

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】アスパラギナーゼはアスパラギンからアスパラギン酸への加水分解の触媒として作用する酵素で、抗腫瘍効果を発揮することから急性リンパ性白血病の治療薬として、また食品製造時に食品中のアスパラギンに由来する猛毒アクリルアミドの発生を抑える抑制剤として応用されている。本研究では、80℃以上の高温で生育可能な超好熱性古細菌 *Thermococcus litoralis* DSM 5473 由来アスパラギナーゼ相同体 (*TIASNase*) を対象にX線結晶構造解析を行った。*TIASNase* は L-Asn, D-Asn の両異性体に対して高い活性を示す点でこれまでに知られているアスパラギナーゼとは大きく異なる性質を持っており、本酵素の活性発現機構の解明はアスパラギナーゼを主成分とする酵素製剤の開発において有用な知見を与えるものと期待される。

【検討内容】大腸菌内で大量発現させ精製した *TIASNase* を結晶化し、高エネルギー加速器研究機構のビームラインにて X 線回折強度データを収集した。得られたデータセットをプログラム *HKL2000* で処理し、*MOLREP* を用いて分子置換法により位相を決定した。得られた初期構造モデルについて Rigid body refinement を行い、さらに *COOT* および *Refmac5* を用いて構造モデルの修正と精密化を行うことで *TIASNase* の粗構造を得た。他生物種由来のアスパラギナーゼとの構造比較は *Discovery Studio* の分子描画機能を利用して行った。

【結果】*TIASNase* は結晶中で同一のサブユニットからなる二量体を形成しており、各サブユニットは N 末端ドメインと C 末端ドメインがリンカーによって連結された構造をとっていた。N 末端ドメインの基本骨格はフェレドキシン様フォールディングであり、その一部には通常右巻きである  $\beta-\alpha-\beta$  モチーフが左巻きにフォールディングしているという珍しい構造がみられた。C 末端ドメインは 5 本の  $\alpha$ -ヘリックスと 4 本の  $\beta$ -ストランドで構成されており、主に C 末端ドメイン同士の相互作用で三日月型の二量体を形成していた。I 型大腸菌アスパラギナーゼや II 型アスパラギナーゼは dimer of dimers と呼ばれるタイプの、二つの二量体からなる四量体構造を形成しており、*TIASNase* の二量体構造はこれらの二量体部分の構造と類似していた。しかしながら酵素学的性質は大きく異なることから、活性発現機構の点では大きな差異があると考えられる。現在これらを比較検討するために詳細な解析を行っている。

【謝辞】本研究は、京都大学化学研究所 共同利用・共同研究拠点(課題番号:2015-13)の助成を受けたものです。