

X線結晶構造解析による微生物不凍タンパク質の水和水構造の解析

X-ray crystallographic analysis of the hydration structure of microbial antifreeze protein

ノールムハンマドモフィズ ウッディンカーン^{1,2}, 津田栄^{1,2,3}, 近藤英昌^{1,2,*}

¹産業技術総合研究所 生物プロセス研究部門

〒062-8517 北海道札幌市豊平区月寒東2条17丁目2-1

²北海道大学大学院 生命科学院, 〒060-0810 北海道札幌市北区北10条西8丁目

³産総研・東大 先端オペランド計測技術 オープンイノベーションラボラトリ

〒277-8565 千葉県柏市柏の葉5-1-5

N. M.-Mofiz Uddin KHAN^{1,2}, Sakae TSUDA^{1,2,3} and Hidemasa KONDO^{1,2,*}

¹Bioproduction Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), 2-17-2-1, Tsukisamu-Higashi, Toyohira, Sapporo, Hokkaido 062-8517, Japan

²Graduate School of Life Science, Hokkaido University,

Kita 10, Nishi 8, Kita-ku, Sapporo, Hokkaido 060-0810, Japan

³AIST-UTokyo Advanced Operando-Measurement Technology Open Innovation Laboratory (OPERANDO-OIL), National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), 5-1-5, Kashiwanoha, Kashiwa, Chiba 277-8568, Japan

1 はじめに

不凍タンパク質 (Antifreeze Protein, AFP) は微小な氷結晶の表面に特異的に結合し、氷の成長を抑制する性質を持つ。これまでに低温環境下に生息している生物から様々な立体構造の AFP が見出されている。これらの AFP の結晶構造解析によって、氷結晶に結合する部位 (Ice-binding site, IBS) は分子表面の平坦な領域に位置し、その周囲には多くの水分子が存在していることが知られている。例えば、昆虫 AFP は規則的なアミノ酸配列の反復によって構成された β ソレノイド構造となり、特定のアミノ酸が格子状に配置された IBS が形成されている。また、IBS の周囲には等間隔で水和水が配置されている。これらの水和水は氷の結晶面の水分子と類似した構造であることから、IBS 上の水和水は AFP と氷結晶を結びつける役割を果たしていると考えられている。

真菌や酵母、珪藻などの多様な微生物が産出する AFP は反復配列がなく、ねじれた β ソレノイド構造を形成している。また、これらの AFP の IBS のアミノ酸配列は保存性が低く、氷結晶に対する結合の強さが大きく異なっている。しかしながらその分子機構は理解が進んでいない。本研究課題では好冷性担子菌であるイシカリガマノホタケ (*Typhula isikariensis*) が産出する AFP (*TisAFP*) の結晶構造解析によって IBS 周囲の水和構造を決定し、不凍機能と関連付けた考察を行うことによって、氷結晶結合能を規定する構造原理を明らかにすることを目指した。

2 実験

TisAFP アイソフォームの1つの *TisAFP7* を結晶化し、BL-1A で回折強度を収集した。*TisAFP7* の結晶構造を解析し、すでに結晶構造が決定されている2種のアイソフォーム (*TisAFP6* および *TisAFP8*) と比較した。特に、IBS の周辺の水和水の構造に着目した。これらの *TisAFP* アイソフォームは異なる空間群で結晶化しており、結晶中で IBS が隣接する AFP 分子と近い場合には、水分子の座標が他の領域の近傍にあるものとして登録されている場合があった。そのため、それぞれの *TisAFP* の PDB 座標から結晶の対称操作によって等価な水分子を発生させて、それが IBS の周囲にある場合には水和水の構造比較へ加えることとした。また、IBS の一部分が隣接する分子と接触し、水和水が排除されている場合には構造の比較に用いないこととした。また、3種の *TisAFP* アイソフォームの不凍機能の解析によって、*TisAFP8* が最も強く氷結晶に結合することがわかっている。次に *TisAFP7*、*TisAFP6* の順であり、このことを IBS 上の水分子の構造と関連付けて考察した。

3 結果および考察

TisAFP7 は収集した回折データを用いて分子置換法によって構造決定し、1.54Å 分解能で精密化を行った。*TisAFP7* を *TisAFP6* と *TisAFP8* に重ね合わせた場合の C α 原子の R.M.S.D は 0.37Å と 0.34Å であり、同一の主鎖であることがわかった。それぞれの *TisAFP* アイソフォームの IBS の周囲に存在する多数の水和水の中には、規則的な構造を形成しているも

のが見出された。特に図 1 で示した水和水は、水素結合によるジグザグパターンのネットワークを形成している。また、このパターンは氷結晶の基底面を構成する水分子の構造に類似していた。また、ネットワークは不凍機能が最も高い *TisAFP8* では最も広範囲にわたるネットワークが形成されていた。

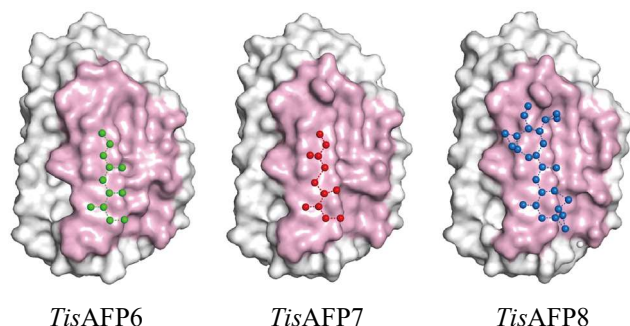


図 1 : *TisAFP* アイソフォームの氷結晶結合部位 (IBS : ピンク色の領域) に存在する規則的に配置している水和水。

TisAFP8 は氷結晶の基底面に結合することで、氷結晶の成長を強く抑制することがわかっている。このことから、氷の基底面へ結合し、氷結晶の成長を強く抑制するためには IBS における広範囲にわたる水素結合ネットワークが必要であることが示唆された。

4 まとめ

本研究課題の結果は、AFP は IBS 周辺の水和水を介して氷結晶と結合することを示している。また、IBS を構成するアミノ酸は、氷結晶面を認識し結合するために必要な水和水の構造形成の足場の役割を担っていると考えられる。これらの知見は微生物 AFP の分子進化の解明や、AFP の機能改良、あるいは分子模倣による新規不凍物質の創出に寄与すると考えられる。

謝辞

PF での回折強度の測定における PF のスタッフの皆様のご協力に心より感謝いたします。

参考文献

- [1] NMMU. Khan, T. Arai, S. Tsuda and H. Kondo, *Sci. Rep.* **11**, 5971 (2021).
<https://doi.org/10.1038/s41598-021-85559-x>
- [2] H. Kondo *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **109**, 9360-9365 (2012). <https://doi.org/10.1073/pnas.1121607109>
- [3] J. Cheng, Y. Hanada, A. Miura, S. Tsuda and H. Kondo, *Biochem. J.*, **473**, 4011-4026 (2016).
<https://doi.org/10.1042/BCJ20160543>

* h.kondo@aist.go.jp