

Mycobacterium avium 由来ヌクレオチド加リン酸分解酵素の N 末端削除変異体の結晶化と結晶学的諸性質

Crystallization and preliminary X-ray analysis of the N-terminal deletion mutant of *Mycobacterium avium* diadenosine tetraphosphate phosphorylase

森 茂太郎*

国立感染症研究所 細菌第二部, 〒208-0011 武蔵村山市学園 4-7-1

Shigetrou Mori

Bacteriology II, NIID, Gakuen 4-7-1, Musashimurayama, 208-0011, Japan

1 はじめに

最近、*Mycobacterium avium* 由来 MAV_3489 タンパク質について詳細な機能解析を行い、本タンパク質が結核菌由来 Rv2613c タンパク質と同様に、基質である diadenosine polyphosphat に対して加リン酸分解活性を示すヌクレオチド加リン酸分解酵素であることを明らかにした [1]。さらに、ゲルろ過カラムを用いた解析から MAV_3489 タンパク質は Rv2613c タンパク質と同様に溶液中で 4 量体を形成していることを示した。これまでに、Rv2613c の立体構造を決定して機能構造相関解析を行うことにより、Rv2613c が結晶中でも特徴的な 4 量体構造を形成していること、並びにこの 4 量体構造が基質の結合に重要であることを明らかにしている [2]。そのため、MAV_3489 タンパク質においても Rv2613c タンパク質と同様に 4 量体構造が基質結合部位の形成に重要な役割を果たしていることが予想された。そこで、MAV_3489 タンパク質の詳細な基質結合部位の解析を行うため、立体構造決定を試みた。しかしながら、MAV_3489 タンパク質全長では X 線結晶構造解析に適した結晶が得られなかった。そこで、2 次構造予測において disorder 領域として予想された N 末端部分 (19 アミノ酸残基) を削除した変異体を作製して結晶化を行った。

2 実験

N 末端部分を削除した MAV_3489 タンパク質の変異体 (MAV_3489_N 末端削除変異体) について、大腸菌内で大量発現させた後、FPLC を用いて SDS-PAGE 上で単一バンドになるまで精製を行った。続いて、精製 MAV_3489_N 末端削除変異体を用いて結晶化条件のスクリーニングを行った。得られた結晶を用いて測定を行った。

3 結果および考察

MAV_3489 について、全長では X 線結晶構造解析に適した結晶が得られなかったが、MAV_3489_N 末端削除変異体については X 線回折データの収集が可能な結晶が得られた。決定した結晶化条件は、次の通りであった。Natrix HT screening kit (Hampton research 社) の No. 95; 0.05M HEPES-Na (pH 7.5)、

0.2 M Calcium chloride、28% polyethylene glycol 400、及び 0.002 M Spermine。20°Cにおいて約 2 週間で最大辺の長さが約 0.3 mm の結晶が得られた。この結晶を用いて測定を行い、回折データの収集を行った。HKL2000 を用いて回折データの解析を行った結果、本結晶は MAV_3489_N 末端削除変異体の立体構造決定に適した結晶であることが示された (Table 1)。現在は、Rv2613c タンパク質の構造をテンプレートに用いた分子置換法により、MAV_3489_N 末端削除変異体の立体構造の決定を進めている。

Table 1 MAV_3489_N 末端削除変異体の結晶学的諸性質 (括弧内の値は最終分解能シエルに対する値)

X 線源	Photon Factory
振り角 (°)	1
露光時間 (s)	2
波長 (Å)	1.0000
温度 (K)	100
検出器	ADSC Quantum 270
空間群	$P2_12_1$
格子定数 (Å)	$a = 78.0, b = 104.8, c = 111.1$
分解能範囲 (Å)	50.0 – 3.00 (3.05 – 3.00)
全反射数	159259 (1455)
独立した反射数	16834 (485)
平均冗長度	9.5 (3.0)
完全性 (%)	89.4 (54.0)
平均 $I/\sigma(I)$	12.1 (2.2)
$R_{\text{merge}}^{\#}$	0.253 (0.113)
Overall B factor from Wilson plot (Å ²)	44.97

$$^{\#}R_{\text{merge}} = \frac{\sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle|}{\sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)}$$

参考文献

- [1] N. Honda, S. Mori *et al.*, Protein. Expr. Purif. **112** (2015) 37-42.
 [2] S. Mori *et al.*, J. Mol. Biol. **410** (2011) 93-104.

* mshige@nih.go.jp