

ヌクレオシド二リン酸キナーゼ融合蛋白質および
 ストレプトアビジン融合蛋白質の X 線結晶解析
 X-ray structural analysis of the assembly forms of
 nucleoside diphosphate kinase fusion protein and streptavidin fusion protein

新井栄揮^{1,*}, 柴崎千枝¹, 清水瑠美¹, 安達基泰¹

¹(国)量子科学技術研究開発機構 量子ビーム科学研究部門 高崎量子応用研究所 (東海),
 〒319-1106 茨城県那珂郡東海村大字白方 2 番地 4

Shigeki ARAI^{1,*}, Chie SHIBAZAKI¹, Rumi SHIMIZU¹ and Motoyasu ADACHI¹
¹National Institutes for Quantum and Radiological Science and Technology,
 Tokai, Ibaraki 319-1106, Japan

1 はじめに

生体分子を人工的に三次元に配置させた例は、結晶化を除くと極めて少ない。一般に蛋白質結晶は高い含水率(体積の 40~70%程度)を有し、結晶内においても蛋白質分子は基質との結合や酵素活性の発現が可能な例が多数報告されている。また、結晶中の蛋白質は高度な安定化を受ける。従って、結晶と同程度に蛋白質を高密度に充填させ、蛋白質分子の三次元的配列や会合構造を自在に操作して固定化したり、蛋白質結晶内の分子配置を操作できれば、新規機能性分子材料の創製や新しい結晶化技術の確立に繋がると期待される。これらの背景から、我々は、異なる会合構造を有する蛋白質同士を架橋し、その構造を明らかにすることで、蛋白質の会合構造の制御・人工的改変の可能性を調べた。

2 実験

六量体を形成する *Thermus thermophilus* 由来ヌクレオシド二リン酸キナーゼ(TtNDK)、四量体を形成する *Streptomyces avidinii* 由来ストレプトアビジン(StAv)、鎖状会合体を形成する *Deinococcus radiodurans* 由来 DNA 修復促進蛋白質(PprA)をモデル蛋白質として用いた。分子表面に露出している TtNDK の N 末端・C 末端、及び、StAv の C 末端に接続した蛋白質は、TtNDK 六量体表面や StAv 四量体表面に空間規則的に配置する可能性が考えられた。また、これまでに著者らは、PprA が多数連結した自己会合体を形成することを明らかにしており[1]、更に PprA の会合構造を二量体に限定する変異型 PprA (以下 PprA*と呼ぶ)の作製にも成功している。これら TtNDK, StAV, PprA*を用いて融合蛋白質を設計・作製し、会合構造の解明を試みた。

大腸菌の遺伝子組換えにより、各融合蛋白質を発現・調製した結果、StAv-PprA*融合蛋白質は発現量が不十分であったが、PprA*の N 末端側に TtNDK を

接続した TtNDK-PprA*融合蛋白質では結晶化に必要な試料量を得ることができた。

X 線結晶回折測定には NW12A 及び NE3A を用いた。30% Glycerol を含む沈殿剤溶液や NVH oil, Paraton を抗凍結剤として用い、100 K で測定を行った。十数種類の異なった結晶化条件で得られた TtNDK-PprA*融合蛋白質結晶(約 0.05 mm)を測定したが、いずれも回折点がブロードで、且つ、回折分解能が不十分であり(約 10 Å)、解析可能なデータが得られなかった。そこで計画を変更し、溶液状態において X 線小角散乱測定を行い、PprA 単独および TtNDK-PprA*融合蛋白質の構造を決定・比較した。

3 結果および考察

PprA 単独の散乱曲線 $I(q)$ から、プログラム GASBOR を用いて dummy atom model を構築した結果、PprA 単独では直鎖状の会合体を形成することが確認された(図 1a)。

一方、TtNDK / PprA*融合蛋白質の散乱曲線 $I(q)$ から GASBOR を用いて dummy atom model を構築した結果、三又分岐を有する会合体を形成することが示唆された(図 2b)。即ち、TtNDK を融合することで、PprA 単独では不可能なネットワーク状の会合体を形成できたと考えられる。三又分岐間の平均距離は $111 \pm 20 \text{ \AA}$ であり、TtNDK 二分子分の短軸(約 60 Å)と PprA 二分子分の短軸(約 60 Å)の足し合わせにほぼ一致すると考えられる。

これらの結果から推察される会合様式を図 2 に示す。融合蛋白質の会合様式としては、TtNDK 六量体表面に存在する PprA*六分子全てが会合に寄与するパターン(図 2a)と、PprA*のうち平均三分子が TtNDK 六量体間の会合に寄与するパターン(図 2b; 残りの PprA*三分子は立体障害などにより会合できない可能性)が考えられる。図 2a, 2b のどちらのパターンも三又分岐間の距離が 120 Å 程度の会合体を形成しうるが、それらのパターンが混在することで結晶性に悪影響を与えている可能性もある。本研究

により、TtNDK や PprA*を利用した蛋白質空間配置・会合制御技術開発のための基礎的知見を得ることができた。

4 まとめ

本研究により得られた TtNDK と PprA の融合蛋白質の構造情報と会合制御の基礎的知見は、同蛋白質を基盤分子とした新規機能性蛋白質材料の創製に活用できると期待される。また、本研究で得られた構造的知見に基づいて、融合蛋白質の会合様式の均一化を狙った蛋白質分子設計を行い、X 線結晶解析が可能な高品質結晶の作製や、より高度な蛋白質空間配置制御を試みる予定である。

参考文献

[1] M. Adachi *et al. Protein Sci*, **23**, 1349 (2014)

* arai.shigeki@qst.go.jp

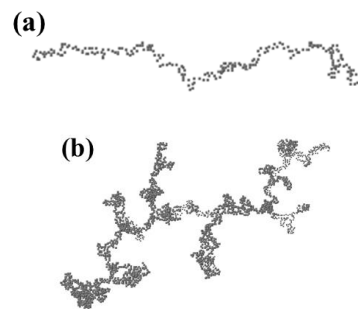


図 1 本研究で構築した Dummy atom model。 (a) PprA。 (b) TtNDK-PprA*融合蛋白質。

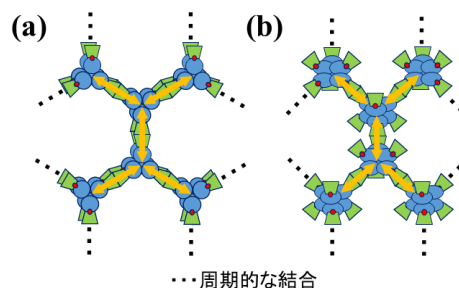


図 2 TtNDK-PprA*融合蛋白質の会合様式の模式図。緑は PprA*、青は TtNDK、赤はリンカーを示す。本研究で作製した融合蛋白質は、(a), (b)もしくはその両者が混在した会合体を形成すると考えられる。両矢印（オレンジ）で示した三又分岐間の距離はいずれも約 120Å。