

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

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おらず、立体構造の報告が一件あるものの、その機能の詳細は明らかになっていない。そこで、本研究では機能未知タンパク質である GraE の機能を明らかにするために、X 線結晶構造解析によりその立体構造を決定することを目的に実験を行った。

検討内容および結果

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。SeMetGraE については、X 線結晶構造解析に適した大きさの結晶はまだほとんど得られていないため、結晶化条件の最適化を引き続き行っている。GraE の結晶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において X 線回折実験を行い、分解能 3.5 Å の回折強度データ収集を行った。現時点では SeMetGraE の結晶で解析が可能な回折強度データの収集に至っていないため、Discovery studio を使用したホモロジーモデリングにより構築した GraE のモデル構造を初期構造モデルとして用いることによる分子置換法での位相決定を試みている。