

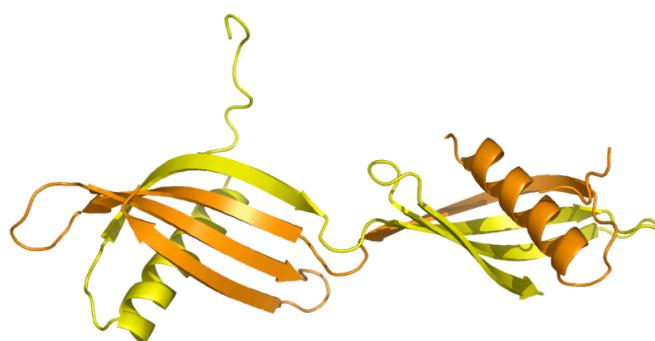
## イネ由来システインプロテアーゼ阻害蛋白質 OC-II の二量体構造

○遠藤千あき<sup>1)</sup>, 板垣貴<sup>1)</sup>, 毛塚雄一郎<sup>4)</sup>,  
城所俊一<sup>1)</sup>, 谷口正之<sup>2)</sup>, 大坪貞視<sup>3)</sup>, 野中孝昌<sup>4)</sup>

1) 長岡技科大・生物系, 2) 新潟大・工,  
3) 新潟農総研・食研セ, 4) 岩手医大・薬

植物由来のシステインプロテアーゼ阻害タンパク質（シスタチン）として最もよく研究されているイネ由来オリザシスタチン（OC）は、現在 12 種類の遺伝子がゲノム配列から予測されているが、詳細な特性解析が行われているのはオリザシスタチン-I（OC-I）のみである。OC はジスルフィド結合のためのシステイン残基を持たないこととアミノ酸残基数が 100～120 であることにおいては高等動物シスタチンスーパーファミリーの I 型ファミリーに類似しているが、アミノ酸配列はむしろ II 型ファミリーとの相同性が高い。本研究に用いたオリザシスタチン-II（OC-II）は、OC-I と比較してアミノ酸配列が 108 残基中 61 残基一致する。ところが、OC-II が常温で通常二量体として存在するのに対し、OC-I は常温で通常単量体として存在する。また、OC-I が単量体と二量体とでパパイニンに対する阻害活性（ $K_i$ ）がほぼ同じであるのに対し、OC-II 単量体の  $K_i$  値は二量体の 24 分の 1 である。そこで、OC の単量体および二量体状態下での阻害活性の違いの起源や二量体の形成機構を解明することを目的とし、OC-II の立体構造を X 線結晶構造解析によって明らかにすることにした。

プロセッシング後の全長 OC-II および N 末端の 9 残基を削除した変異体（OCII $\Delta$ N）の結晶化を蒸気平衡拡散法により 20°C で行った。クエン酸ナトリウムを沈殿剤、イミダゾールを緩衝液（pH8.0）とした条件で OCII $\Delta$ N の結晶を得た。X 線回折実験は高エネルギー加速器研究機構で行った。NMR によって構造が明らかとなっている OC-I をテンプレートとした分子置換法、および浸漬法による種々の重原子置換体結晶を用いた異常分散法による位相決定の試みは成功しなかった。そこで、OCII $\Delta$ N は単量体として 2 つのメチオニン残基を含んでいるので、セレノメチオニン化蛋白質を発現させて結晶化を行った。得られた結晶を用い X 線回折強度データを収集したところ、多波長異常分散法によって位相を決定することができた。OCII $\Delta$ N の結晶は空間群が C2 で、非対称単位中に二量体 1 分子が含まれており、1 つのサブユニットが 1 本の  $\alpha$  ヘリックスと 4 本の  $\beta$  鎖から成っていた。これら 2 つのサブユニットは構造既知のヒトシスタチン C のように、ドメインスワッピングによる二量体構造をとっていた。この OC-II 二量体では、システインプロテアーゼとの結合に重要と考えられる部位がドメインスワッピングの交差部分に位置する。したがって、二量体と単量体とではプロテアーゼに対する結合様式が異なる可能性のあることが示唆された。



OCII $\Delta$ N の二量体構造