

多数の同形結晶を用いた β シートモデル蛋白質の構造決定から明らかにした β シートの柔軟性

β -sheet flexibility revealed by comprehensive structural determination from isomorphous crystals

真壁幸樹*, 藤原英樹

山形大学大学院理工学研究科バイオ化学専攻, 〒992-8510 米沢市城南 4-3-16

Koki Makabe* and Hideki Fujiwara

Yamagata University, 4-3-16 Jyonan, Yonezawa, 992-8510, Japan

1 はじめに

アルツハイマー病などの神経変性疾患ではその病変部位に蛋白質の凝集体、アミロイドが蓄積していることが知られている。このアミロイドの形成機構に関する分子レベルでの理解は重要であるが、その不溶性と不均一性のために通常の溶液系の測定方法を用いることが出来ず、アミロイドの構造形成原理には不明な点が多い。この限界を乗り越えるために、我々はこれまでにモデル蛋白質を用いたアプローチを研究してきた。これは、ペプチドが自己組織化した β シート会合体を一般的な測定系が適用可能である球状蛋白質中に模倣したものである (Peptide Self-Assembly Mimics; PSAM と命名)。このようにして作製された PSAM を用いて、様々なアミロイド形成配列を導入した変異体を作り出してきた。

最近我々は、この PSAM に α B クリスタリン由来配列の VLGDV 5 残基を移植した変異体を構築した (PSAM-VLGDV1 と命名)。この配列は、アミロイドを形成することが既知の α B クリスタリンの部分配列 KVKVLGDVIEV(K11V) の中心配列である。K11V は以前の報告でシリンドリンと呼ばれるバレル状の構造を形成することが知られている。この PSAM-VLGDV1 の立体構造決定に成功し、観察された β シートの曲がる程度の変化を報告した[1]。その後で、同じ結晶化ドロップから得た同形の結晶の構造を決定したところ、わずかに構造が変化していることを見出した (図 1)。

本研究では、同形結晶中に観察された PSAM-VLGDV1 の構造にはどのようなバリエーションが有るのか、また野生型でも同様の同形結晶中での構造のバリエーションがあるのかを解明するために、同形結晶を用いて包括的に構造決定を行った。

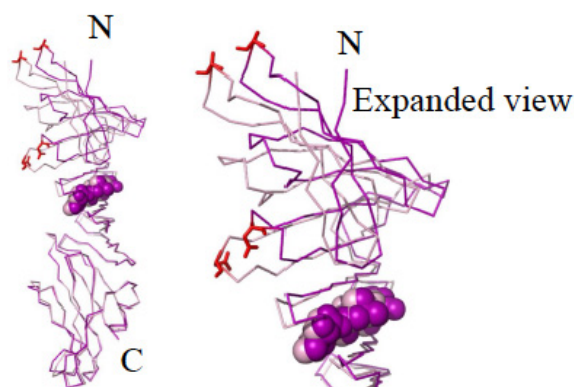


図 1 PSAM-VLGDV1 の同形結晶から得られた二種類の分子構造。

2 実験

PSAM 変異体 PSAM-VLGDV1、野生型 PSAM-WT それぞれについて、大腸菌発現系を用いて作製した。得られた試料を蒸気拡散法によって結晶化を行い、PF の構造生物学ビームラインにて回折データを収集した。最終的に PSAM-VLGDV1 に関して 8 つ、野生型 PSAM-WT に関して以前のデータに加えて新たに 4 つのデータセットを収集した。これらはすべて、同じ結晶化条件を用いて同形結晶を作り出し、測定を行った。

3 結果および考察

決定した 8 つの PSAM-VLGDV1 構造(form1 から form8)および、以前に決定した構造をあわせた 5 つの野生型 PSAM-WT 構造 (form1 から form5) を図 2 に示す。

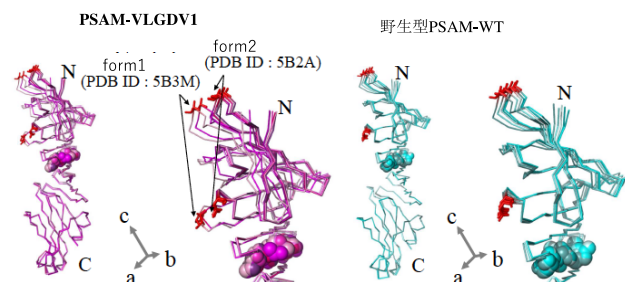


図 2 8 つの PSAM-VLGDV1 構造と 5 つの野生型 PSAM-WT 構造。C 末端ドメインで重ねた。

結果から、PSAM-VLGDV1 は2つの構造グループに分けることができる一方、野生型 PSAM-WT は単一の構造を持っていることがわかった。すなわち、PSAM-VLGDV1 は同形結晶中に少なくとも2つの構造を持つことができることを示している。

どのようにして同形結晶中に異なる構造を持つことができるのかを知るために、PSAM-VLGDV1 の2つの構造グループ間の結晶パッキングを調査した。ここから、2つの構造グループは同形であるためほぼ同じパッキングをしているが、わずかに分子間の接触が変化していることが分かった (図3)。

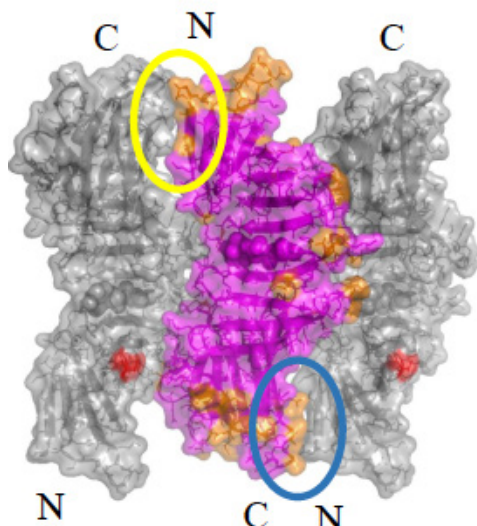


図3 PSAM-VLGDV1 の結晶パッキング。丸で囲んだ場所に接触の違いが観察された。

異なった構造が現れる起源を明らかにするために分子動力学シミュレーションを 50 ns 行った (図4)。結果から、野生型と比較して PSAM-VLGDV1 はアミロイド配列の移植の結果、大きく構造が揺らいでいることが分かった。

4 まとめ

同形結晶の包括的な構造決定から、異なった構造を同形結晶に捕獲できることがわかった。筆者たちの知る限り、このような包括的な同形結晶構造の調査ははじめての報告である。これらの結果をまとめ、最近原著論文として受理された[2]。

謝辞

OspA 発現ベクターはニューヨーク大学小出昌平教授よりご恵与いただきました。感謝いたします。

参考文献

- [1] Fujiwara H, Hongo K, Hori Y, Yoshida N, and Makabe K*
β-sheet elasticity of peptide self-assembly mimic, PSAM, with a grafted sequence characterized by comprehensive analyses of isomorphous crystals
The Journal of Molecular Liquids, in press, (2019)
- [2] Hori Y, Fujiwara H, Fujiwara W, Makabe K.
Grafting a short chameleon sequence from αB crystallin into a β-sheet scaffold protein.
Proteins. 87(5), 416-424.(2019)

* makabe@yz.yamagata-u.ac.jp

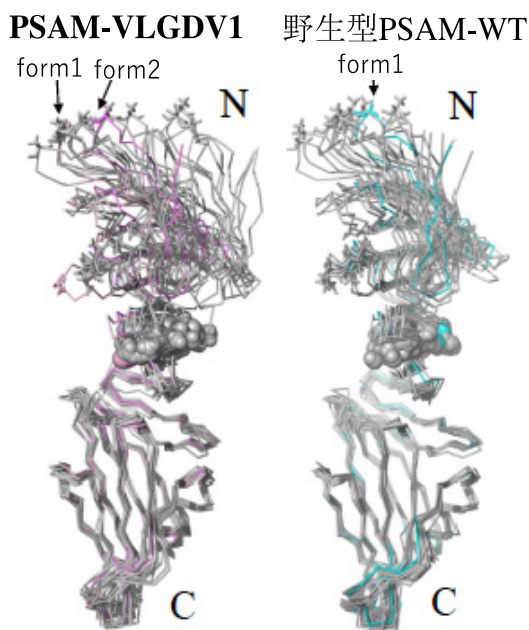


図4 分子動力学シミュレーションの結果。5 ns ごとの構造をC末端ドメインと重ね合わせて示した。