

酸素センサータンパク質 YddV のグロビンドメインの構造解析 Crystal structure of globin-coupled sensor domain of YddV

五十嵐城太郎^{1,*}, 菊池亨¹, 松岡有樹¹

¹福島県立医科大学医学部自然科学講座 (生物学), 〒960-1295 福島市光が丘 1

Jotaro Igarashi^{1,*}, Toru Kikuchi¹ and Arika Matsuoka¹

¹Fukushima Medical University, Fukushima, Fukushima 9601295, Japan

1 はじめに

グロビン結合型センサー (GCS) は、ヘムを含むグロビンドメインと酵素・膜貫通ドメインなどが融合したタンパク質である。YddV は大腸菌に由来する GCS の 1 つであり、N 末端のグロビンドメインと C 末端のジグアニル酸シクラーゼが融合している。YddV はヘム鉄が 2 価の状態やヘム鉄 2 価に酸素が結合した状態において、2 分子の GTP から c-di-GMP の合成を触媒する[1]。

GCS の立体構造は、グロビンドメインについてのみ HemAT および GsGCS における構造が解かれている。

今回、私たちは YddV のグロビンドメイン (アミノ酸 1-153; YddV-heme) の結晶化に成功し、回折データの収集を行った。その結果、2.3 Å 分解能で構造を解くことができたので報告する。

なお、当初の実験課題については、期間中に論文報告があったため、取り止めている[2]。

2 実験

YddV-heme の発現・精製は既報に従った[3]。結晶化は、20 mg/mL の YddV-heme と沈殿剤 (17.5% PEG3350, 0.1 M Bis-Tris, pH 5.5, 0.25 M クエン酸アンモニウム) を 2 μL ずつ混合し、蒸気拡散法 (ハンギングドロップ) で行った。得られた結晶は 20%グリセリン入りの沈殿剤に浸漬したのち、直ちに液体窒素で凍結した。結晶は P6₁22 の空間群に属し、格子定数は $a = b = 98 \text{ \AA}$, $c = 155 \text{ \AA}$ であった。非対称単位には YddV-heme が 2 分子存在した。位相決定には、YddV-heme に含まれるヘム鉄の異常分散を用いてデータ収集を行った。

回折データの積分・スケールには XDS を用い、鉄原子の位置決定には SHELXC/d/e を含む HKL2MAP を利用した。モデル構築、精密化にはそれぞれ Coot, Refmac5 を使用した。

3 結果および考察

鉄の吸収端近傍において、4 波長 (1.6505, 1.6957, 1.7007, 1.7074 Å) でデータ収集を行い、位相決定により得られた電子密度図を図 1 に示す。図 1 の中心に鉄のピーク (3σ 以上) とポルフィリン環の電子密度が観察された。モデル構築と精密化によって、最

終的に A, B 分子 (アミノ酸 7-153 ずつ, B 分子の 54-58 を除く。) およびヘム 2 分子を含み, $R = 0.239$, $R_{\text{free}} = 0.305$ となった。

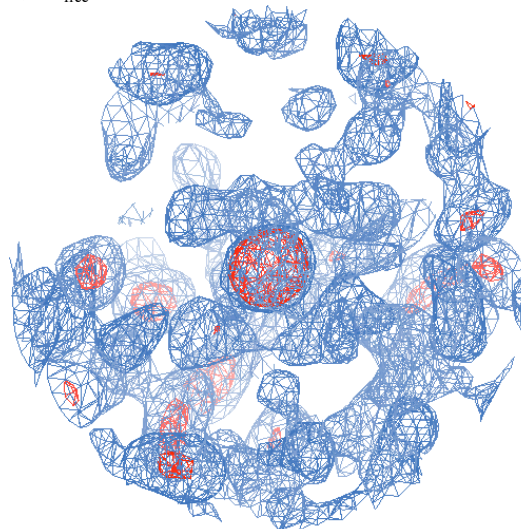


図 1 : MAD 法による位相決定後の電子密度図 (3σ:赤、1σ:青)。

4 まとめ

YddV のグロビンドメインについて、2.3 Å 分解能で構造を解くことができた。今後、分解能の向上を目指したタンパク質精製方法の変更、結晶化の最適化を行う。また、ヘム鉄に結合するリガンド共存下での結晶構造解析についても行っていきたい。

謝辞

ビームラインの使用にあたっては PF スタッフ皆様に感謝いたします。YddV の構造研究は東北大学多元物質科学研究所の清水透名誉教授のもとで着手した。北西健一博士、川村友理子修士、中島喬介修士にはタンパク質の発現・精製について協力いただいた。ここに感謝いたします。

参考文献

- [1] K. Kitanishi *et al. Biochemistry*. **49** 10381 (2010).
- [2] S. Horita *et al. Structure*. **23**, 1 (2015).
- [3] K. Nakajima *et al. J. Inorg. Biochem.*, **108**, 163 (2012).

* jotaro@fmu.ac.jp