaki Enokizono<sup>2</sup>, Wakana Adachi<sup>2</sup>, Masashi Yokochi<sup>2</sup>,  
Osamu Takeuchi<sup>3,4</sup>, Shizuo Akira<sup>3,4</sup>, and Fuyuhiko Inagaki<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Lab. Struct. Biol. Grad. Sch. Life Sci. Hokkaido Univ., <sup>2</sup>Lab. Struct. Biol. Advanced Life  
Sci. Hokkaido Univ., <sup>3</sup>Dept. Host Defense. Res. Inst. Microbiol. Dis. Osaka Univ.,  
<sup>4</sup>Lab. Host Defense. WPI-IFReC. Osaka Univ.

Zc3h12a is an RNase containing CCCH-type zinc-finger motif whose expression level is stimulated by lipopolysaccharide (LPS). Zc3h12a prevents autoimmune diseases by directly controlling the stability of a set of inflammatory genes: interleukin (IL)-6, IL-12p40.

Zc3h12a is comprised of an N-terminal domain, a PIN domain with RNase activity, a zinc-finger motif and a C-terminal domain. Electrophoretic mobility shift assays (EMSA) suggested that the N-terminal domain inhibits binding affinity between Zc3h12a and RNA. Here, we will show the solution structure of the Zc3h12a N-terminal domain, and discuss auto inhibition mechanism of RNA binding by the N-terminal domain.

#### 【背景】

Toll-like receptor (TLR)は、自然免疫応答において病原体の感染を感知する受容体であり、サイトカイン等の発現を誘導することで炎症反応を引き起こし、病原体を排除する。しかし、TLR により引き起こされる細胞内シグナルにおいて生成されるタンパク質は、炎症性サイトカインのみならず、ケモカインや転写因子など多様であり、炎症反応は厳密に制御されている。近年、この炎症反応を制御する遺伝子の一つとして Zc3h12a が同定された。

Zc3h12a は LPS により転写が活性化されるタンパク質であり、Zc3h12a 欠損マウスにおいて、著明な脾腫、リンパ節腫脹を示し、血清 Ig 増加、自己抗体産生等の自己免

---

キーワード: 自然免疫、RNase

○つしま たかし、えのきぞの よしあき、あだち わかな、よこち まさし、  
たけうち おさむ、あきら しずお、いながき ふゆひこ

疫症状が見られた。Zc3h12aはエンドヌクレアーゼ活性を有しており、IL-6等の炎症性サイトカインの mRNA を特異的に不安定化することで炎症反応を制御すると考えられているが、mRNA の特異的な認識機構や、活性の制御機構など未だ不明な点も多く、詳細な解析が望まれる。

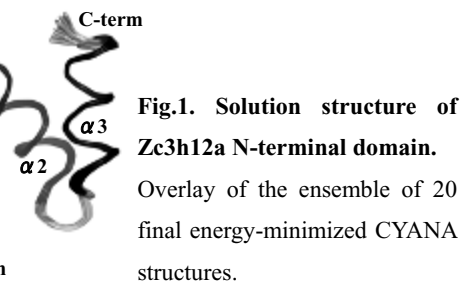
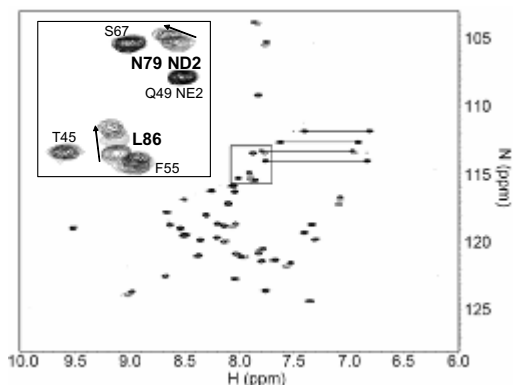
我々は、各種プロテアーゼを用いた限定分解や、バイオインフォマティクスを用いることにより、Zc3h12a が N 末端ドメイン、RNase 活性を有する PIN ドメイン、CCCH 型ジンクフィンガー、C 末端ドメインから構成されることを見出した。さらにゲルシフトアッセイにより、N 末端ドメインが Zc3h12a と RNA との結合に対し、抑制的に作用することを明らかにし、N 末端ドメインが Zc3h12a の RNase 活性を制御するドメインである可能性を示唆した。

本発表では、Zc3h12a N 末端ドメインの溶液構造、ならびに N 末端ドメインによる RNase 活性制御機構に関する考察について報告する。

## 【結果】

Zc3h12a N 末端ドメインに対し、大腸菌による大量発現系、精製系を確立し、NMR 法による立体構造解析を行った。スペクトル解析には Olivia を使用し、CYANA を用い立体構造計算を行った。N 末端ドメインは 3 本の  $\alpha$  ヘリックスからなるバンドル構造を有していることが明らかとなった(Fig.1)。

さらに N 末端ドメインによる RNase 活性制御機構を解明するために滴定実験を行った。 $^{15}\text{N}$  ラベル N 末端ドメインに対し、0、1.0、2.0、3.0 モル等量となるように RNase 活性本体である PIN ドメインを加え、 $[\text{H}-^{15}\text{N}]$  HSQC を測定した。 $\alpha 1$  ヘリックスの C 末端側、 $\alpha 3$  ヘリックス上の残基由来のピークに対し fast exchange での摂動が観測され、N 末端ドメインと PIN ドメインとの相互作用が確認された(Fig.2)。より詳細な活性制御機構に関する考察については、討論会当日議論する。



**Fig.1. Solution structure of Zc3h12a N-terminal domain.**  
Overlay of the ensemble of 20 final energy-minimized CYANA structures.

N 末端ドメインと PIN ドメインとの相互作用が確認された(Fig.2)。より詳細な活性制御機構に関する考察については、討論会当日議論する。

**Fig.2. Superimposed  $[\text{H}-^{15}\text{N}]$  HSQC spectra of  $^{15}\text{N}$ -labeled Zc3h12a N-terminal domain titrated by Zc3h12a PIN domain.**  
With 0 (dark gray), 1.0 (light gray), 2.0 (gray), 3.0 (black) eq Zc3h12a PIN domain.

## P48

### リポカリン型プロスタグランジンD合成酵素の15d-PGJ<sub>2</sub>認識機構

○加藤 信幸<sup>1</sup>、島本 茂<sup>1,2</sup>、吉田 卓也<sup>1</sup>、秦 殊斌<sup>1</sup>、  
小林 祐次<sup>3</sup>、有竹 浩介<sup>4</sup>、裏出 良博<sup>4</sup>、大久保 忠恭<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>大阪大学大学院薬学研究科、<sup>2</sup>(独)学振特別研究員DC、  
<sup>3</sup>大阪薬科大学、<sup>4</sup>大阪バイオサイエンス研究所

### Structural Analysis of 15d-PGJ<sub>2</sub> Recognition by Lipocalin-type Prostaglandin D Synthase

○Nobuyuki Kato<sup>1</sup>, Shigeru Shimamoto<sup>1,2</sup>, Takuya Yoshida<sup>1</sup>, Shubin Qin<sup>1</sup>, Yuji Kobayashi<sup>3</sup>,  
Kosuke Aritake<sup>4</sup>, Yoshihiro Urade<sup>4</sup>, Tadayasu Ohkubo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Graduate School of Pharmaceutical Science, Osaka University, <sup>2</sup>JSPS Res. Fellow, <sup>3</sup>Osaka University of Pharmaceutical Science, <sup>4</sup>Department of Molecular Behavioral Biology, Osaka Bioscience Institute

Lipocalin-type prostaglandin (PG) D synthase (L-PGDS) possesses dual functions as a PGD<sub>2</sub>-synthesizing enzyme and a transporter for lipophilic ligands. It catalyzes the isomerization of PGH<sub>2</sub> to produce PGD<sub>2</sub>, an endogenous somnogen, in the brain. L-PGDS also has the ability to bind various lipophilic molecules such as retinoid, bilirubin and biliverdin. 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ<sub>2</sub> (15d-PGJ<sub>2</sub>) is a downstream metabolite of PGD<sub>2</sub> and produced by non-catalytic dehydration of PGD<sub>2</sub>. It is recognized as a potent apoptotic and growth inhibitory factor, and is well known as having a high affinity for PPAR $\gamma$ . In this study, the interactions of L-PGDS and 15d-PGJ<sub>2</sub> have been investigated. The result of NMR titration experiments with 15d-PGJ<sub>2</sub> revealed that 15d-PGJ<sub>2</sub> almost fully occupied the hydrophobic cavity of L-PGDS.

#### 【緒言】

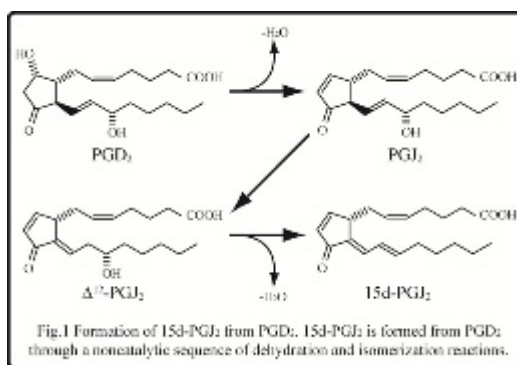
リポカリン型プロスタグランジン(PG)D合成酵素(L-PGDS)は、哺乳類の脳内に豊富に存在し、PGH<sub>2</sub>から睡眠誘発に関与するPGD<sub>2</sub>を産生する酵素であるとともに、レチノイドやビリルビン、ビリベルジンなどの様々な疎水性低分子のスカベンジャーとしての役割も担う多機能蛋白質である。これまでの溶液NMR法による立体構造解析から、 $\beta$ バレル構造の内部に2つのポケットを含む大きな疎水性cavityを持ち、このことが大きさも化学構造も異なる多様な疎水性低分子との結合を可能にしていることが明らかにされている<sup>1)</sup>。さらに、 $\beta$ バレル内の疎水性cavityの上部に位置するEF-loopとH2-helixの立体構造変化がリガンド結合に重要であることが示唆されている。

---

リポカリン型プロスタグランジン D 合成酵素、15d-PGJ<sub>2</sub>、溶液 NMR

○かとう のぶゆき、しまもと しげる、よしだ たくや、ちん しゅうびん、こば やし ゆうじ、ありたけ こうすけ、うらで よしひろ、おおくぼ ただやす

生体中ではPGD<sub>2</sub>の脱水反応により自発的に15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ<sub>2</sub> (15d-PGJ<sub>2</sub>)が生成する(Fig.1)。15d-PGJ<sub>2</sub>は核内レセプターPPAR $\gamma$ の内因性リガンドであり抗炎症作用を示すが、過剰量の15d-PGJ<sub>2</sub>は反応性が高いため、様々な組織障害を引き起こす。L-PGDSは脳内で睡眠誘発物質PGD<sub>2</sub>を産生する酵素である一方、反応性の高い15d-PGJ<sub>2</sub>とは強く結合することで組織障害を阻止している可能性が示唆されている。そこで本研究では、溶液NMR法を用いてL-PGDSと15d-PGJ<sub>2</sub>の相互作用様式を解明し、L-PGDS/15d-PGJ<sub>2</sub>複合体の高次構造解析を行った。



### 【実験】

大腸菌による大量発現系を用いて、均一<sup>15</sup>N標識または<sup>13</sup>C,<sup>15</sup>N標識したL-PGDSを調製した。グルタチオンセファロスクロマトグラフィーによる粗精製の後、ThrombinでGSTタグを切断し、ゲル濾過クロマトグラフィーを用いて精製を行った。15d-PGJ<sub>2</sub>はCayman Chemical社から購入した。NMR測定はVarian INOVA 600MHzを用いた。

得られた安定同位体標識L-PGDSを用い、<sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQCを用いた15d-PGJ<sub>2</sub>滴下実験を行って、結合部位を同定した。また、L-PGDSと15d-PGJ<sub>2</sub>の1:1複合体に対して3D HNCO, HNCA, CBCA(CO)NH測定を行い、主鎖由来NMRシグナルの帰属を行った。さらに現在、3D HBHA(CO)NH, HCCH-TOCSY, CCH-TOCSY測定および<sup>13</sup>C-edited NOESY, <sup>15</sup>N-edited NOESY測定を行い、側鎖由来NMRシグナルの帰属および複合体の立体構造決定を行っている。

### 【結果および考察】

L-PGDSの15d-PGJ<sub>2</sub>結合部位を同定するために、<sup>15</sup>N標識L-PGDSに15d-PGJ<sub>2</sub>を滴定して<sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQCスペクトルの測定および解析を行った。NMRシグナルが変化した残基は、CD-loopに属するS45、H2-helixに属するF55, E57, L62, Y63、EF-loopに属するS109, H111、およびGH-loopに属するD142であり、15d-PGJ<sub>2</sub>はL-PGDSのcavity上部と相互作用している事が明らかとなった。変化の観測された残基は、基質PGH<sub>2</sub>の安定誘導体が結合した時に変化した残基とほぼ一致していた。また、L-PGDSと15d-PGJ<sub>2</sub>の結合はNMRの時間スケールからは遅い交換過程であった。

均一<sup>13</sup>C,<sup>15</sup>N標識L-PGDSに等モル量 of 非標識15d-PGJ<sub>2</sub>を加えたL-PGDS/15d-PGJ<sub>2</sub>複合体を調製した。各種三重共鳴NMR測定および解析を行い、主鎖由来NMRシグナルの帰属を行った。その結果、167残基中150残基の主鎖帰属を完了した。現在、側鎖由来NMRシグナルの帰属を行っており、本討論会では最終的に決定したL-PGDS/15d-PGJ<sub>2</sub>複合体の立体構造についても報告する。

### 【参考文献】

<sup>1)</sup>Shimamoto S. *et al.*, *J.Biol.Chem.*, **282**, 31373-31379 (2007)



# P49

## 溶液NMR法によるマルチドメイン蛋白質の構造決定の試み

○宮崎健介、金場哲平、伊藤隆、三島正規  
首都大理工

### Attempt to determine three dimensional structure of an intact multi-domain protein by solution NMR

○Kensuke Miyazaki, Tepei Kanaba, Yutaka Ito and Masaki Mishima  
*Dept. of chem., science and technology., Tokyo Metropolitan Univ.*

Acquisition of long-range distance information from Paramagnetic Relaxation Enhancement (PRE) using hetero-nuclear NMR has been reported in recent years. In this study, we aim to determine the conformation of domains in full-length multi-domain protein and investigate the regulation mechanism using PRE detected by solution hetero-nuclear NMR.

Our target for this structural analysis is Protein kinase C alpha (PKC $\alpha$ ). PKC $\alpha$  exists at cytoplasm in auto-inhibited state. When PKC $\alpha$  is activated by second messengers, Ca<sup>2+</sup> and diacylglycerol (DAG), it is believed that a large conformation change occurs and localizes at plasma membrane, and thus phosphorylates cognate substrates. We are trying to detect direct interactions between the domains, and determine the conformation of domains by acquisition of long-range distance information from PREs.

#### 【Introduction】

真核生物における高度な生命現象にはマルチドメイン蛋白質が密接に関わっており、このような生命現象を理解するためにはそれらの構造および機能解析が必要不可欠である。しかしながらマルチドメイン蛋白質の全長の構造解析は、そのドメイン間の相互作用の弱さやリンカーの柔軟性などの理由からいまだ十分でない。本研究では、このマルチドメイン蛋白質の一つである

Protein kinase C alpha (PKC $\alpha$ )を標的蛋白質とし、その構造決定を試みている。

PKC $\alpha$ はタンパク質の活性や機能を制御する酵素であり、その働きにより細胞内でシグナル伝達を行う。PKC $\alpha$ は調節領域に存在する偽基質領域による自己阻害作用のため不活性化状態で細胞質に存在し、セカンドメッセンジャーであるCa<sup>2+</sup>やジアシルグリセロール(DAG)により活性化されると、細胞膜に移行し基質をリン酸化する(Fig. 1)。調節領域には、連続した2つのC1ドメイン、C1AおよびC1Bドメイン(DAG結合ドメイン)とC2ドメイン(Ca<sup>2+</sup>結合ドメイン)が存在する。

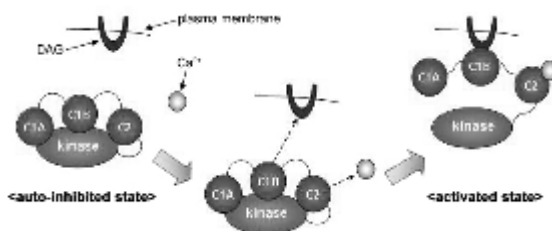


Fig. 1 Regulation mechanism of PKC $\alpha$

It is believed that PKC $\alpha$  is activated by DAG and Ca<sup>2+</sup> with large conformation change, and thus phosphorylates substrates.

マルチドメイン蛋白質、溶液NMR

○みやざきけんすけ、かなばてつぺい、いとうゆたか、みしままさき

## 【Strategy】

柔軟なマルチドメイン蛋白質の構造決定を行う為、本研究では次のような手法を取る。

### (1)連結酵素Sortase Aを用いた蛋白質ライゲーションによるサンプル再構成

近年、蛋白質どうしを連結させることが可能な酵素Sortase A が報告された<sup>1)</sup>。このSortase Aを用いた蛋白質連結反応によるPKC $\alpha$ 全長のサンプルを再構成する。

### (2)PRE、SAXS等を併用した分子情報の取得による構造決定

これまでのNMR測定に加え、常磁性緩和効果(PRE)、X線小角散乱(SAXS)等の手法・測定を併用することで、より多量・精密な分子情報を取得し、それによりマルチドメイン蛋白質の構造決定を行う。

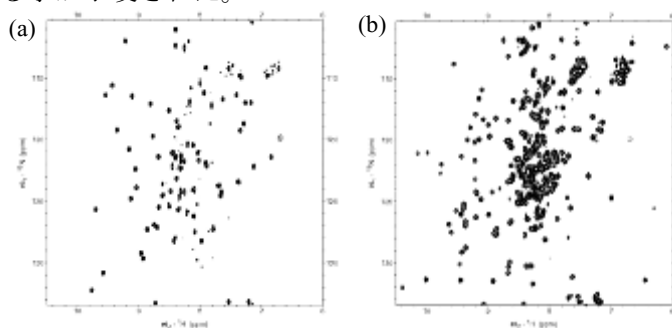


**Fig. 2 Strategy of this study**

Full-length structure and domain conformation of most multi-domain proteins have not been reported. However, structure of domains has been often reported. In this study, full-length multi-domain protein is reconstructed from each domain which is expressed respectively, and its structure is determined by acquisition of structural information from PRE, SAXS, and so on.

## 【Results and Discussion】

現在までに PKC $\alpha$ において数種のコストラクトを作製しており、中でも C1B ドメイン、C1BC2 ドメインにおいては 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC の測定を行った。得られた両者のスペクトルを比較したところ、C1B ドメインに由来する化学シフトが一致しなかった (Fig. 3)。このことから C1B ドメインと C2 ドメインの間に何らかの相互作用が存在する事が示唆された。



**Fig. 3 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spectrum**  
(a)spectra of C1B domain  
(region:91-161, length:71 a.a.)  
(b)spectra of C1BC2 domain  
(region:93-306, length:236 a.a.)

The chemical shifts of C1B domain in each spectrum were significantly different. This result implied that some interactions present between C1B domain and C2 domain.

## 【Perspectives】

PKC $\alpha$ の他のドメイン(C1A、kinase)の発現系を作製し、Sortase Aを用いた全長蛋白質の再構成を行う。その後、各ドメインの構造決定や PRE 等による分子情報の取得を行い、PKC $\alpha$ 全長におけるドメイン配置、構造を決定する。

1) Kobashigawa, Y., *et al.*, *J. Biomol. NMR*, 2009

## In-cell NMR による高度好熱菌 TTHA1718蛋白質の生細胞内動態解析

○濱津 順平<sup>1</sup>, Daniel Nietlispach<sup>2</sup>, 花島 知美<sup>1</sup>, 池谷 鉄兵<sup>1</sup>,  
細谷 沙織<sup>1</sup>, 三島 正規<sup>1</sup>, 白川 昌宏<sup>3</sup>, 伊藤 隆<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>首都大・院理工, <sup>2</sup>ケンブリッジ大・生化, <sup>3</sup>京大・院工

### <sup>15</sup>N NMR relaxation studies of TTHA1718 protein in living cells by in-cell NMR spectroscopy

○Jumpei Hamatsu<sup>1</sup>, Daniel Nietlispach<sup>2</sup>, Tomomi Hanashima<sup>1</sup>, Teppei Ikeya<sup>1</sup>, Saori Hosoya<sup>1</sup>,  
Masaki Mishima<sup>1</sup>, Masahiro Shirakawa<sup>3</sup> and Yutaka Ito<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Chemistry, Tokyo Metropolitan University; <sup>2</sup>Department of Biochemistry,  
University of Cambridge; <sup>3</sup>Department of Molecular Engineering, Kyoto University

In living cells, proteins function in an environment where they interact specifically with other proteins, nucleic acids, co-factors and ligands and are subject to extreme molecular crowding that makes the cellular environment difficult to replicate *in vitro*. In-cell NMR is the only available method for investigating detailed structure and dynamics of proteins at work inside living cells.

In this presentation, we report our recent <sup>15</sup>N-relaxation studies of *T. thermophilus* HB8 TTHA1718 in *E. coli* cells aiming at identifying protein dynamics in living environment. In-cell <sup>15</sup>N-relaxation data showed twice longer  $T_1$ , much shorter  $T_2$  and thereby approximately 2-3 times larger rotational correlation time comparing to *in vitro* data, which is coincident with ~3 times higher viscosity inside cells. Chemical exchange contribution  $R_{ex}$  observed by TROSY-selected Hahn echo experiments will be also discussed.

#### 【序論】

蛋白質の持つ生物活性は、活性に関与する領域の蛋白質主鎖の動的性質と密接に関わっている。したがって、蛋白質の動的性質の解析結果は、当該蛋白質の機能を詳細に理解する上で非常に重要な情報となる。蛋白質主鎖の動的性質を解析する手法としては、蛋白質を <sup>15</sup>N 標識し、NMR を用いて <sup>15</sup>N 核の磁化の緩和時間を測定する手法が広く用いられている<sup>1</sup>。本研究では生きた細胞内における蛋白質の情報を直接観測する in-cell NMR<sup>2</sup> の手法を用いることで、細胞内における蛋白質主鎖 <sup>15</sup>N 核の緩和解析を試みた。細胞内においては、いわゆる“Macromolecular crowding”が蛋白質-蛋白質相互作用や蛋白質のフォールディングに大きな影響を与えていることがこれまでに報告されており<sup>3</sup>、本研究によって細胞内環境が蛋白質の動的性質に与える影響について新たな知見が得られる可能性がある。

---

キーワード: In-cell NMR, Relaxation, Protein dynamics

○はまつ じゅんぺい, だにえる にーとりすぱは, はなしま ともみ,  
いけや てっぺい, ほそや さおり, みしま まさき, しらかわ まさひろ, いたう ゆたか

### 【実験・結果および今後の展望】

試料としては、当研究室で生きた細胞内における立体構造の決定に成功した 4 高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 由来の TTHA1718 蛋白質を用い、大腸菌細胞内の試料と、単離・精製試料の両方について蛋白質主鎖  $^{15}\text{N}$  核の緩和解析を行なった。

均一に  $^{15}\text{N}$  標識を施した試料を調製し、2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC 測定法を利用した  $T_1$ ,  $T_2$  緩和測定を行った。単離・精製試料、および大腸菌細胞内試料から得られたデータを比較した結果、 $T_1$ ,  $T_2$  緩和時間ともに大腸菌細胞内では一様に大きく変動していたことが明らかになった (Figure 1)。とりわけ  $T_2$  緩和時間の減少が著しく、試料の不均一性に加えて化学交換などの  $T_2$  緩和時間に影響を与える効果の存在が示唆された。この結果をうけ、TROSY を利用した交差相関緩和と速度定数の解析<sup>5,6</sup>により、化学交換による  $T_2$  緩和時間への寄与を検証した。本発表ではその結果も合わせて報告する。

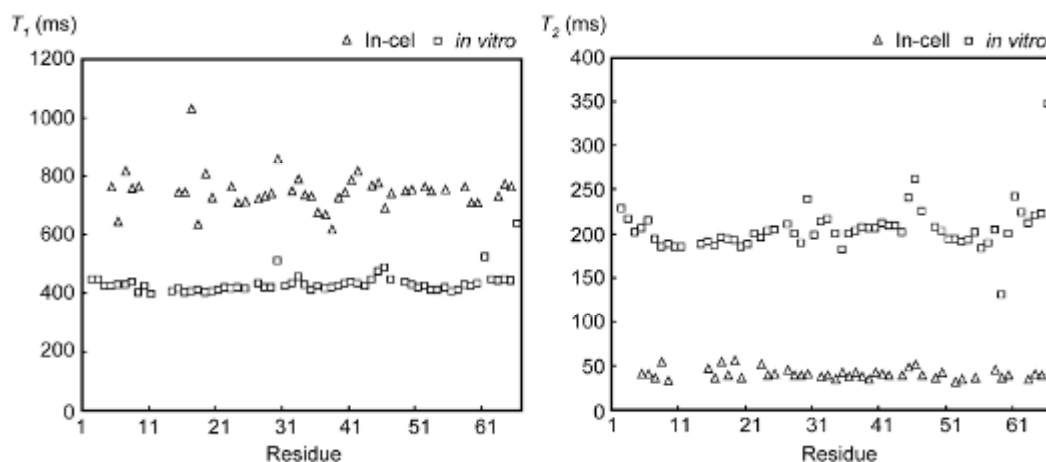


Figure 1

Plots of the  $^{15}\text{N}$   $T_1$  (left) and  $T_2$  (right) relaxation parameters of TTHA1718 in living *E. coli* cells (triangle) and *in vitro* (square) against the amino acid residue number.

### 【参考文献】

- 1) Fallow N A. et al. *Biochemistry* 33, 5984-6003(1994).
- 2) Serber, Z. et al. *J. Am. Chem. Soc.* 123, 2446–2447 (2001).
- 3) Ellis, R. J. *Trends Biochem. Sci.* 26, 597-604 (2001)
- 4) Sakakibara, D. et al. *Nature.* 458, 102-105 (2009)
- 5) Wang, C. et al. *J. Am. Chem. Soc.* 125, 8968 - 8969 (2003)
- 6) Gautier, A. et al. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17, 768-774 (2010)

## P51

### NF- $\kappa$ Bシグナリングに関わるユビキチン結合型Zn<sup>2+</sup>フィンガードメインの構造・機能解析

○天野剛志<sup>1</sup>, 市川大哉<sup>2</sup>, 池上貴久<sup>3</sup>, 廣明秀一<sup>1</sup>

<sup>1</sup>神戸大・院・医

<sup>2</sup>神戸大・医

<sup>3</sup>阪大・蛋白研

### Structural and functional analyses of ubiquitin-binding Zn<sup>2+</sup> domain in NF- $\kappa$ B signaling pathway

○Takeshi Tenno<sup>1</sup>, Hiroya Ichikawa<sup>1</sup>, Takahisa Ikegami<sup>3</sup>, Hidekazu Hiroaki<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Graduate School of Medicine, Kobe University, Hyogo, Japan.

<sup>2</sup>School of Medicine, Kobe University, Hyogo, Japan.

<sup>3</sup>Institute for Protein Research, Osaka University, Osaka, Japan.

NEMO and Optineurin are homologous scaffold proteins of protein-protein interactions and regulate the NF- $\kappa$ B signaling. They have Coiled-coil 1 and 2 (CC1 and CC2), a leucine zipper (LZ), and a C-terminal zinc finger (ZnF) domain. The regions from CC2 to LZ have been shown to interact K63-linked and/or linear polyubiquitin chains and have a critical role in the NF- $\kappa$ B signaling. The role of the C-terminal ZnF domain of Optineurin remains unknown, although the ZnF domain of NEMO has been reported the solution structure and the interaction with ubiquitin.

To elucidate the function of the ZnF domain of Optineurin, we determined the solution structures of NEMO and Optineurin and analyzed the interaction with ubiquitin and the intracellular localization. These data suggest that the ZnF domain of Optineurin has a distinct function from that of NEMO, despite the interaction with ubiquitin chains.

NEMO (NF- $\kappa$ B essential modulator)はNF- $\kappa$ B (nuclear factor  $\kappa$ B)シグナル伝達経路に関与する必須の調節因子である。転写因子NF- $\kappa$ Bは通常サイトゾルで阻害因子I $\kappa$ B (inhibitor of NF- $\kappa$ B)と複合体を形成し、不活性の状態にある。腫瘍壊死因子(TNF)等による細胞外からの刺激が膜受容体・アダプタータンパク質複合体を介してIKK (I $\kappa$ B kinase)複合体 (IKK $\alpha$ , IKK $\beta$ , NEMO)へ伝えられると、活性化したIKK複合体はI $\kappa$ Bをリン酸化する。この過程においてNEMOはK63リンクポリユビキチン鎖に相互作用しキナーゼ活性を調節する足場タンパク質として機能している。ヒトNEMOは約50 kDaからなるタンパク質で、2カ所のコイルドコイル(CC1, CC2)、ロイシンジッパー(LZ)、ジンクフィンガー (ZnF)の各ドメインをもっている。一方、OptineurinをコードしているOPTNはもともと緑内障の原因遺伝子の一つとして同定され、最近では筋萎縮性側索硬化症 (ALS)の原因遺伝子としても報告されている。OptineurinはNEMOとアミノ酸配列の相同性が高く、同様のドメイン構造を有している。NEMOと同様にOptineurinはK63ポリユビキチン鎖に相互作用するが、IKK $\alpha$ 、IKK $\beta$ には相互作用しな

---

Zn<sup>2+</sup>フィンガードメイン, ユビキチン, NF- $\kappa$ Bシグナリング

○てんのたけし, いちかわひろや, いけがみたかひさ, ひろあきひでかず

いため、ポリユビキチン鎖との相互作用においてNEMOと拮抗し、NF- $\kappa$ B活性化を負に制御していると示唆されている。

NEMOのZnFドメインについては、合成ペプチドを使って溶液構造が決定されており、ユビキチンと相互作用することが報告されている。一方、OptineurinのZnFドメインについては、アミノ酸配列はNEMOとの相同性は高いが、構造および機能は未知である。

本研究では、NEMOおよびOptineurinのZnFドメインの構造を決定し、それらの機能解析を進めた。安定同位体ラベルを導入したZnFドメインを調製し、NMRを用いてそれらの構造を解析した。その結果、これらのZnFドメインは2本の $\beta$ -ストランド、1本の $\alpha$ -ヘリックスから構成され、システイン3残基、ヒスチジン1残基で亜鉛原子を配位する典型的なCCHCタイプのZnFドメインであった。

構造を詳細に見ると、NEMOのZnFドメインでは、Tyr402のフェノール環とHis413のイミダゾール環がスタックすることで $\beta$ -シート構造の安定化に寄与している。一方で、OptineurinではTyr402に相当する残基がGlu560になっているため、NEMOで見られたようなスタック構造はなく側鎖が外へ突き出しているため、 $\beta$ -シート構造付近の収束が悪くなっていた。

亜鉛原子を配位している4残基のうち最後のシステイン残基は、C末端に非常に近い位置にあるため、このシステインに変異が生じれば亜鉛との親和性は著しく低下し、立体構造を保持できないと予想できる。実際にNEMOのC417F変異体について、野生型のサンプルと同様に調製し $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ 相関スペクトルを測定したところ、野生型と全く異なるスペクトルが得られ、ほとんど立体構造を保持していない結果が得られた。この残基の変異はHDE-ID（低汗性外胚葉形成不全を伴う免疫不全症）を引き起こすことが知られている。したがって、変異によるZnFドメインの構造異常が病気の原因の可能性のひとつと考えられる。

また、GST-プルダウン実験およびNMR滴定実験により、OptineurinのZnFドメインもユビキチンと弱く相互作用することを見いだした。直鎖状ポリユビキチン鎖との相互作用を解析したところ、ポリユビキチン鎖のサブユニットが多くなればなるほど強く相互作用することが明らかとなった。したがって、NEMOと同様にOptineurinのZnFドメインもユビキチン（鎖）と相互作用することが機能の一つであると考えられる。さらに、培養細胞においてEGFP融合Optineurinを一過的に発現させたところ、ZnFドメインを欠損させた変異体では、野生型と比べて細胞内局在に変化が見られた。NEMOのZnFドメインにおいては同様の報告はなされておらず、細胞内局在変化はOptineurin独自の機能と考えられる。

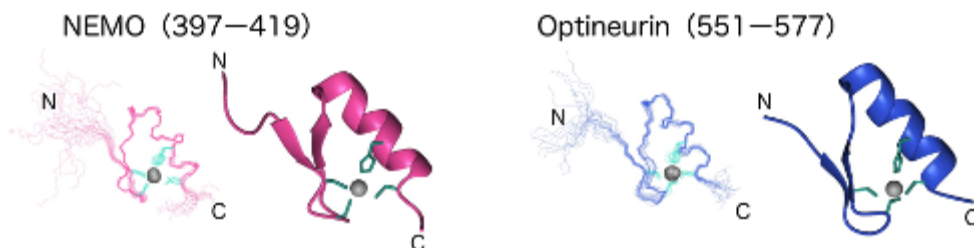


Fig. Solution structures of the ZnF domain of NEMO (left) and Optineurin (right)

## 細胞内セラミド輸送タンパク質CERTの小胞体-Golgi体間局在変化を制御するリン酸化依存的分子内相互作用の構造生物学的解析

○杉木俊彦<sup>1</sup>, 高橋栄夫<sup>2,3</sup>, 竹内恒<sup>2</sup>, 花田賢太郎<sup>4</sup>, 嶋田一夫<sup>2,5</sup>

<sup>1</sup>バイオ産業情報化コンソーシアム、<sup>2</sup>産総研・バイオメディシナル情報研究センター、<sup>3</sup>横浜市大院・生命ナノ、<sup>4</sup>国立感染研・細胞化学、<sup>5</sup>東大院薬

### Phosphorylation-dependent intramolecular interaction revealed by NMR might regulate ER-Golgi shuttling of CERT

○Toshihiko Sugiki<sup>1</sup>, Hideo Takahashi<sup>2,3</sup>, Koh Takeuchi<sup>2</sup>, Kentaro Hanada<sup>4</sup>, and Ichio Shimada<sup>2,5</sup>

<sup>1</sup>Japan Biological Informatics Consortium, Tokyo, Japan. <sup>2</sup>BIRC, AIST, Tokyo, Japan.

<sup>3</sup>Grad. Sch. Nanobiosci., Yokohama City Univ., Kanagawa, Japan. <sup>4</sup>NIID, Tokyo, Japan.

<sup>5</sup>Grad. Sch. Pharm. Sci., The Univ. of Tokyo, Tokyo, Japan.

Intracellular ceramide trafficking protein (CERT) translocates from the endoplasmic reticulum to the Golgi utilizing specific interaction between the CERT PH domain and phosphatidylinositol 4-monophosphate (PtdIns(4)P), a landmark phospholipid in a Golgi apparatus. Recently, it is shown that the phosphorylation of the serine repeat (SR) motif located on the carboxyl terminal side of the CERT PH domain attenuate the CERT PH domain/Golgi interaction.

In this study, we revealed that the phosphorylated CERT SR motif interacts with the PtdIns(4)P-binding site of the CERT PH domain in an intramolecular manner. In addition, the intramolecular interaction competitively reduced the CERT PH domain/PtdIns(4)P binding *in vitro*. Thus, intramolecular interaction mediated by the phosphorylated SR motif might be one of the driving forces to accelerate dissociation of CERT from the Golgi.

細胞内セラミド輸送タンパク質(CERT)は、小胞体膜上で生合成された脂質分子セラミドをGolgi体へと輸送する細胞質タンパク質である。CERTは小胞体-Golgi体間をshuttlingして細胞内セラミド輸送を行っていると考えられているが、その具体的なメカニズムについては不明な点が多い。

CERTのN末端に存在するプレクストリン相同(PH) domainは、Golgi体膜上に豊富に存在している脂質分子phosphatidylinositol 4-monophosphate (PtdIns(4)P)を特異的に認識する機能ドメインで、CERTを小胞体からGolgi体膜上へと移行させる。最近、CERT PH domainのC末側に存在する36アミノ酸残基からなるserine repeat (SR) motifに存在する10ヶ所のセリンおよびスレオニン残基がGolgi体膜上でリン酸化修飾を受け、これによってCERT PH domainのGolgi体への局在が解消されるとの報告がなされた。CERTがセラミド輸送を終えた後、Golgi体から解離して小胞体に向かう必要があ

---

セラミド輸送タンパク質、リン酸化、分子内相互作用

○すぎき としひこ, たかはし ひでお, たけうち こう, はなだ けんたろう, しまだ いちお

るが、そのステップがSR motifのリン酸化によって制御されている可能性がある。そこで我々は、その仮説を検証することでCERTのセラミド輸送活性の制御機構を解明することを目的として、CERT PH domain-Golgi体間相互作用に対するSR motifのリン酸化の影響について構造生物学的解析を行った。

【方法】 CERT PH domain(PH(wt))、CERT PH domain + SR motif(PHSR(wt))、およびSR motifの10ヶ所のリン酸化部位の残基をGluに置換してリン酸化状態を模倣したCERT PH domain + SR motif(PHSR(10E))の計3種のコンストラクト(Fig. 1)について、大腸菌発現系にて均一<sup>15</sup>N標識体を調製した。それぞれの<sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQCスペクトルを測定、比較するとともに、PtdIns(4)P添加に伴う化学シフト値の変化を比較した。

【結果】 3種のタンパク質の<sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQCスペクトルを比較した結果、SR motifのリン酸化状態を模倣したPHSR(10E)においてのみ顕著に化学シフト値が変化する残基が存在した(Fig. 2 A, B)。それらの残基をCERT PH domainの立体構造上にマッピングすると、PtdIns(4)P結合部位に存在する残基であることがわかった(Fig. 2 C)。このことは、リン酸化されたSR motifがCERT PH domain上のPtdIns(4)P結合部位と分子内相互作用する可能性を示唆する。

次に、上記3種のタンパク質についてPtdIns(4)P滴定実験を行い、PtdIns(4)Pとの相互作用に伴う化学シフト値の変化を調べた。その結果、PH(wt)およびPHSR(wt)に比べて化学シフト値の変化量が小さく、PtdIns(4)P-bound stateに達しないシグナルがPHSR(10E)のスペクトル中に存在した(Fig. 3, G39など)。すなわちこの結果は、リン酸化SR motifがCERT PH domain-PtdIns(4)P間の結合を減弱させている可能性を示唆する。

【考察】 以上の溶液NMR実験から、SR motifがリン酸化されると、CERT PH domainのPtdIns(4)P結合サイトにSR motifが分子内相互作用して、CERT PH domain-PtdIns(4)P間結合を競合的に減弱することで、CERTのGolgi体からの解離が促進される可能性が考えられる(Fig. 4)。現在、より詳細な解析を行うため、上記3種のタンパク質のGolgi体模倣リポソームに対する結合活性の測定およびPHSR(10E)の立体構造解析を進めている。

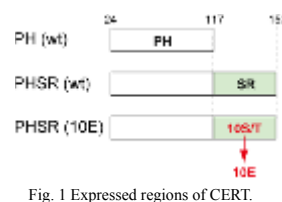


Fig. 1 Expressed regions of CERT.

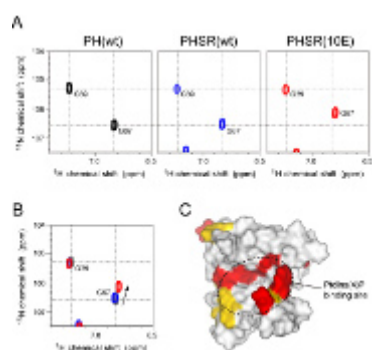


Fig. 2 (A) <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC spectra. (B) Overlaid <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC spectra. (C) Mapping of the residues which shows significant chemical shift changes in the PHSR(10E).

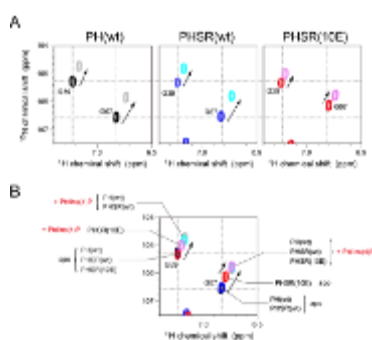


Fig. 3 (A) <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC spectra. The chemical shift changes were observed when PtdIns(4)P was added (as denoted by arrows). (B) Overlaid <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC spectra.

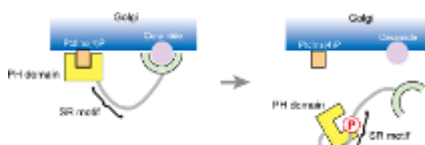


Fig. 4 Functional model of CERT. Sufficient dissociation of the CERT from the Golgi could be regulated by the competing interaction between the CERT PH domain and the phosphorylated SR motif.



## P53

### ループ変異による蛋白質ダイナミクスの変化 - 高圧 NMR 法を用いた E. coli DHFR の研究

○Sunilkumar N. Puthenpurackal<sup>1,2</sup>、前野 寛大<sup>1,2</sup>、和田 侑士<sup>3</sup>、楯 真一<sup>3</sup>、赤坂一之<sup>2</sup>

<sup>1</sup>近大生物理工, <sup>2</sup>近大高圧蛋白研センター, <sup>3</sup>広大理

### Effect of loop mutation on protein dynamics - A high pressure NMR study of E.coli DHFR

○P.N. Sunilkumar<sup>1,2</sup>, Akihiro Maeno<sup>1,2</sup>, Yuji Wada<sup>3</sup>, Shin-ichi Tate<sup>3</sup> and Kazuyuki Akasaka<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Grad. Sch. Biol and Sci, Kinki Univ., <sup>2</sup>HPPRC, Kinki Univ., <sup>3</sup>Grad. Sch. Sci, Hiroshima Univ.

The presence of a less populated (~10%) hidden equilibrium open conformation of folate bound E.coli DHFR, in addition to the basic folded occluded conformer, has been reported using variable pressure NMR technique (1). This open conformer is very crucial for the catalytic activity of DHFR. The purpose of this study is to find out how a single mutation at a site (Gly67) remote from the functional site affects the conformational fluctuations at the functional site of E.coli dihydrofolate reductase (DHFR). We have applied the variable pressure <sup>1</sup>H/<sup>15</sup>N HSQC NMR technique (from 30 to 2000bar) to the Gly67Val mutant of E.coli DHFR. Here we report the changes in the conformational fluctuations at the NADPH binding site of folate bound E.coli DHFR and also the shift in the equilibrium between the basic folded occluded conformer and the open functional conformer by Gly67Val mutation.

#### Introduction

Dihydrofolate reductase (DHFR) catalyses the reduction of 7,8-dihydrofolate (DHF) to 5,6,7,8-tetrahydrofolate (THF) by hydride transfer from the NADPH cofactor, which is essential for purine and thymidylate synthesis and hence for cell growth and proliferation (1). Gly67 residue is evolutionarily conserved in DHFR and occupies on a loop (residues 64-72) that is oriented away from the functional site. It has been reported that mutations at Gly67 slightly changed the stability and function despite that the  $\alpha$ -carbon at this site is 29.3 Å apart from catalytic residue Asp27 (2). The presence of a less populated (~10%) hidden equilibrium open conformation of folate bound E.coli DHFR, in addition to the basic folded occluded conformer, has been reported using variable pressure NMR technique (1). This open conformer is very crucial for the catalytic activity of DHFR. This open functional conformer differs in the orientation of M20 loop and C & F helices from that of the occluded basic folded conformer (**Figure 1**).

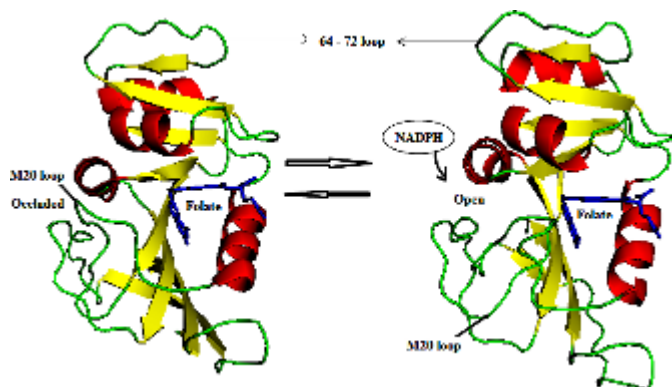
In this study we have applied the variable pressure NMR technique (from 30 to 2000bar) to the Gly67Val mutant of E.coli DHFR in order to understand how a single mutation at a site remote

---

キーワード: DHFR, 可変圧力 NMR 法, loop mutation

ふりがな: ○すにるくまーる ぷつつえんぷらつかる、まえの あきひろ、わだ ゆうじ、たてしんいち、あかさか かずゆき

from the functional site affects the conformational fluctuations at the functional site and also the nature and population of the open conformer of DHFR.



**Figure 1:** Equilibrium between the open and occluded conformers of folate bound DHFR

### **Materials and methods**

Uniformly  $^{15}\text{N}$ -labeled DHFR Gly67Val mutant was obtained from the laboratory of Prof. Shin-ichi Tate, Department of Mathematical and Life Sciences, Hiroshima University. The sample was prepared in 20 mM Tris buffer (pH 7.0) with a protein concentration of 1.2 mM and a folate concentration of 4.5 mM. Variable pressure  $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ HSQC spectra were recorded at pressures between 30 and 2000 bar using a standard HSQC sequence with sensitivity improvement on a 600 MHz Bruker AVANCE spectrometer. All the variable pressure spectra were recorded at 15°C. The temperature dependent spectra were recorded at temperatures from 15 to 35°C at an interval of 5. The  $^{15}\text{N}$  dimension was acquired with 128 increments and for the proton dimension 2048 complex data points were collected. Data were processed using NMRPipe program and analyzed using CCPNMR program.

The thermodynamic parameter changes between the two conformers,  $\Delta G$ ,  $\Delta V$ ,  $\Delta H$  and  $\Delta S$ , were obtained by fitting the following equations to the peak intensity change as a function of pressure and/or temperature.

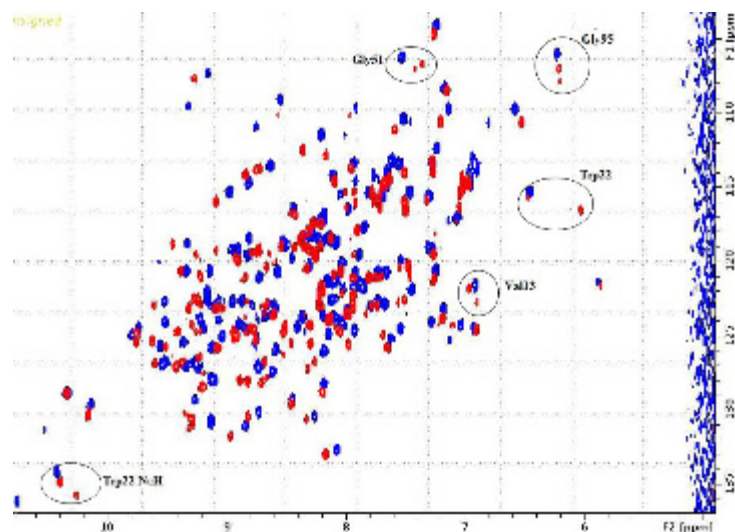
$$\Delta G = - RT \ln K = \Delta G_0 - (p - p_0) \Delta V \dots\dots\dots(1)$$

$$\Delta G = - RT \ln K = \Delta H - T\Delta S \dots\dots\dots(2)$$

### **Results**

In this study, the cross-peaks corresponding to the residues Val13, Trp22 (both main chain and side-chain) Gly51 and Gly95 showed splitting with pressure (**Figure 2**). The intensity of the second peak was found to be increasing with pressure and that of the original peak decreasing (**Figure 3**). This intensity change showed the population change between the basic folded

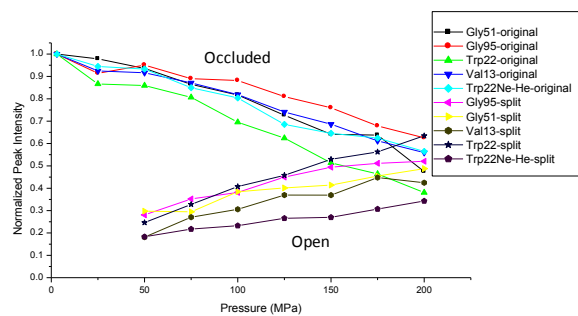
occluded conformer and the open conformer.



**Figure 2:**  $^{15}\text{N}/^1\text{H}$  spectra of folate bound DHFR at 30 bar (blue) and 2000bar (red). The cross peaks that split into two at high pressure are encircled.

The residues Val13 and Trp22 are located at both ends of the M20 loop and the residues Gly51 and Gly95 are near the ends of C and F helices. Results showed that the open functional conformer of Gly67Val mutant differs in the orientation of M20 loop and C & F helices from that of the occluded basic folded conformer as in the case of WT DHFR. The determination of  $\Delta G^\circ$  and  $\Delta V$  values between the two conformers showed that the population and hydration of the second open conformer, at 1 bar, were slightly changed by mutation when compared to that of the WT. From the variable temperature HSQC spectra, at 2000 bar, we could estimate the  $\Delta H$  and  $\Delta S$  values between the two conformers. The  $\Delta H$  and  $\Delta S$  values also supported the above observation. It has been reported that mutations at Gly67 site slightly changed the stability and function despite that the  $\alpha$ -carbon at this site is 29.3 Å apart from the catalytic residue Asp27 (2). This slight difference, between the open conformers of the wild-type and mutant DHFRs, may be responsible for the slight change in function by mutation at Gly67 site.

The analysis of the pressure dependent chemical shift and peak intensity changes was also done to obtain the difference in the site-specific conformational fluctuations between WT and G67V mutant DHFR.



**Figure 3:** Change in intensities of the peaks corresponding to the occluded and open conformers of folate bound E.coli DHFR

## References

1. Ryo Kitahara, Sina Sareth, Hiroaki Yamada, Eiji Ohmae, Kunihiko Gekko and Kazuyuki Akasaka (2000), *Biochemistry*, 39, 12789-12795.
2. Eiji Ohmae, Koji Iriyama, Shigeyuki Ichihara and Kunihiko Gekko (1996), *J. Biochem.*, 119, 703-710.

## P54

### アメロジェニンの自己集合の性質

○熊木康裕<sup>1</sup>、相沢智康<sup>2</sup>、神谷昌克<sup>2</sup>、出村誠<sup>2</sup>、河野敬一<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>北大・理、<sup>2</sup>北大・先端生命

#### **Self-assembly properties of amelogenin**

○Yasuhiro Kumaki<sup>1</sup>, Tomoyasu Aizawa<sup>2</sup>, Masakatsu Kamiya<sup>2</sup>, Makoto Demura<sup>2</sup> and Keiichi Kawano<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>Graduate School of Science, Hokkaido University, <sup>2</sup>Graduate School of Life Science, Hokkaido University)

Amelogenin is a major component of enamel matrix proteins. The self-assembly of the amelogenin is believed to play an essential role in regulating the growth and organization of enamel crystals during enamel formation. Recently, it was reported that the self-assembly of the amelogenin is sensitive to the temperature and pH. The elucidation of the amelogenin assembly process is indispensable for the understanding of the mechanisms of enamel formation. Assemblies of the amelogenin in themselves are not suitable for NMR measurement because of their apparent molecular size and pure solubility in water. Therefore, in order to obtain the structural information at the residue level, DMSO-quenched H/D exchange experiments were performed.

アメロジェニンはエナメルマトリクス蛋白質の主要な成分である。この蛋白質は pH や温度に依存して自己集合する<sup>[1],[2]</sup>。このようなアメロジェニンの自己集合は、エナメル組織の形成において重要な役割を果たしていることが知られている。この自己集合過程を解明することはエナメル組織の形成メカニズムを理解する上で不可欠である。

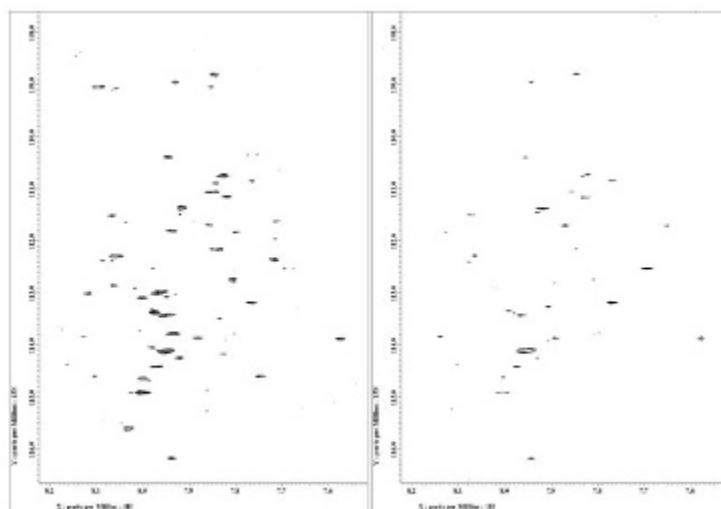
これまでアメロジェニンの単量体については、NMR 解析の結果から、伸びきった構造をとることが既に報告されている<sup>[3]</sup>。一方、自己集合体についての NMR 解析の報告例は未だない。自己集合体自身を直接 NMR で解析することは、分子サイズや水への溶解度の問題から極めて困難であるためであると考えられる。そこで本研究では、H/D 交換によって重水素ラベルされたアメロジェニンの自己集合体を DMSO 中で測定することで<sup>[4]</sup>、

---

キーワード： アメロジェニン、自己集合、重水素交換

○くまきやすひろ、あいざわともやす、かみやまさかつ、でむらまこと、かわのけいいち

自己集合体の残基レベルでの構造情報を求めた。DMSO 中における  $^1\text{H}$  及び  $^{15}\text{N}$  の化学シフトは、各種三重共鳴法により行った。詳細は討論会にて議論する予定である。



**Figure**  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spectra of  $^{15}\text{N}$ -labeled recombinant porcine amelogenin in DMSO- $\text{d}_6$  at 300 K after H/D exchange period of 3 hours (left) and 12 hours (right). 2 mM amelogenin dissolved in  $\text{H}_2\text{O}$  at pH 3.0 (in this pH, amelogenin molecules exist as monomers) were diluted with 10-fold  $\text{D}_2\text{O}$  at pH 7.0 (at this pH, amelogenin molecules occur self-assembly) and incubated at 283 K for H/D exchange. After H/D exchange period, the samples were frozen with liquid nitrogen and lyophilized. Lyophilized proteins were dissolved in 90 % DMSO- $\text{d}_6$  (10%  $\text{D}_2\text{O}$ ) at pH 5.0 (adjusted with TCA)

<参考文献>

- [1] Moradian-Oldak J, Leung W, Fincham AG. *J. Struct. Biol.* **122**:320-327, 1998.
- [2] Petta V, Moradian-Oldak J, Yannopoulos SN, Bouropoulos N. *Eur. J. Oral Sci.* **114** (Suppl. 1): 308-314, 2006.
- [3] Delak K, Harcup C, Lakshminarayanan R, Sun Z, Fan Y, Moradian-Oldak J, Evans JS. *Biochemistry*, **48**, 2272-2281, 2009.
- [4] Hoshino M, Katou H, Hagihara Y, Hasegawa K, Naiki H, Goto Y, *Nat. Struct. Biol.* **9**, 332-336, 2002.

## P55

### コア変異による蛋白質ダイナミクスの変化- 高圧NMR法を用いたstaphylococcal nuclease V66K変異体の研究

○前野 覚大<sup>1,2</sup>, 秦 和澄<sup>3</sup>, 北原 亮<sup>4</sup>, Michael Chimenti<sup>5</sup>, Bertrand E. Garcia-Moreno<sup>5</sup>, Julien Roche<sup>6</sup>, Christian Roumestand<sup>6</sup>, Karine M. Guillen<sup>6</sup>, Catherine A. Royer<sup>6</sup>, 赤坂 一之<sup>2</sup>

<sup>1</sup>近大院・生物理工, <sup>2</sup>近大高圧蛋白研センター, <sup>3</sup>立命大GIRO, <sup>4</sup>立命大・薬, <sup>5</sup>Johns Hopkins Univ. Biophysic., <sup>6</sup>INSERM・CBS

### Effect of mutation in the core on protein dynamics - A high pressure NMR study of staphylococcal nuclease V66K.

○Akihiro Maeno<sup>1,2</sup>, Kazumi Hata<sup>3</sup>, Ryo Kitahara<sup>4</sup>, Michael Chimenti<sup>5</sup>, Bertrand E. Garcia-Moreno<sup>5</sup>, Julien Roche<sup>6</sup>, Christian Roumestand<sup>6</sup>, Karine M. Guillen<sup>6</sup>, Catherine A. Royer<sup>6</sup>, Kazuyuki Akasaka<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Grad. Sch. Biol and Sci, Kinki Univ., <sup>2</sup>HPPRC, Kinki Univ., <sup>3</sup>GIRO, Ritsumeikan Univ., <sup>4</sup>Pharm., Ritsumeikan Univ., <sup>5</sup>Biophysic. Johns Hopkins Univ., <sup>6</sup>CBS, INSERM.

Two-state global unfolding of V66K variant occurs cooperatively at high pressure without clear local unfolding, while the partial disordering is observed at turn region. The thermodynamic stability of native state ( $\Delta G^0$ ) is quite different between V66K (~3 kcal/mol) and reference protein (~12 kcal/mol). Unusual pressure shifts (linear and/or non-linear) are observed on the widespread region ( $\beta$ -barrel, helix-1 and helix-3) of V66K variant, suggesting a presence of low-lying excited state characterized as the alternative native state with remarkable non-linear pressure shifts. These results indicate that the substitution of Val-66 with Lys inside of core region affect the rapid conformational fluctuation (< ms) within native state ensemble, that may occur due to the water penetration into hydrophobic core.

<序>

Staphylococcal nuclease (SNase) の $\Delta$ +PHSは、SNase野生型 (WT) に対して44-49番アミノ酸残基のdeletion及び5か所のアミノ酸置換 (P117G, H124L, S128A, G50F, V15N) を加えたpseudo wild typeであり、疎水コア内部におけるイオン性アミノ酸の存在を許容するhyperstable formとして知られている。SNase  $\Delta$ +PHSのV66K変異体は疎水コア内部にLys側鎖を持ち、側鎖のpKaは5.7 (水分子中でのpKaは通常10.4付近) へと変化する。 $\Delta$ +PHSとV66K変異体の結晶構造は互いに酷似しているが、Lys-66がチャージを持たないpH条件では、Lys-66の長い側鎖は疎水コア深部にまで入り込んでおり蛋白質の分子表面から約12Å離れている。

<キーワード> 高圧 NMR, 蛋白質ダイナミクス, Staphylococcal nuclease V66K

<ふりがな> ○まえの あきひろ、はた かずみ、きたはら りょう、まいける きめんてい、ばーとらんど がるしあもれーの、じゅりあん ろしえ、くりすていあんるーめすたんど、きゃさりん ろいやー、あかさか かずゆき

疎水コア領域の変異が蛋白質のダイナミクスに及ぼす影響を調べるため、本研究では SNase V66K 変異体の構造揺らぎを高圧 NMR 法で調べ、 $\Delta$ +PHS の結果と比較した。

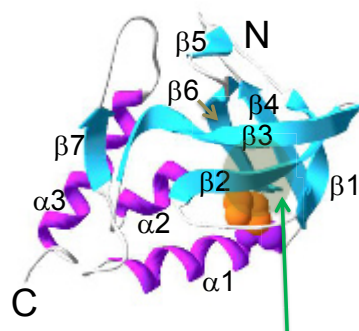
#### <結果・考察>

疎水コア内部に存在する Lys-66 がチャージを持たない pH6 の条件下において、V66K 変異体の構造及びダイナミクスの特性を高圧 NMR 法で調べた。

常圧下で観測された V66K 変異体のピコ秒-マイクロ秒オーダーのダイナミクスは、 $\Delta$ +PHS のそれと比較しても大きな差異は見られなかった。他方、低い圧力範囲では (< 1500 bar)、各アミノ酸残基に対応する全ての  $^1\text{H}$  及び  $^{15}\text{N}$  化学シフトで明らかな圧力応答が観測された。

これらは主に、平均の水素結合距離と二面角 ( $\phi, \psi$ ) が加圧に伴い変化した事を反映している。大部分のクロスピークが加圧に伴う線形応答 (linear pressure shift) を示したが、幾つかの NMR 信号は非線形の圧力応答 (non-linear pressure shift) を示した。信号強度の減少を伴わない連続的な化学シフト変化は、蛋白質の構造揺らぎが速い時間スケール (< ms) で起きていることを示している。ここで、圧力シフトにおける非線形応答を定量的に解析するため、 $^1\text{H}$  及び  $^{15}\text{N}$  圧力シフトに対して多項式 (二次元) のフィッティングを施した。その結果、V66K 変異体において、疎水コア内部の Lys-66 に近接した helix-1 と  $\beta$ -barrel 領域に分布する幾つかのアミノ酸残基で高い非線形性 (high non-linearity) の圧力シフト ( $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ ) が観測された。圧力シフトに見られる顕著な非線形応答は、フォールド構造アンサンブル内における低い励起構造 (low-lying excited conformer) の存在を示しており、励起構造の分布率が加圧に伴い増加したと考えられる。これらの結果は、 $\Delta$ +PHS コア領域の Val-66 が Lys に置換 (V66K) された効果により、low-lying excited conformer を含むフォールド構造アンサンブル内の速い構造揺らぎ (< ms) が疎水コア周辺 (helix-1,  $\beta$ -barrel) で増大した事を示しており、これら低い励起構造への構造転移は疎水コアの局所的な水和を伴う事が予想された。

また、高い圧力範囲 (> 1500 bar) において、V66K 変異体の NMR 信号強度が、幾つかのループ領域に対応するアミノ酸残基を除いて、加圧に伴う協同的な減少を示した。これは、V66K 変異体ではフォールド-アンフォールド構造の二状態間で global unfolding が生じることを示している。さらに、見積もられた  $\Delta G^0$  は  $\Delta$ +PHS のそれと比べて大きく減少しており ( $\Delta G^0$  (V66K) =  $\sim 3$  kcal/mol,  $\Delta G^0$  ( $\Delta$ +PHS) =  $\sim 12$  kcal/mol)、Lys 側鎖の導入により分子全体の構造安定性が顕著に低下する事が明らかになった。



**Hydrophobic core surrounded by the  $\beta$ -barrel ( $\beta 1 - \beta 6$ )**

Fig.1 Tertiary structure of Snase V66K



## P56

### IQGAP1のCHドメインのNMR構造およびアクチン認識機構の解析

○梅本良<sup>1, 2</sup>, 西田紀貴<sup>1</sup>, 荻野新治<sup>1, 2</sup>, 嶋田一夫<sup>1, 3</sup>

<sup>1</sup>東大・院薬系

<sup>2</sup>JBIC <sup>3</sup>BIRC, AIST

### NMR structure of the CH domain of IQGAP1 and its implications for the actin recognition mode

○Ryo Umemoto<sup>1,2</sup>, Noritaka Nishida<sup>1</sup>, Shinji Ogino<sup>1,2</sup>, and Ichio Shimada<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Grad. Sch. Pharm. Sci. The Univ. of Tokyo, Tokyo, Japan.

<sup>2</sup>JBIC, Tokyo, Japan. <sup>3</sup>BIRC, AIST, Tokyo, Japan.

IQ-domain GTPase-activating protein 1 (IQGAP1), a multi-domain protein with a molecular mass of 189 kDa, promotes actin crosslinking at the leading edge of cells, under the control of the small GTPases; Rac1 and Cdc42. Previous studies demonstrated that the direct interaction between actin filaments (F-actin) and IQGAP1 is essential for the promotion of cell migration. This interaction is mediated through an N-terminal actin-binding domain (ABD) (residues 1-210), which contains a calponin homology (CH) domain. In this presentation, as a first step toward understanding the mechanism of the actin-recognition by the single CH domain family, we solved the NMR structure of the actin binding domain of IQGAP1.

IQGAP1は細胞の浸潤先端に局在し、低分子量Gタンパク質であるRac1やCdc42の下流でアクチンを認識し、その束化を促進するタンパク質である。先行研究により、アクチンフィラメント(F-アクチン)とIQGAP1との相互作用が、細胞の遊走に必須であることが示されている。この相互作用はIQGAP1のN末端に存在する calponin homology (CH) ドメインによって担われているが、その構造およびF-アクチンとの相互作用様式は解明されていない。CHドメインは3つのサブクラスに分類され、アクチンを認識する多くのCHドメインはタイプ1/2に属する。タイプ1/2のCHドメインはタンデム型のCHドメインにてアクチンを認識する一方で、IQGAP1の属するタイプ3のCHドメインは単一のCHドメインにてアクチンを認識する。しかしながら、その認識機構に関してはほとんど知見が得られていない。そこで本研究においては、単一のCHドメインのアクチン認識機構を解明する第一歩としてIQGAP1のCHドメインのNMR構造決定を行い、そのF-アクチン結合様式に関する考察を行った。

[方法]

CHドメインはF-アクチン結合活性を有することが報告されているアクチン結合ドメイン(actin-binding domain; ABD) であるアミノ酸残基1-210およびトリプシン限定分解実験から構造非形成領域と判断したN末端25残基を除去したABD<sub>26-210</sub>を調製した。両コンストラクトが同等のF-アクチン結合活性を有することをSPR実験により確認した。ABD<sub>26-210</sub>に関して定法に従って三重共鳴実験を行い、NMR構造を決定した。

---

IQGAP1, Actin, Interaction

○うめもとりょう, にしだのりたか, おぎのしんじ, しまだいちお

## [結果と考察]

### ABDの立体構造

IQGAP1のABDは7本の $\alpha$ ヘリックスから構成されており、他のCHドメインの間で保存されている6本のヘリックスとそれに続くextension領域(アミノ酸残基161-210)からなることが判明した (Fig. 1 A)。このextension領域は長いループと中央に存在する1本の $\alpha$ ヘリックスからなり、CHドメインと密接にコンタクトしていた。IQGAP1の酵母のホモログであるRng2と比較すると、両者の構造はよく似ていることがわかった。

### アクチン結合部位に関する考察

これまでにアクチンと結合する他のCH1ドメインにおいてアクチン結合部位 (actin binding site; ABS) として2つの部位 (ABS1およびABS2) が報告されている。IQGAP1のABDと他のCH1ドメインとのアラインメントから、ABS2に相当する領域の $\alpha 6$ ヘリックスに存在する疎水性残基が保存されていることが明らかとなった。このことから、これらの疎水性残基 (P146, Y150, A154, L157) がIQGAP1のABDにおいてアクチン結合を担っていると考えた。しかしながら、これらの残基はextension領域に位置する疎水性残基 (I194, P197, F199, I202) との long range NOE が観測され、溶媒に露出していないことが明らかとなった (Fig. 1 B)。

このことから、IQGAP1のアクチン認識様式に関して次のような2つの仮説を立てた。1) IQGAP1のアクチン結合部位はABS2ではなく、他の部位がアクチン認識を担っている。2) アクチン認識においてはABS2をマスクしているextensionに構造変化が生じ、ABS2が溶媒に露出する。興味深いことに、タイプ1/2に属するアクチン結合タンパク質である $\alpha$ -actininのCHドメインにおいてはABS2が構造変化を伴って溶媒に露出するという2) のようなメカニズムが提唱されている。

これら2つの仮説を検証するため、現在ABD上のアクチン結合界面を同定するための実験を進行中である。



Fig. 1 Solution structure and potential actin-binding site of ABD

A Stereoviews of the overlaid ensemble of the 20 final structures. The side chains in the structured region are shown.

B Ribbon diagram of ABD of IQGAP1, in which ABS2 and the extension are shown. Long range NOEs are observed between the residues in ABS2 and the extension.

### Reference

Umamoto R, Nishida N, Ogino S, and Shimada I (2010) *J. Biomol. NMR*, **48**, 59–64

## P57

### ホメオボックス遺伝子産物Six3のSixドメインの立体構造解析

○下條秀朗<sup>1</sup>, 岡村英保<sup>1</sup>, 長土居有隆<sup>1</sup>, 池田啓子<sup>2</sup>, 川上潔<sup>2</sup>, 西村善文<sup>1</sup>

<sup>1</sup>横浜市大・院生命ナノシステム

<sup>2</sup>自治医大・分子病態治療研究センター・細胞生物

#### NMR studies on the six domain of Six3

○Hideaki Shimojo<sup>1</sup>, Hideyasu Okamura<sup>1</sup>, Aritaka Nagadoi<sup>1</sup>, Keiko Ikeda<sup>2</sup>, Kiyoshi Kawakami<sup>2</sup>, and Yoshifumi Nishimura<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Supramolecular Biology, Graduate School of Nanobioscience, Yokohama City University, Kanagawa, Japan.

<sup>2</sup> Division of Biology, Center of Molecular Medicine, Jichi Medical University, Tochigi, Japan.

The first identified six gene family is sine oculis gene which is essential for the compound eye formation of *Drosophila*. The six family genes homologous to sine oculis gene have been found in many species. Their gene products, Six proteins contain a conserved Six domain (SD) consisting of 110 amino acids and a homeodomain (HD) consisting of 60 amino acids. Although several members of the six gene family interact with the eyes absent (*Eya*) gene family functioning as transcriptional activators, Six3 does not interact with any known member of the *Eya* family. Recently several reports suggested that mouse Six3 interact directly with two proteins: the mouse counterpart of the *Drosophila* transcriptional co-repressor, Groucho and the DNA replication inhibitor, geminin. The Six3 SD is important for interaction with Groucho and geminin. To understand the molecular basis of the Six3 SD, we determined the structure of the SD of mouse Six3 by using NMR

#### 【背景】

ヒトの体は一つの受精卵からはじまり、時間的空間的に厳密に制御されたシグナル分子や転写因子のネットワークによって、数多くの異なる機能を備えた細胞集団からなる個体になる。多くの難病性疾患は遺伝子機能の異常や発現の異常によっておこるが、発生過程にかかわる遺伝子異常による疾病も数多くみられる。

Six という命名の由来となった遺伝子はショウジョウバエの複眼形成に異常をきたす突然変異体の原因遺伝子として同定された *sine oculis* (*so*)である。その後 *so* と相同性を有する遺伝子としてマウスから 6 種類の Six (*sine oculis* related homeobox) 遺伝子、Six1~Six6 報告されている。Six 遺伝子群の保存領域は約 110 アミノ酸残基からなる Six ドメインと 60 アミノ酸残基からなる Six タイプホメオドメインである。

---

立体構造解析, シックスドメイン

○しもじょうひであき、おかむらひでやす、ながどいありたか、いけだけいこ、かわかみきよし、にしむらよしふみ

これら以外の領域には Six 遺伝子間での相同性はほとんど見られない。種々の生物種で同定された Six 遺伝子群はその相同性から 3 つのサブグループに分けられる。; Six1/Six2 (sine oculis subfamily), Six3/Six6 (optix subfamily), Six4/Six5 (Dsix4 subfamily) Six3/Six6 は眼の初期発生段階に発現する。Six ファミリータンパク質の Six ドメインは協同作用因子として知られている eyes absent (Eya) と相互作用することが知られているが、Six3/Six6 とは相互作用しない。最近、Six3/Six6 と相互作用する因子が 2 種類報告された; 転写抑制因子 Groucho、DNA 複製抑制因子 Geminin。この相互作用には Six ドメインが必要である。我々は Six3 の Six ドメインの構造と機能の相関を明らかにするため NMR による立体構造解析を行った。

#### 【実験】

大腸菌による大量発現系を用いて  $^{15}\text{N}$  標識または  $^{15}\text{N}, ^{13}\text{C}$  標識 Six ドメインを大量発現した。グルタチオンセファロスクロマトグラフィー後、PreScission Protease で GST タグを切断し、ゲルろ過クロマトグラフィーを用いて精製した。各種多次元多重共鳴 NMR 測定を行った。スペクトル解析には NMRPipe, Olivia を使用した。構造計算にはプログラム CYANA を用いた。

#### 【結果・考察】

各種三次元測定により帰属を行った (Fig.1)。 $^{15}\text{N}$  および  $^{13}\text{C}$ -NOESY スペクトルから得られる  $^1\text{H}$  間の距離情報とプログラム TALOS+による化学シフトから得られる主鎖二面角情報をもとに立体構造計算を行った。Six3 の Six ドメインの立体構造は、6 本の  $\alpha$  ヘリックスからなる  $\alpha$  バレル様構造であった。現在、最終構造に向けて構造計算を行っている。Six ファミリータンパク質の Six ドメインは大変よく保存されており、他の Six1~Six6 の Six ドメインも同様の構造であると考えられる。しかし Six3/Six6 は他の Six ファミリータンパク質と異なり Groucho や Geminin と結合することから、これらの結合部位を同定することで Six ドメインの構造から機能の違いを解明していきたい。

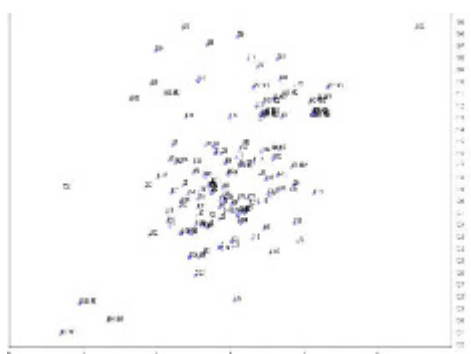


Fig 1.  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spectrum of the Six3SD

# P58

## CD44 リガンド結合ドメインの構造平衡が細胞のローリング活性に与える影響の解明

○鈴木美穂<sup>1</sup>, 西田紀貴<sup>1</sup>, 荻野新治<sup>1</sup>, 早坂晴子<sup>3</sup>, 宮坂昌之<sup>3</sup>, 嶋田一夫<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup>東大・院薬、<sup>2</sup>産総研・BIRC、<sup>3</sup>阪大・医

CD44-mediated cell rolling regulated by two-state conformational equilibrium of the hyaluronan-binding domain.

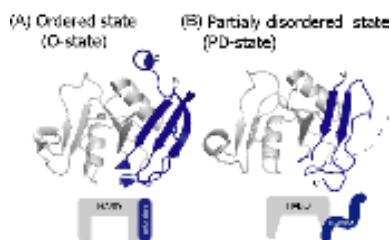
○Miho Suzuki<sup>1</sup>, Noritaka Nishida<sup>1</sup>, Shinji Ogino<sup>1</sup>, Haruko Hayasaka<sup>3</sup>, Masayuki Miyasaka<sup>3</sup>, Ichio Shimada<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Grad. Sch. Pharm. Sci., the Univ. of Tokyo, Tokyo, Japan <sup>2</sup>BIRC, AIST, Tokyo, Japan

<sup>3</sup>Osaka Univ. Grad. Sch. of Med., Osaka, Japan

CD44 is a receptor for hyaluronan (HA) that mediates lymphocyte homing. The extracellular portion of CD44 contains an HA-binding domain (HABD). Our previous study revealed that HABD has the structural equilibrium between the ordered (O) and partially disordered (PD) states. A mutant stabilized in the PD-state (Y161A) displayed a higher HA affinity than wild-type (WT). In this study, we made a mutant, called CC2, which is locked in the O-state by an intramolecular disulfide bond. The CC2 mutant exhibited a lower HA affinity than WT. In the cell rolling analysis, whereas the cells expressing WT CD44 smoothly rolled on the HA, the Y161A cells mainly exhibited the firm adhesion. The CC2 cells showed less stable rolling due to frequent detachment from HA. Based on these results, we conclude that the two-state equilibrium of CD44 HABD is important for CD44-mediated cell rolling

**【背景】** CD44 は細胞外マトリックスの主成分であるヒアルロン酸 (Hyaluronic acid:HA) を認識する受容体で、HA との相互作用を介し、がん細胞の浸潤やリンパ球のローリングに関与している。CD44 は一回膜貫通型のタンパク質で、細胞外領域に存在する Link module とその両端の付加配列からなる HA 結合ドメイン (HA binding domain:HABD) を介して HA を認識している。これまでに我々は、NMR による解析から、1) 溶液条件下では、HABD は C 末端付加配列領域が一定の構造を形成する “ordered state (O-state)” と一定の構造を形成しない “partially disordered state (PD-state)” の 2 種類の異なる立体構造をとり、その両者の平衡にあること、2) その平衡は、HA 非結合時には O-state へ、HA 結合時には PD-state へと偏ることを示した(Fig.2A, B)。さらに、恒常的に PD-state を形成する Y161A 変異体の HA 結合親和性は、野生型と比較し 5 倍程度上昇している



**Fig.1 Comparison between CD44 HABD structure with and without HA** (A) Crystal structure of the CD44 HABD without HA (PDB code: 1UUH). (B) NMR structure of the CD44 HABD with HA (PDB code: 2I83). N- and C-terminal extension is colored black. The C-terminal segment that becomes unfolded in the HA-bound state is described by a dashed line.

構造平衡、CD44、ローリング

○すずき みほ、にしだ のりたか、おぎの しんじ、はやさか はるこ、みやさか まさゆき、しまだ いちお

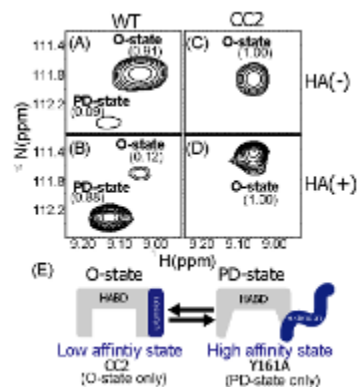
ことを示した。しかし、CD44 に 2 状態の構造平衡が存在する意義は明らかではない。そこで、本研究では常に O-state を形成する変異体を作製し、CD44 HABD の構造平衡の生物学的意義を HA 結合親和性および細胞ローリング活性の観点から解明することとした。

**【方法】** CD44 HABD の構造を O-state に固定した変異体を得るため、O-state のみに観測される C 末端領域と Link module との相互作用を分子内 S-S 結合により安定化した変異体を作製し、NMR 法による構造解析と表面プラズモン共鳴 (SPR) 法による親和性解析を行った。次に、内因性 CD44 が発現していないヒト肺癌細胞由来の VMRC-LCD 細胞に野生型 CD44、Y161A 変異体、CC2 変異体を発現させ、HA を固定化したキャピラリーおよびプレートを用いて細胞のローリング活性を測定した。

## 【結果と考察】

### O-state に平衡が偏った変異体の作製および解析

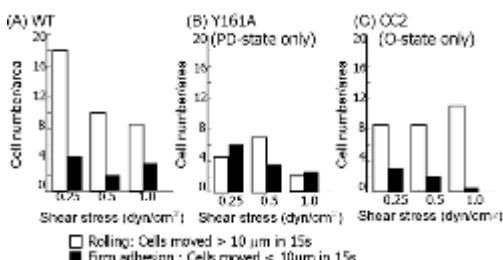
分子内 S-S 結合導入により構造を O-state に固定した変異体 (CC2) を作製した。野生型と異なり、CC2 変異体では HA 存在下においても PD-state 由来のシグナルは観測されないことから、CC2 変異体は常に O-state を形成していることが明らかとなった (Fig.2C, D)。さらに、SPR 解析から CC2 変異体の HA 結合親和性は野生型の半分に低下していることが判明した。よって、HABD の O-state と PD-state は、HA 低親和性および高親和性状態をそれぞれ反映すると結論した (Fig.2E)。



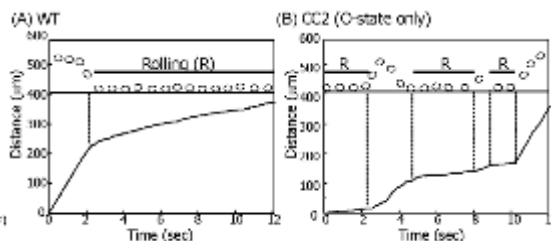
**Fig.2** Conformation of the WT HABD and CC2 mutant in the absence or presence of HA. (A-D): Representative  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$  HSQC signals of the WT HABD (A,B) and the CC2 mutant (C, D) in the absence (A, C) and presence of 2.8 mM HA $^{20}$  (B,D). (E) HA-affinity of O- and PD states.

### CD44 HABD の構造平衡と細胞ローリングの相関

CD44 HABD に 2 状態間の構造平衡が存在する意義を細胞のローリングの観点から解明することを目的として、野生型 CD44、Y161A、CC2 変異体を発現する細胞のローリング活性を測定した。その結果、野生型および CC2 変異体発現細胞は主にローリングしているのに対し、Y161A 変異体発現細胞では HA と強くしたままローリングしない細胞の割合が多いことが判明した (Fig.3)。また、野生型発現細胞は HA と接着後、ローリングが安定に持続したのに対し、CC2 変異体発現細胞は HA への接着と解離を繰り返しローリングが安定に持続しなかった (Fig.4)。これより、CD44 HABD が HA 結合親和性の異なる 2 状態間の構造平衡にあることが CD44 を介した細胞のローリングに必要であると結論した。



**Fig.3** Cell rolling behavior of VMRC-LCD cells expressing WT(A), the Y161A mutant (B), the CC2 mutant (C)



**Fig.4** Accumulated distance of the cells expressing WT CD44 (A) and the CC2 mutant (B) on the HA coated plate. In the plot, a segment with a mild or a steep slope indicates that cells are rolling or detached, respectively.

## P59

### NMR試料管内転写によるRNAのNMRスペクトルの測定

斉藤裕之<sup>1</sup>, 伊谷野悠里<sup>1</sup>, 牛田千里<sup>2</sup>, 清澤秀孔<sup>3</sup>, ○河合剛太<sup>1</sup>

<sup>1</sup>千葉工業大学 工学部

<sup>2</sup>弘前大学 農学生命科学部

<sup>3</sup>国立遺伝学研究所 新領域融合研究センター

#### In tube transcription for NMR measurement of RNA

Hiroyuki Saito<sup>1</sup>, Yuri Iyano<sup>1</sup>, Chisato Ushida<sup>2</sup>, Hidenori Kiyosawa<sup>3</sup>, ○Gota Kawai<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Fac. Eng. Chiba Inst. Tech., Chiba, <sup>2</sup>Fac. Agri. Life Sci., Hirosaki Univ., Hirosaki, <sup>3</sup>TRIC Natl. Inst. Genetics, Mishima, Japan.

Expressions of small RNAs, with 50-100 nt length, from the loci of the sense-antisense transcription in mouse genome were found and investigations of the function of such small RNAs are being conducted. In order to characterize the structures of the small RNAs from mouse, a method of in tube transcription is now introduced. Because the expression was monitored by the Northern hybridization with a DNA probe of 40 nt, the exact position of transcription in mouse cell was unknown. In order to estimate the sequence of an transcribed RNA, we designed two RNAs for the expressed region and those were subjected to the analysis by the in tube transcription method. It was found that one of the two constructs showed iminoproton signals of well structured RNA, suggesting that the corresponding RNA is expressed in mouse cell. Also, this result indicates that the method proposed here is useful for rapid characterization of RNA structures.

私たちは、マウス細胞内に新たに発見された50-100ヌクレオチドの低分子RNAについて、その機能を明らかにするために、多角的な解析を進めている。この低分子RNAは、哺乳動物における内在性のアンチセンス/非翻訳性RNA (non-coding RNA; ncRNA) の研究中に発見され、その後の解析で、このサイズの低分子RNAはアンチセンスRNAが転写されている遺伝子座を含め、その他のゲノム全体の領域から転写されていることが判明している<sup>1)</sup>。マウスにおいて、センス・アンチセンス発現が確認されている遺伝子座は4000を超えており、その多くの遺伝子座で低分子RNAが発現していることが示唆されている。本発表では、その解析の一環として進めているNMR試料管内での迅速なRNAの構造プロファイリング手法について報告する。

RNA, 試験管内転写, 安定同位体標識

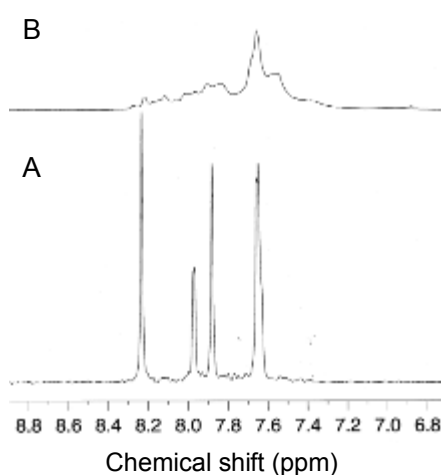


Fig. 1 800 MHz <sup>13</sup>C-edited spectra

A: Just after mixing of the reaction mixture. B: After 40 h.

さいとうひろゆき, いやのゆり, うしだちさと, きよさわひでのり, ○かわいごうた

## 【方法】

マウス染色体3番にコードされているcSAT-025領域から発現が確認されているRNA<sup>1)</sup>について、その発現領域を推定し、NMRスペクトル測定用のRNA配列をデザインした。それぞれについて、鋳型DNAを用意し(北海道システム・サイエンス)、NMR試料管内で転写反応を行った。転写反応にはT7 RNAポリメラーゼ(大陽日酸)および安定同位体標識NTP(大陽日酸)を用い、200  $\mu$ Lの反応液を調製した。反応液を調製後、ただちにNMRマグネットに入れ、298Kにおいて、スペクトルの測定を行った。

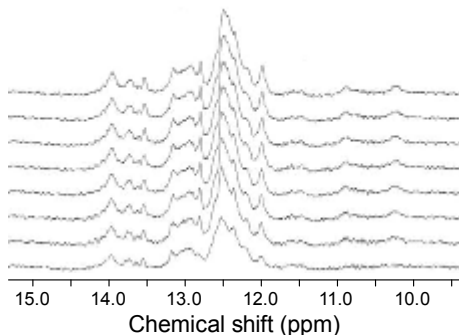


Fig. 2 In tube transcription of S3-1 RNA

## 【結果および考察】

Fig. 1は、反応直後および40時間経過後の<sup>13</sup>C選択スペクトルの塩基のH8/H6/H2シグナルが観測される領域を示している。反応液調製直後には、反応の基質であるNTP由来のシャープなシグナルが観測されているが、40時間後には、基質由来のシグナルはほぼ消失し、合成されたRNAに由来するシグナルが観測されている。したがって、NMR試料管内で転写反応が十分に進んだことがわかる。

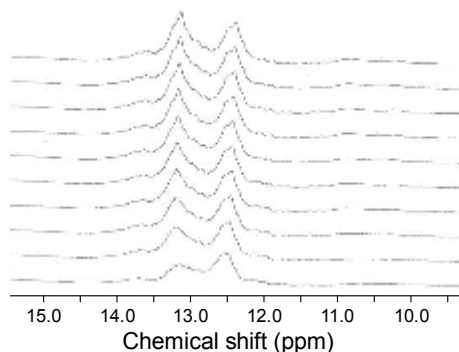


Fig. 3 In tube transcription of S3-2 RNA

cSAT-025領域から発現している低分子RNAの一つであるS3について、2種類のRNA配列

(S3-1およびS3-2)をデザインした。それぞれについてNMR試料管内転写を行った結果をFig. 2およびFig. 3に示した。いずれもイミノプロトン領域のスペクトルを経時的に示してあり、最下段が反応開始後約3時間で、以後はおよそ7時間毎に測定した結果である。2つのスペクトルを比較すると、S3-1の場合には、良く分散したシャープなシグナルが観測されるのに対して、S3-2では、ブロードなシグナルのみが観測されている。このことから、S3-1は特定の立体構造を形成しており、一方、S3-2は特定の構造を形成していないことが示唆される。

以上のように、NMR試料管内転写法により、RNAの構造的特徴を簡便に解析できることが示された。この手法を活用して、マウスに発現している低分子RNAの構造的特徴を解析し、クラスタリングしていく予定である。

50-100nt

RNA

本研究は、新学術領域研究「マウス細胞内に普遍的に存在する50-100ヌクレオチド低分子RNAの多角的解析」の一環として行われた。また、先端研究施設共用促進事業による「RNAの構造スクリーニングおよび構造クラスタリング手法の開発」として、理研SSBCのNMR分光計を利用した。

1) Okada, Y., et al., Comparative expression analysis uncovers novel features of endogenous antisense transcription, *Hum. Mol. Genet.* **17**, 1631-1640 (2008).



# P60

## Nox5の活性酸素発生機構の解明

○猪熊聡夫<sup>1</sup>, 久米田博之<sup>2</sup>, 本坊和也<sup>2</sup>, 住本英樹<sup>3</sup>, 稲垣冬彦<sup>2</sup>

<sup>1</sup>北大院生命科学構造生物

<sup>2</sup>北大先端生命構造生物

<sup>3</sup>九大医学生化学

### Structural basis of Nox5 activation mechanism

○Toshio Inokuma<sup>1</sup>, Hiroyuki Kumeta<sup>2</sup>, Kazuya Honbou<sup>2</sup>, Hideki Sumimoto<sup>3</sup>, and Fuyuhiko Inagaki<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Lab.Struct.Biol.Grad.Sch.Life Sci.Hokkaido Univ.,Sapporo, Japan.

<sup>2</sup>Lab.Struct.Biol.Advanced Life Sci.Hokkaido Univ.,Sapporo, Japan.

<sup>3</sup>Grad.Sch.Med.Kyushu Univ.,Fukuoka, Japan.

NADPH oxidases of the Nox family exist in eukaryotes but not in prokaryotes. Reactive oxygen species (ROS) produced by the NADPH oxidase play critical roles in a variety of biological processes, such as host defense, signal transduction, and hormone synthesis. NADPH oxidase 5 (Nox5) is a homologue of the gp91<sup>phox</sup> subunit of the phagocyte NADPH oxidase (Nox2) and is expressed in lymphoid organs and testis. Nox5 is distinct from other NADPH oxidases by its unique N terminus, which contains four canonical EF-hands, Ca<sup>2+</sup>-binding domains. It's thought that Nox5 is activated by Ca<sup>2+</sup>-binding to the EF-hands and produce ROS, because Nox5 activation depend on Ca<sup>2+</sup>.

In this study, we have analyzed the structure of the EF-hands region to reveal the molecular mechanism for regulation of Nox5 activity.

[序論]

Nox は、NADPH の酸化に伴い、酸素分子をスーパーオキシドに還元する。スーパーオキシドはさらに過酸化水素やヒドロキシラジカルなどの様々な活性酸素種に

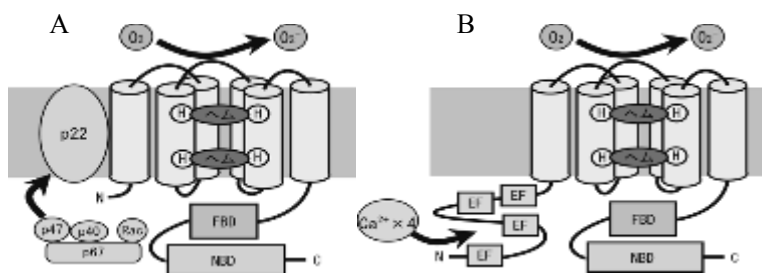


Fig. 1 Structural model of Nox (A; Nox1-4, B; Nox5)

変換される。この Nox の電子伝達システムは、真核生物のフェレドキシン還元酵素様の C 末細胞質領域と、2つのヘムを含む6回膜貫通領域から形成されている。つまり、

---

ROS, NADPH oxidase, EF-hand

○いのくま としお, くめた ひろゆき, ほんぼう かずや, すみもと ひでき, いながき ふゆひこ

C末細胞質領域のNADPH結合領域とFAD結合領域を介し、NADPHからFADへ、FADからヘムへ、ヘムから酸素分子へと順々に電子を伝達する。動物のNoxには5種類のサブファミリーが存在する (Nox1-5)。Nox1-4は、膜タンパク質のp22<sup>phox</sup>と安定な複合体を形成する。また、活性化の際には、細胞質内制御因子であるp47<sup>phox</sup> (Nox organizer)、p67<sup>phox</sup> (Nox activator) が膜に移行しこの複合体に結合し、さらにp40<sup>phox</sup>、Racが結合することが知られている (Fig. 1A)。一方、他のサブファミリーと異なりNox5には、細胞質内制御因子は存在せず膜貫通領域のN末側にEFハンドモチーフを4つ持っている。Nox5の活性化はカルシウム依存的であることから、このEFハンド領域にカルシウムが結合することでNox5は活性化状態へと移行すると言われている (Fig. 1B)。本研究では、Nox5の活性制御機構を分子レベルで解明するため、はじめに、活性制御ドメインであるEFハンド領域の構造解析を行った。

[結果および考察]

大腸菌によるNox5のEFハンド領域の発現系を構築し、大量発現後に精製を行った。各種NMR測定を行い、Nox5のEFハンド領域のカルシウムフリー状態の構造をCYANAを用いて決定した。Nox5のEFハンド領域は、カルシニューリンB様の構造を有していた (Fig. 2)。

さらに、Nox5の活性阻害剤であることが示されているmelittinとカルシウム依存的に結合すること、ならびに結合に伴いEFハンド領域が大きく構造変化することを明らかにした (Fig. 3)。一般にEFハンドモチーフはカルシウムの結合により疎水性面が露出することが知られている。実際、Nox5 EFハンド領域は、カルシウムの添加で自己会合をおこし沈殿した。melittinの共存下でNMRスペクトルが観測できたのは、露出したNox5 EFハンド領域の疎水性面にmelittinが結合したためと考えられる。

Nox5 EFハンド領域においてカルシウム結合に伴う疎水性面の露出は、Nox5の活性制御機構における重要な局面を意味している。Nox5はp22やp40/p47/p67/Rac複合体のような他の活性制御因子を必要としないため、露出した疎水性面にはNox5中の標的となる疎水性領域が結合し、活性化状態に移行すると推察される。今後は、Nox5の活性制御機構解明のため、活性化状態におけるNox5 EFハンド領域の構造について解析を進める。

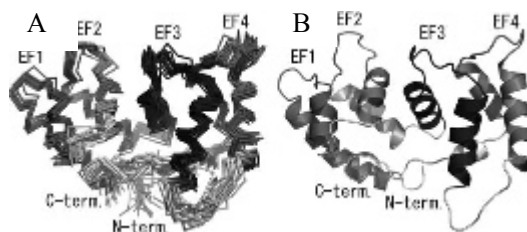


Fig. 2 Solution structure of Nox5 EF-hands

A: Superimposed structure

B: Ribbon model of the most stable structure

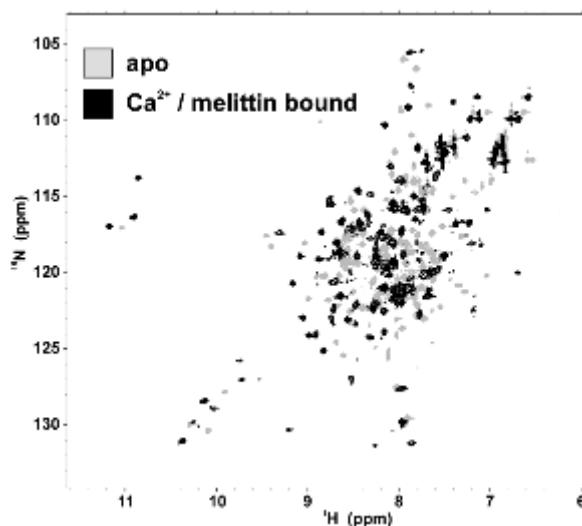


Fig. 3 [<sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N] HSQC spectra of free (gray) and Ca<sup>2+</sup>/melittin-bound (black) states of Nox5 EF-hands