

# 緑膿菌由来の酸素結合タンパク質マイクロヘムエリスリンの構造解析 Structural analysis of microhemerythrin, an oxygen-binding protein from *Pseudomonas aeruginosa*

南本晃希<sup>1</sup>, 北西健一<sup>2</sup>, 海野昌喜<sup>1,3,\*</sup>

<sup>1</sup> 茨城大学大学院理工学研究科, 〒316-8511 茨城県日立市中成沢町 4-12-1

<sup>2</sup> 東京理科大学理学部第一学部化学科, 〒162-8601 東京都新宿区神楽坂 1-3

<sup>3</sup> 茨城大学フロンティア応用原子科学研究センター, 〒319-1106 茨城県那珂郡東海村白方 162-1

Kouki MINAMIMOTO<sup>1</sup>, Kenichi KITANISHI<sup>1</sup>, and Masaki UNNO<sup>1,3,\*</sup>

<sup>1</sup> Graduate School of Science and Engineering, Ibaraki University, 4-12-1 Nakanarusawa, Hitachi 316-8511, Japan

<sup>2</sup> Department of Chemistry, Faculty of Science, Tokyo University of Science, 1-3 Kagurazaka, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8601, Japan

<sup>3</sup> Frontier Research Center for Applied Atomic Sciences, Ibaraki University, 162-1 Shirakata, Tokai, Naka 319-1106, Japan

## 1 はじめに

ヘムエリスリン (Hr) は、海洋無脊椎動物や一部の環形動物がもつ酸素運搬タンパク質である。Hr の単量体は、X線結晶構造解析によって、4つの $\alpha$ ヘリックスの中心に2つの鉄が酸素に架橋された構造 [1] をもつことが明らかになっている。また、還元型、酸素結合型、酸化型の状態の構造も明らかにされており、その結合様式が原子レベルで提唱されている [2]。しかし、X線構造解析では水素原子の可視化が難しく、酸素結合様式を実験的に見る方法として適さない。ゆえに、分光学的には二核鉄中心に結合する酸素原子がヒドロペルオキシ型になり、水素結合により安定化されることが提唱されているにも関わらず、現在のところ、その酸素と水素原子を同時に可視化した例がなく、酸素結合機構や構造変化については、水素原子レベルではわかっていない。

タンパク質中の水素原子を可視化するには中性子結晶構造解析が有利だが、Hr は多量体であり、実質的に結晶の格子定数に制約がある中性子結晶構造解析を行うことは難しい。最近になり、緑膿菌由来のヘムエリスリン様タンパク (マイクロヘムエリスリン: Mhr) が見出された。この Mhr は Hr と同様に酸素を結合し、その結合を安定化することが示唆されている。我々は高純度で一定量の Mhr 精製試料を得ることに成功したため、本研究では、中性子結晶構造解析により、Mhr の水素原子レベルの構造を明らかにすることを目指すこととした。Mhr の構造が水素原子レベルでわかれば、Hr の酸素結合様式を明らかにすることができ、同時に緑膿菌の増殖を抑える酸素結合阻害剤の開発などにつながることを期待される。Mhr の立体構造は未知であるため、まず、Mhr の X線結晶構造解析から取り掛かった。

## 2 実験

大腸菌発現系で Mhr の遺伝子を発現し、Ni アフィニティ及びゲル濾過カラムクロマトグラフィーによって精製し、PEG を含む結晶化溶液を用いてシッティングドロップ蒸気拡散法で結晶化した。X線回折強度データ収集は、PF の BL-5A, AR-NW12A と、Paul Scherrer Institute (スイス) にある Swiss Light Source (SLS) の X06SA で行った。なお、SLS での実験は全自動で行った。

## 3 結果および考察

結晶化スクリーニングとその条件の最適化の結果、酸化型及び azide 結合型 Mhr の結晶を得ることができた。酸化型 Mhr の結晶から得たデータを使って、鉄の異常散乱を用いた方法で構造を決定した。Mhr はゲル濾過分析により単量体と予測されており、非対称単位には 2 分子が存在した。得られた構造は他の Hr と同様に 4つの $\alpha$ ヘリックスに鉄二核中心の構造をもち、2つの鉄は 5つのヒスチジン、グルタミン酸とアスパラギン酸に配位していることを確認した。

## 4 まとめ

現在は、酸素結合型や還元型の良質な結晶を得る条件検討と、中性子結晶構造解析のための結晶大型化を行っている。

## 謝辞

SLS でのデータ収集について、SLS のビームライン関係者 (課題番号 20191094, 20191134) および PF の支援者に感謝いたします。

## 参考文献

[1] A. H. Margaret et al. *J. Mol. Biol.*, **218**, 583-593 (1991)

[2] H.-C. C. Kelvin et al. *J. Inorg. Biochem.*, **150**, 81-89 (2015)

\* masaki.unno.19@vc.ibaraki.ac.jp