

結晶内に創り出したコンタクト効果フリー空間を利用して蛋白質ループ構造の溶液中のコンホメーションを推定する
 Estimation of solution conformation of an intrinsically flexible loop of a protein molecule using crystal contact-free space designed in protein crystals

斯琴巴拉, 神田大輔*

九州大学生体防御医学研究所

〒812-8582 福岡市東区馬出 3-1-1

Siqin BALA and Daisuke KOHDA*

Medical Institute of Bioregulation,

Kyushu University

3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan

1 はじめに

結晶コンタクト効果フリーな“隙間”を結晶格子中につくり、「結晶コンタクトによる柔動構造の変形・固定問題」の解決を目指している(図1)。3つの技術要素は、①タグタンパク質との融合タンパク質の作製、②タグタンパク質と対象タンパク質を一本の長いヘリックスを用いて硬く接続、さらに親和力の弱いリガンドの場合は、③占有率を保障するために共有結合を用いて、リガンドを対象タンパク質にテザリングする、である。

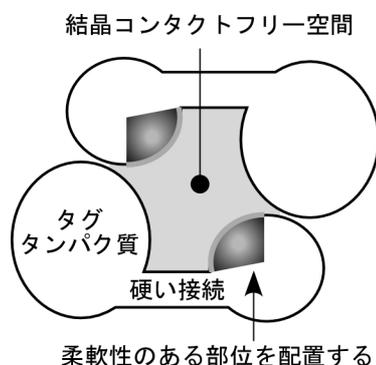


図1：対象タンパク質をタグタンパク質に硬い接続を用いて融合させることで、2つのタンパク質の間に隙間空間を創り、そこに対象タンパク質の一部分を意図的に配置する。

過去に、ミトコンドリアプレ配列受容体 Tom20 タンパク質とマルトース結合タンパク質 (MBP) の融合タンパク質を作製して結晶化を行い、Tom20 に結合した状態のプレ配列ペプチドを差フーリエ電子密度マップの電子密度として可視化することを報告した [1]。実際に得られた電子密度はプレ配列ペプチドの大きな振幅の動きの重なり部分に対応していた [2]。

結晶コンタクトフリー空間の利用法の一つとして、結晶コンタクトによるタンパク質構造の変形を除く

ことがある。結晶構造と溶液 NMR 構造の両方が決定されていて、一部のループのコンホメーションが異なる例として酵母の Tim21 タンパク質を選択した。結晶構造 (PDB 2CIU) のループ構造 (10 残基) を見ると、結晶コンタクトによって変形していることが推察される。一方、NMR (PDB 2MF7) のループ構造は収束が悪い多数のコンホメーションの集団となっている。そこで、MBP と Tim21 の融合タンパク質を作成し、結晶構造解析を行った。

2 実験

酵母の Tim21 蛋白質のインターメンブレンスペース領域に対応する D105-K217 を用いて、大腸菌の MBP (maltose binding protein) との融合蛋白質 MBP<*n*>Tim21 を作製した。ここでカギ括弧の中の *n* はリンカーの長さを表す。あらかじめ PyMOL を使って分子モデリングを行い、リンカーの長さとして 4 種類 (*n* = 16, 17, 20, 24 残基) を選択した。リンカーのアミノ酸配列は α ヘリックスを取りやすいように、ポリアラニンを基本に構造安定化のためにグルタミン酸とリジンのペアを複数個導入した配列とした。また、MBP の N 末端にヒスタグを付加したコンストラクトも作製し、組み合わせで計 8 種類の融合蛋白質を大腸菌で発現した。アフィニティ精製は、ヒスタグ無しの場合はアミロースレジンを使い、マルトースを用いて溶出を行うために、MBP はマルトースを結合している。一方、ヒスタグ有りの場合は Ni-NTA レジンに吸着させて、イミダゾールを用いて溶出するので、MBP はリガンドを結合していないアポ形となる。したがって、CCFS のデザインには、 α ヘリカルリンカーの長さ と MBP の形 (開構造か閉構造) という 2 つの自由度がある。通常の結晶化スクリーニングを行い、結晶化条件の最適化を行った。必要に応じて、アディティブスクリーニングとマイクロシーディングを行った。PF BL-1A と SPring8 BL44XU において回折測定を行い、分解能 1.5-2.0 Å

の回折データの収集し、分子置換法で 3 つの結晶構造を得た [3].

3 結果および考察

結晶コンタクト効果フリーな“隙間”（以下、crystal contact-free space, CCFS と呼ぶ）に配置されたループ構造は結晶コンタクトが無いために、その動きが大きくなり電子密度が薄くなる（正確には結晶は凍結状態にあるので、静的ディスオーダーが大きくなる）。実際は、注目しているループの電子密度は他の部分に比べて強度が低かったが、モデルを置くことが可能であった。CCFS がデザイン通り出来ていることを評価するために、当該ループの温度因子を比較した。その結果、3 つの結晶構造のうち 1 つでほぼ完全な CCFS ができていることがわかった（図 2）。

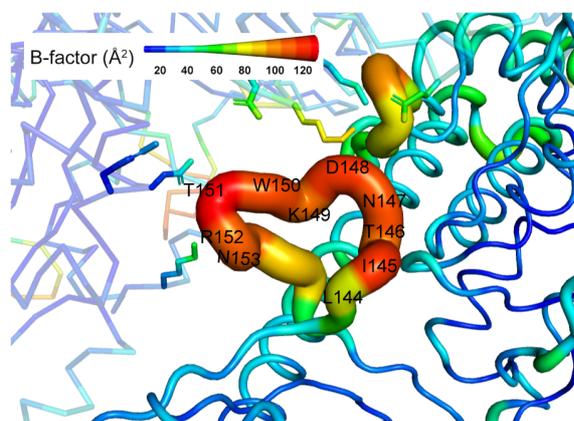


図 2 : CCFS 内に配置されたループ (L144-N153) は大きな温度因子をもつ。CCFS の壁を形成する結晶中の隣の分子の温度因子は小さいことから、ループは CCFS 内で独立した動き（あるいは多形）をしていることがわかる。

この CCFS 中のループの構造を通常の結晶構造と NMR 溶液構造と比較した。その結果、どちらも異なることが判明した。したがって、CCFS 中のループのモデル構造が真の溶液構造（のアンサンブル平均）と見なして良いかどうかの判断ができない事態となった。

そこで、NMR 構造を新規に決定し直したところ、CCFS 中のループのコンホメーションは新しい NMR 構造の分布の範囲内にあることがわかった。超高磁場 950 MHz の NOESY スペクトルと自動帰属プログラムを使用したことで、フレキシブルな領域であってもバイアスが少い溶液構造が決定できたと考えている。さらに、分子シミュレーション計算を行い、CCFS 中のループのコンホメーションは分子シミュレーション計算から得られるループの空間分布のほぼ中心に位置することがわかった。

4 まとめ

CCFS の中に配置したフレキシブルなループ（10 残基）の構造を結晶構造解析により実験的に決定した。そのコンホメーションは通常の結晶構造や最初の NMR 構造とは異なっていたが、新しい NMR 構造および分子シミュレーション計算から得られたコンホメーションの空間分布の中心に位置することを見いだした。したがって、CCFS 結晶化法は蛋白質などのフレキシブル部分の溶液中のコンホメーションの推定に使えることを実証することができた。

謝辞

酵母 Tim21 のインターメンブレンスペース領域の NMR 構造決定は、横浜国立大学・児嶋教授と大阪大学・新家博士との共同研究である。また、酵母 Tim21 の分子シミュレーション計算は理化学研究所・宮下博士と名古屋大学・Arpita Srivastava 博士との共同研究である。

参考文献

- [1] R. Matsuoka, A. Shimada, Y. Komuro, Y. Suigta, D. Kohda, *Protein Sci.* **25**, 754-768 (2016).
- [2] R. Matsuoka *et al.*, Photon Factory Activity Report 2015 #33 (2016) **B**, No 181.
- [3] PDB entry: 6K7D, 6K7E, 6K7F.

* kohda@bioreg.kyushu-u.ac.jp