

タンパク質の X 線結晶構造解析

X-ray Crystal Structure Analysis of Proteins

京都大学化学研究所 先端ビームナノ科学センター 構造分子生物科学研究領域

山内 貴恵

背景と目的

微生物の持つ様々な代謝経路の中で、芳香族化合物の代謝経路は古くから微生物学者や生化学者の関心を集めてきた。本研究室では、芳香族化合物である γ -レゾルシン酸を唯一の炭素源として生育が可能である根粒菌 *Rhizobium* sp. strain MTP-10005 において、 γ -レゾルシン酸から始まり、レゾルシノール代謝系へとつながる新規代謝経路及びそこで働く酵素群に着目し、これらの機能発現機構を酵素化学的・構造生物学的見地から明らかにすることを目的に研究を行っている。本菌ではまず、 γ -レゾルシン酸脱炭酸酵素 (GraF) により γ -レゾルシン酸がレゾルシノールへと変換される。次にレゾルシノール代謝系でモノオキシゲナーゼ (GraA) とフラビン還元酵素 (GraD) の二成分系で機能するレゾルシノール水酸化酵素、ヒドロキシキノール 1,2-ジオキシゲナーゼ (GraB)、マレイル酢酸還元酵素 (GraC) の 4 種類の酵素が順次働くことによって、レゾルシノールが、ヒドロキシキノール、3-ヒドロキシ-*cis,cis*-ムコン酸、マレイル酢酸 を経て 3-オキソアジピン酸へと変換される。これらの酵素をコードする遺伝子群はオペロンを形成しているが、その中にはレゾルシノール分解代謝においては用いられない機能未知のタンパク質 (GraE) もコードされている。

多くの微生物が *graE* と相同性のある遺伝子をもっているが、その機能の詳細はほとんど明らかになっていない。また、GraE と 20% 弱のアミノ酸配列の相同性をもつ *Haemophilus influenzae* 菌由来 YciI タンパク質の立体構造が構造ゲノム科学プロジェクトにおいて報告されているが、これについてもその機能の詳細は明らかになっていない。

本研究では GraE タンパク質の X 線結晶構造解析を行い、立体構造を基にして γ -レゾルシン酸代謝系関連化合物とのかかわりを標的に機能解析を行うことによって、GraE タンパク質の代謝系中での役割と機能の解明を行うことを目的に実験を行った。

検討内容および結果

N 末端に His タグを付加した GraE を大腸菌発現系にて大量発現し、各種クロマトグラフィーを用いて単一精製した試料を用いて結晶化を行った。また、多波長異常分散法または重原子同型置換法を用いた位相決定を目的として、GraE 中のメチオニン残基をセレンメチオニンで置換したタンパク質 (SeMetGraE) の発現系を構築し、大量発現と単一精製を行った。結晶化条件のスクリーニングから、10 mg/ml (50mM Tris-HCl pH 8.0) GraE 溶液について、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{K}_2\text{HPO}_4$ pH 8.4 を沈殿剤溶液とする 20°C のシッティングドロップ蒸気拡散法で比較的大きな結晶を得ることができた。また、SeMetGraE についても同様の条件下で結晶を得ることができた。GraE 結晶、SeMetGraE 結晶それぞれについて高エネルギー加速器研究機構 物質構造化学研究所 放射光化学研究施設や高輝度光科学研究センター SPring-8 において X 線回折実験を行い、回折強度データ収集を行った。

クライオプロテクタントや測定条件の検討を行い、GraE 結晶に関しては最大で 2.5 Å 分解能の回折強度デー

データを収集することが出来た。プログラム HKL2000 を用いて回折強度データの処理を行い、空間群 $P2_12_12$ 、格子定数 $a = 89.30 \text{ \AA}$, $b = 165.19 \text{ \AA}$, $c = 45.34 \text{ \AA}$ と決定した。また、SeMetGraE に対し XAFS 実験を行い、Se 原子に対応した吸収端スペクトルを測定した。Se 原子吸収単近傍の3波長で X 線回折実験を行い、6 \AA 分解能の回折強度データを収集した。SeMetGraE 結晶は GraE 結晶と同型で、ほぼ同じ格子定数であった。

単体格子の体積と分子量の比である V_M 値の一般的な範囲が $1.7 \sim 3.5 \text{ \AA}^3/\text{Da}$ であることを考慮すると、本結晶の非対称単位中の分子数はモノマー3~5 分子 (V_M 値 $3.15 \sim 1.89 \text{ \AA}^3/\text{Da}$) と推測された。SeMetGraE の結晶に対し3波長で測定したデータセットに対して多波長異常分散法による位相決定を試みたが、算出された Se 原子サイトの占有率が低いことから信頼性に乏しく、また計算された電子密度の解釈は困難であった。構造決定ができなかった原因として、結晶の回折能が低いこと、放射線損傷が大きく、測定の進行に伴って回折分解能が低下したために十分な回折強度データを収集できなかったことが考えられる。

次に、GraE 結晶の回折データに対しプログラム MolRep を使用し分子置換法による位相決定を試みた。計算には初期モデルとして YciI タンパク質のサブユニットおよび二量体、TftG タンパク質のサブユニットを使用した。いずれの場合においても正しい解は得られなかった。初期モデルに用いたこれらのタンパク質は GraE と同じ YciI スーパーファミリーに属しているがアミノ酸配列の相同性は 20% 程度であり、一般的に分子置換法では配列の相同性が 30% 以上の場合に解が得られる場合が多いことから、初期モデルとしては適していなかった可能性がある。そこで、Discovery Studio を用いたホモロジーモデリングにより作成したモデルを初期モデルとした分子置換法による位相の決定を試みたが、これによっても正しい解を得ることはできなかった。

これまでのところ分子置換では正しい解が得られていないが、電子密度とよく一致している部位もあることから、その部分を取りかかりにして Discovery Studio の分子編集機能を利用してモデルを作成し、分子置換法による位相の決定を試みる予定である。並行して、結晶化条件の再検討や X 線回折実験の測定条件の検討を行って、本結晶の回折分解能の改善を目指す予定である。