

2C1330

Bacillus subtilis 由来リパーゼの結晶学的研究

○近藤 英昌¹、川崎 公誠¹、鈴木 守² (¹工技院・北工研、²物構研)

Bacillus subtilis 菌体外リパーゼ (Triacylglycerol lipase, EC 3.1.1.3) は高度な耐アルカリ性を有し、現在知られている細菌由来リパーゼとしては分子量が最小 (19,400) である。また、他のリパーゼとは異なり反応速度が反応液中のミセル形成に依存しないという際だった特徴がある。産業酵素としても有望なことから構造の解明が待たれているが、現在までのところ結晶化の報告はあるが構造解析には至っていない。既に *Pseudomonas glumae* の菌体外リパーゼ (分子量: 33,000) の構造は決定されているが、分子量とミセル形成依存性の違いなどからその知見をもとに *B. subtilis* のリパーゼの構造を類推することは困難である。我々は *B. subtilis* リパーゼの構造解析を行うために、結晶化とデータ収集を行なった。

結晶化に用いた試料はクロン化した遺伝子を *Bacillus megaterium* にて分泌発現させ、硫酸沈殿とイオン交換クロマトグラフィーによって精製し、5.5mg/ml まで濃縮した。結晶化は沈殿剤として PEG8000 を含んだ溶液で行い、0.4mm × 0.4mm × 1mm 程度の大きさの結晶を得た。空間群は P2₁2₁2₁、格子定数は $a=38.2$, $b=58.5$, $c=82.3$ オングストロームであり、非対称単位に 1 つの分子を含む。この結晶は今までに報告されているものとは別の晶系に属している。Native 結晶と Xe 誘導体結晶を用いてフォトンファクトリー BL6A にて 1.4 オングストローム分解能の回折データを収集した。現在 Xe のサイトの特定と他の重原子誘導体結晶の探索を行なっている。

H.Kondo, K.Kawasaki and M.Suzuki : Crystallographic study on lipase of *Bacillus subtilis*

2C1400

大腸菌サイクロフィリン B に認識されたシス型プロリンと歪んだトランス型プロリン ($\Delta\omega=60^\circ$) 異性体のペプチド

○奥平 香代子¹、佐野 友美¹、川口 洋子¹、山岸 陽子¹、伏信 進矢²、松沢 洋²、今野 美智子^{1,3} (¹お茶大・院人間文化・物質科学、²東大・院農・生命科学、³お茶大・理学・化学)

サイクロフィリン (CyP) は細胞質型 CyPA と膜結合型 CyPB に大別され、これまでに調べられた全ての細胞に存在する。in vitro において、プロリン残基を含むポリペプチドのシスからトランスへの異性化反応を酵素的に助ける (PPIase 活性)。出芽酵母において、8 種類のすべての CyP メンバーが欠損した変異体も生存することから folding への関与はない。しかし、生体内での働きは未だ分っていない。当研究室で既に解析した大腸菌由来細胞質 *Ec*-CyPA のレセプティングサイトと比較し、その違いから生体内でのリガンドを予測するため、大腸菌由来膜結合型 *Ec*-CyPB の構造を決定した。*Ec*-CyPB においては、ペプチド 1 (Suc-Ala-Pro-Ala-pNA、空間群 $P3_2$ 、分解能 1.7 Å, R=18.8%, Rfree=22.8%)、ペプチド 2 (Ac-Ala-Ala-Pro-Ala-AMC、空間群 $P3_2$ 、分解能 1.8 Å, R=18.6%, Rfree=23.2%)、ペプチド 3 (Suc(OMe)-Ala-Ala-Pro-Val-AMC、空間群 $P3_212$ 、分解能 3.0 Å, R=28%) との複合体の構造を決定した。*Ec*-CyPB は、8 本の逆並行の β ストランドが β バレル構造を形成しており、その表面に溝がある。この溝には疎水性のアミノ酸残基 (Phe77, Met78, Phe128, Leu137, Tyr146) で囲まれたポケットがあり、これらのアミノ酸残基は *Ec*-CyPA、*Ec*-CyPB において保存されている。ペプチド 1 及び 2 では、このポケットに Ala-Pro の C=O 基の ω が 60° ずれた歪んだトランス型で挿入される。他方、ペプチド 3 ではシス型で、*Ec*-CyPA に付いたペプチド 1 と同じシス型である。これらのペプチドを介して分子が接触する。これらのペプチドはリガンドとして付いていることを示す。

K.Okudaira, Y.Sano, Y.Kawaguchi, Y.Yamagishi, S.Fushinobu, H.Matsuzawa and M.Konno : Peptides of *cis*-proline isomer and distorted *trans*-proline isomer ($\Delta\omega=60^\circ$) recognized by *E.coli* cyclophilin B

2C1345

放線菌由来ホスホリパーゼ D の結晶構造

○鈴木 淳¹、角野 広治¹、斎藤 玲子¹、岩崎 雄吾²、山根 恒夫²、山根 隆¹ (¹名大院・工、²名大院・生命工学)

<はじめに> フォスホリパーゼ D (PLD) は、リン脂質のリン酸基より先の極性グループを加水分解により切り離す酵素である。PLD は、真核細胞では、情報伝達酵素として知られるが、原核生物でも見つかり細胞外毒素と考えられている。真核・原核両由来の PLD 間で配列相同性は低いが、共通の部分配列が見つかっており、触媒残基や反応機構は共通であると推測されている。本研究では、*Streptomyces antibioticus* 由来の PLD の結晶構造解析を行った。<実験> 蒸気拡散法にて 6 種類の結晶型を得た。このうち、30 °C にて結晶化再現性の良い IV 型結晶を選び、MIR 法で解析を進めた。回折データ収集は 100K で行い、Au 誘導体のみ PF の BL-6A2 で、他は R-AXIS IV + RU-300 の組み合わせで行った。位相の計算は MLPHARE を用い、DM で位相改良を行った。モデル構築後 2.5 Å 分解能で精密化を行ったが、R=0.204, R free=0.263 となった時点でも表面ループに属する計 40 残基が現れなかった。そこで、より低温の 18 °C で得られた II 型結晶を用いて解析を進めた。SPRING-8 の BL-41XU でデータ収集を行い、2.2 Å 分解能で精密化した結果、N 末端 3 残基と C 末端 5 残基を除く 501 残基の分子モデルを得ることができた。<結果> PLD は、2 つの相同なドメインが分子内の疑似 2 回軸で関係づけられた構造をとっている。各ドメインは、8 本ストランドの β -シートを核とし、その片面に 1 本のもう片面に 3 本の α -ヘリックスを持っている。2 つのドメインは、 β -シート片面の約半分を使って互いに接している。活性部位は、2 つのドメインが接する部分の分子内疑似 2 回軸上にある。各ドメインにある活性残基の His, Asp, Asn, Lys は、2 回対称で関係づけられる位置に配置されるが、その側鎖の構造は、対応する残基間で若干異なっている。現在、変異体酵素を使い、基質との複合体の結晶解析を進めている。

A. Suzuki, K. Kakuno, R. Satoh, Y. Iwasaki, T. Yamane and T. Yamane : Crystal Structure of Phospholipase D from *Streptomyces antibioticus*

2C1415

MSI (Met-AMP アナログ) の Met の側鎖の疎水的相互作用により固定されているメチオニル tRNA 合成酵素と MSI の複合体

加藤 美幸¹、瀧木 理²、横山 茂之²、○今野 美智子¹ (¹お茶大・理学・化学、²東大・院理・生化)

アミノアシル tRNA 合成酵素は、アミノアシル化反応において ATP と Mg²⁺ イオンを必要とする。GlnRS と tRNA と QSI (Gln-AMP アナログ) との複合体では QSI のアデニル環が水素結合により固定されることが報告された。しかし、なぜ AMP が外れるか説明できない。これとの比較において ATP 及びアミノアシル AMP が酵素にどのような機構で付くかを明らかにするため、高度好熱菌由来メチオニル tRNA 合成酵素 (MetRS) と MSI との複合体の X 線結晶構造解析を 2.2 Å 分解能で行い、分子置換法で解き、R 因子 20.2% となった。メチオニルによって固定された MSI 分子が 2 個存在する。1 つは、反応が行われると考えられている Rossmann fold 内の領域にある。もう 1 つは反応から遠く離れ分子の表面に存在する。興味のある前者は、メチオニルの側鎖が 1 つの配向を持って疎水的ポケットに挿入されており、その骨格の NH₂ 基、C=O 基と酵素との水素結合は見出されない。アデニル環の配向はほぼ同じ確率で 2 つあり触媒ドメインの大きな溝の表面についている。糖に対応する部分は、電子密度が低く構造が特定できない。これらのことから MSI はメチオニルの側鎖が疎水的なアミノ酸残基の側鎖で構成されているポケットに入り込み疎水性相互作用により固定されていると考えられる。もう 1 つの MSI においてはアデニル環の配向は 1 つであり、疎水的相互作用により酵素の表面に付いている。ATP がアデニル環あるいは P_o で固定されるとすると、AMP あるいは ADP も同じ機構で固定されるはずであり、AMP も ATP と同様に付いてははずれない。従って、ATP は、P_o と P_i で固定されるはずであり、Mg²⁺ イオンの配置も考えて ATP の配向のモデルを構築した。

M.Kato, N.Osami, S.Yokoyama and M. Konno : Complex of Met-tRNA synthetase and MSI (Met-AMP analog) happens to be formed by hydrophobic interaction of the side chain of Met of MSI