

タンパク質の X 線結晶構造解析

X-ray Crystal Structure Analysis of Proteins

化学研究所 構造分子生物科学研究領域 山内 貴恵

【背景と目的】 D-アミノ酸は生体内で重要な機能を担っており、アミノ酸ラセマーゼにより生合成される。アミノ酸ラセマーゼはピリドキサルリン酸(PLP)依存型と非依存型に分類されるが、PLP 非依存型ラセマーゼの反応機構に関しては未だ明らかになっていないことが多い。本研究では、PLP 非依存型ラセマーゼである微生物由来アスパラギン酸ラセマーゼの反応機構と温度環境に対する適応戦略の解明を目的として、90℃以上の極限環境下で生育する超高熱性古細菌 *Thermococcus litoralis* DSM-5473 由来の耐熱性アスパラギン酸ラセマーゼ(TIAspR)と、低温環境下で生育する乳酸菌 *Lactobacillus sakei* NBRC-15893 由来の低温～常温性アスパラギン酸ラセマーゼ(LsAspR)について、X線結晶構造解析を行った。これらは34%の配列類似性をもっており、構造を比較することで微生物由来アスパラギン酸ラセマーゼの耐熱機構を明らかにすることができると思われる。

【検討内容】 蒸気拡散法によりTIAspRとLsAspRの結晶を作成し、高エネルギー加速器研究機構・放射光科学研究施設においてX線回折実験を行った。初期モデルとして *Pyrococcus horikoshii* OT3 由来アスパラギン酸ラセマーゼの PDB 登録座標を使用し、分子置換法による位相決定を行い、それぞれ分解能 1.6Å(TIAspR)、2.6Å(LsAspR)で結晶構造を決定した。

【結果】 TIAspRとLsAspRは互いに良く似た四次構造をとっており、N 末端側ヘリックスどうしを接近させて二量体を形成している。(図1、2) 二量体形成面での α ヘリックス間において、TIAspRでは疎水性残基側鎖間での疎水性相互作用が見られるが、LsAspRではこのような相互作用はなく、サブユニット間の相互作用様式に違いがあった。また、TIAspRではLsAspRに比較してサブユニット内のイオン対の数が多く、分子表面での相互作用がより強固であると考えられる。さらに、TIAspRの分子体積はLsAspRよりも小さく、よりコンパクトな構造をとっており、これらの構造的要因がTIAspRの熱安定性の獲得に関与していることが示唆された。今後、Discovery studioを用いた変異体安定性予測や分子動力学シミュレーションにより、これら構造的要因の熱安定性への具体的な寄与を明らかにする予定である。

また、推定活性部位付近には微生物由来アスパラギン酸ラセマーゼ間で保存されている二つのシステイン残基と塩基性アミノ酸残基が存在しており、これらは基質の認識や反応の触媒に関与していることが示唆された。この点についても、Discovery studioを用いた基質化合物とのドッキングシミュレーションにより、活性部位への基質の結合様式や反応機構を推定する予定である。



図1 LsAspRの二量体分子構造



図2 TIAspRの二量体分子構造