

キナーゼタンパク質 DAPK と 2 種類の ATP 類似体複合体の X 線結晶構造解析

X-ray structure analyses of the complexes of kinase protein DAPK and 2 kinds of ATP-analog

松尾悠平¹・山口淳史¹・田中伊知朗^{2,3,*}

¹茨城大学大学院理工学研究科, 〒316-8511 日立市中成沢町 4-12-1

²茨城大工学部, 〒316-8511 日立市中成沢町 4-12-1

³茨城大フロンティアセンター, 〒319-1106 東海村白方 162-1

Yuhei Matsuo¹ and Atsushi Yamaguti¹ and Ichiro Tanaka^{2,3,*}

¹Graduate School of Sci. and Eng., Ibaraki Univ., 4-12-1, Naka-narusawa, Hitachi, 316-8511, Japan

²College of Eng., Ibaraki Univ., 4-12-1, Naka-narusawa, Hitachi, 316-8511, Japan

³Frontier Res. Center for Appl. Atomic Sci., Ibaraki Univ., 162-1, Shirakara, Tokai, 319-1106, Japan

1 はじめに

DAPK(Death-associated-protein-kinase)は $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ 活性型の Ser/Thr キナーゼである。このタンパク質は生体内で脱リン酸化されることで活性化し、アポトーシスを促進させる。これまでの研究で X 線結晶構造解析により DAPK のキナーゼドメインに含まれる ATP 結合領域の立体構造が明らかにされている [1]。特筆すべき点は、ATP 結合領域には多数の水分子が存在しており、アナログ結合前後で内部に存在した水と水の半数以上がそのまま結合部位に保存されていることである。そのため、ATP 加水分解もしくはリン酸転移反応の際のエントロピーも含めたエネルギーの収支を議論するためのモデルに適している [2]。また、グリシンリッチループ(残基 20~25)と呼ばれる触媒作用に不可欠な領域において、ATP アナログとアミノ酸との相互作用により顕著な構造変化が見られ、これらが ATP の結合や ADP の放出に関与していると考えられている [3]。最終的には中性子解析による水素の有無や位置、そして水和構造における水分子の方位や結合状態を解明し、完全な立体構造を明らかにすることが目標であるが、X 線による非水素原子情報における阻害剤や基質の相互作用様式に関しての知見は、キナーゼそのもののリン酸基転移機構の詳細の解明や加水分解エネルギーの議論の発展や DAPK の阻害剤の開発などにも役立つものと期待される。そこで本研究では、DAPK と 2 種類の ATP 類似体複合体の X 線結晶構造解析を行い、それぞれの ATP 結合部位の構造に着目した詳細な検討を行うことを目的とした。

2 実験

キナーゼドメイン(残基数 277)を大腸菌で大量発現させて精製した DAPK を使用した [2]。結晶化は、結晶化剤に $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、緩衝液に Tris-HCl (pH8.0)、ATP アナログに Sigma-Aldrich 製の ANP(AMP-PnP; アデノシン 5 ϕ (β , γ -イミド)三リン酸、A2647)と ADP(アデノシン 5 ϕ 二リン酸、A2754)、そして金属として MgCl_2 を用いて、293K の条件下でハンギン

グドロップ法により結晶化した。また、モル比が DAPK:アナログ:金属=1:6:60 になるように DAPK 溶液にアナログと金属を加えて、それをタンパク質溶液とした。それぞれの結晶化条件を表 1 にまとめた。X 線回折実験は、KEK-PF AR-NW12A にて行い、不凍液は 30%エチレングリコール、温度は 100K で測定した。データ処理は HKL2000 により行い、また Phenix と Coot を用いてデータ解析を行った。

表 1. 2 種類の ATP アナログ複合体の結晶化条件

DAPK濃度	5 [mg/ml]	5 [mg/ml]
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 濃度	1.25 [M]	1.0 [M]
緩衝液	20mM Tris-HCl (pH 8.0)	
添加剤	150mM NaCl	
ATPアナログ	ANP	ADP
金属	Mg^{2+}	
DAPK:アナログ:金属(モル比)	1:6:60	
結晶化方法	ハンギングドロップ法	
温度	293 [K]	

3 結果および考察

DAPK-ANP-Mg は 2.2 Å、DAPK-ADP-Mg は 1.65 Å の分解能のデータが得られた。

データ処理および解析の結果を以下の表 2 に記す。

表 2. データ処理・解析結果。() は最外殻の値。

	DAPK-ANP-Mg	DAPK-ADP-Mg
Space group	$P2_12_12_1$	
<i>a</i> [Å]	47.19	47.18
<i>b</i> [Å]	63.02	62.31
<i>c</i> [Å]	88.83	88.84
Resolution [Å]	2.2	1.65
No. unique reflection	14024	32376
<i>R</i> _{merge}	0.1 (0.352)	0.071 (0.352)
<i>I</i> / σ	32.3 (8.99)	46.0 (7.53)
Completeness [%]	99.6 (100.0)	88.5 (100.0)
<i>R</i> _{work} [Å]	17.48	20.67
<i>R</i> _{free} [Å]	23.31	23.44
No. waters	118	116
B-factors [Å ²]	22.17	21.14

DAPK-ADP-Mgの構造は、先行研究[1,3]とほぼ同様であったが、DAPK-ANP-Mgの構造において、先行研究[3]には見られない結果が得られた。

先行研究[4]において、ANPの α 、 β 、 γ リン酸基が直鎖上になっているところは似ていたが、 γ リン酸基のOccupancyが1でかつ、B-factorが50前後と一様に大きいところが異なっていた。本研究で得られた構造のOccupancyやB-factorを表3に記す。

表 3. ANPの γ リン酸基のOccupancyおよびB-factor

	Occupancy	B-factor
O1G	0.42	29.41
O2G	0.38	26.19
O3G	0.85	34.31

注目すべきは、O3Gだけ他に比べてOccupancyがかなり高い点である。図1のようにO3Gは、GLN 23のN原子およびPHE 24のN原子と水素結合している。水素結合距離はそれぞれ、O3GとGLN 23のNが2.85Å、O3GとPHE 24のNが2.26Åで、後者は直線状($\sim 170^\circ$)で特に強い水素結合となっている。このようなグリシンリッチループの二つの主鎖上のアミドのN-Hとの水素結合によりOccupancyが高くなっており、ATP類似体であるANPをしっかりとつかまえる構造的な機構が確認できた。

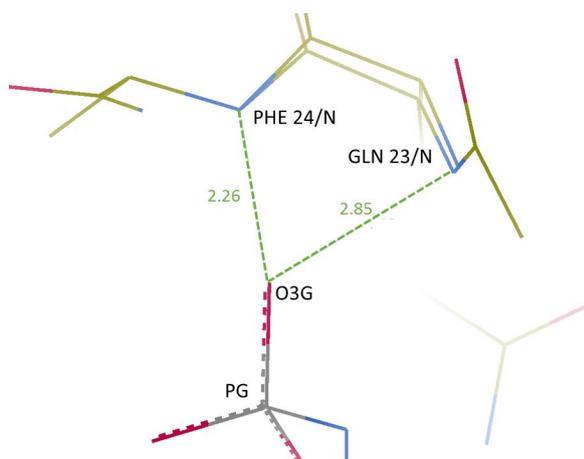


図 1. γ リン酸基のO3Gの水素結合

一方、O1GやO2Gも水分子やN原子と水素結合しているにもかかわらず、Occupancyは低い値になっている。図2のように、O1GとH₂O 7のOとの水素結合距離は3.08Åで、O2GとGLN,B 23のNE2とは2.45Åである。O1Gにおける水素結合は、結合距離が遠いため弱い水素結合であり、Occupancyが低くなったのではないかと考えられる。また、O2Gにおいては、GLN,B 23のNE2と距離が比較的近いにもかかわらずOccupancyが低くなっているのは、ダブルコンフォメーションでGLN 23自体のOccupancyが0.44と低いためだと考えられる。

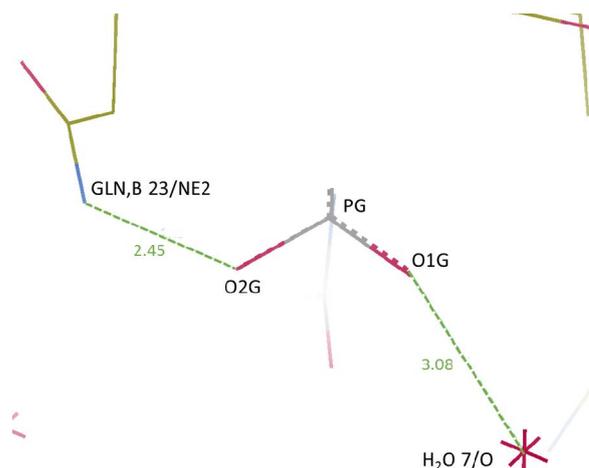


図 2. γ リン酸基のO1G,O2Gの水素結合

また、結晶化条件のpH8.0においてATPやADPのリン酸基は、プロトネーションしていないことが標準的なpKa値(約4.0、約6.5)から予想できる。これは、ATP類似体であるANPにおいても同じことが言えるであろう。本研究で得られたDAPK-ANP-Mg構造では、先行研究[4]と同様に α リン酸と β リン酸のO原子がMg²⁺と結合して中和されている。しかし、X線では γ リン酸基のO原子について水素原子位置やプロトネーション状態がはっきりとは分からない。そこで、中性子構造解析により水素原子位置情報を知ること、酵素の基質認識としてATPやADPのイオン化状態の解明やDAPKの阻害剤の開発につながることを期待される。

4 まとめ

今回の構造解析により、2.2ÅのDAPK-ANP-Mgの構造および1.65ÅのDAPK-ADP-Mgの構造を得ることが出来た。DAPK-ADP-Mgの構造は、先行研究と同様であったが、DAPK-ANP-Mgの構造では違いが見られた。ANPの γ リン酸とグリシンリッチループの二つのN原子との水素結合により、DAPKがANPとしっかりと結合していることが分かった。

謝辞

この研究は、京都大・茶竹俊行准教授、富山大・横山武司博士、茨城大・新村信雄特任教授と当時の4年生だった丹佑太君にお世話になりました。

参考文献

- [1] K.Temmerman *et al.* FEBS Journal. **280**. 5533-5550(2013).
- [2] A.Yamaguchi, N.Niimura, S.Nakamura, S.Kidokoro, T.Chatake, T.Yokoyama, and I.Tanaka, JPS Conference Proc. (Proceedings of the J-PARC Symposium 2014) (2015) in press
- [3] L.K. McNamara *et al.* Acta Cryst. D. **65**. 241-248(2009).

[4] V.Tereshko, M.Egli *et al* . Nat. Struct. Biol. **8**(10), 899-907 (2001).

* i.tanaka@mx.ibaraki.ac.jp