

緑藻由来鉄同化タンパク質 (FEA1) の X 線結晶構造解析
X-ray crystallographic analysis of iron-assimilating protein 1 FEA1 from
Chlamydomonas Reinhardtii

田中秀明, Juniar, Linda, 栗栖源嗣
大阪大学蛋白質研究所

〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 3-2

Linda JUNIAR, Hideaki TANAKA and Genji KURISU²
Institute for Protein Research, Osaka University,
3-2 Yamada-oka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

1 はじめに

鉄はタンパク質の補酵素の必須成分として、すべての光合成生物にとって重要である。緑藻 (*Chlamydomonas Reinhardtii*) では、鉄の量は鉄同化タンパク質1 (FEA1) などのタンパク質によって厳密に制御されている。このペリプラズムに存在するタンパク質は鉄が不足すると発現するが、その機能については不明である。FEA1は、他のタンパク質の構造やアミノ酸配列と類似性がないため S-SAD 法による位相決定を試みた。本研究により FEA1 の立体構造が明らかになれば、FEA1 の機能や鉄同化経路との関連性を理解することができる。

2 実験

本研究では、大腸菌を用いた系で N 末端のシグナル配列を欠損した FEA1 を発現、精製することに成功し、アポ型 FEA1 の結晶をハンギングドロップ蒸気拡散法で得た。新規構造であるため、位相決定を目指してセレンメチオニンや重原子の誘導体作製に取り組んだが良いデータが得られなかった。次に FEA1 は 1 分子当たり 13 個の S 原子を持っているため、Native S-SAD 法による位相決定を目指した。当初、データ収集にはループで拾った結晶をそのまま用いたが位相決定には至らず、レーザー加工によって可能な限り結晶周りの溶媒を取り除いた結晶を用いてより精度の高いデータ収集に取り組んだ。

3 結果および考察

精製した FEA1 は沈殿剤として 200mM 硫酸アンモニウム 100mM イミダゾール-HCl (pH6.5), 11%(w/v) PEG 3350, 30%(w/v) MPD を含んだ溶液を用い、ハンギングドロップ蒸気拡散法で 4°C 下で結晶化を行った。その結果、良質な結晶が再現性良く得られるようになった。結晶の空間群は C2 で格子定数は $a=85.8$, $b=155.9$, $c=129.5$ Å、 $\beta=102.3^\circ$ であり、非対称単位中に 3 分子の FEA1 が含まれていると見積もられた。本結晶を用い、SPRING-8 の BL44XU にて 1.9Å 分解能で回折強度データを収集することができた。Native S-SAD のデータ収集は、PF の BL-1A にて 2.7Å の長波長 X 線を用いて行った。まず、最初にループで拾った結晶をそのまま用いてデータを収集したが、位相決定には至らなかった。よって、

SN 比を向上して精度の高いデータを得るため、AR-NW12A に設置された結晶加工用のレーザーを用い、極低温下で結晶の周りにある溶媒を出来る限り除去した。レーザー加工した結晶は凍結保存し、BL-1A にてデータ収集を行い、29 セットのデータを収集した。XSCALE_CLUSTER で同型性の高い 16 セットのデータだけを抽出し、XSCALE を用いて 2.6Å 分解能でスケーリングした。初期位相の決定には、autoSHARP を用い、autoBUSTER により位相改良を行った。初期構造の中には 1060 残基からなる 7 本のポリペプチド鎖があり、FEA1 配列のうち 1032 残基が確認できた。現在は得られた初期構造を用いて 1.9 Å 分解能でモデルの再構築と精密化を進めている。

4 まとめ

本研究では BL-1A での長波長 X 線を用いた S-SAD と結晶のレーザー加工技術を用いて FEA1 結晶の位相問題を解決することができた。今後、FEA1 の構造情報は、本タンパク質の機能解明や鉄同化経路との関連性を理解する上で重要な知見となるであろう。

謝辞

本研究における S-SAD データの収集では松垣直宏博士に大変お世話になりました。また、結晶のレーザー加工では、引田 理英博士に大変お世話になりました。ここに感謝致します。

参考文献

[1] L. Juniar, V. Adlfar, M. Hippler, H. Tanaka and G. Kurisu., Acta Cryst. Section F, **77**, 134-139 (2021).

成果

特記事項無し

* tana@protein.osaka-u.ac.jp