

# 中性 pH 条件における NAG2 とリゾチーム複合体の相互作用について Interaction between NAG2 and lysozyme complexes under neutral pH conditions

石上千寛<sup>1\*</sup>, 田中伊知朗<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> 茨城大学, 〒316-8511 茨城県日立市中成沢町 4-12-1

Chihiro ISHIGAMI<sup>1\*</sup> and Ichiro TANAKA<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Ibaraki University, 4-12-1, Nakanarusawa, Hitachi, Ibaraki 316-8511, Japan

## 1 はじめに

昨今、技術の進歩でタンパク質結晶構造解析の分野において様々なことが解明されてきている。特に、分子レベル、原子レベルで構造を特定できる X 線回折や水素の位置特定まで可能な中性子回折はタンパク質の構造や触媒機構の解明に大きく貢献している。

本研究で用いたリゾチームはアミノ酸 129 残基からなるタンパク質であり、細菌の細胞壁に存在する多糖類を加水分解する酵素である。その触媒基は Glu35 と Asp52 であり、触媒反応に深くかかわるアミノ酸である。触媒反応では Glu35 がプロトネーションしていることが触媒反応の始点であり触媒サイクルの始点でもあるため非常に重要である。Glu35 がプロトネーションしていることは過去の中性子回折実験で示されている。水素の散乱断面積の大きさを利用し、重水との差分を電子密度マップとして表示するという解析方法である X/N 同時精密化による構造解析も行われている(X/N 同時精密化によって得られたリゾチームの構造(7dec)など[1])。このように、中性子回折実験では水素の位置情報を正確に得ることができる。

至適 pH 付近でリゾチーム中の Glu35 がプロトネーションすることは Glu の pKa の値から説明がつかないことであったが、<sup>1</sup>H-NMR や分光学的手法によって Glu35 が異常に高い pKa を示すということが示されてる[2,3]。また、リガンドを入れることで pKa の値が多少変化することも確認されている[3]。しかし、この結果は溶液条件での結果であり、結晶条件においては Glu35 付近の様子が変化し、pKa は違う値を示すと考えている[4]。それら解明のための糸口として N-acetylglucosamine の 2 量体である NAG2 をリガンドに用い Glu35 付近の水やアミノ酸の構造やコンフォメーションを X 線回折で特定し、化学的観点から考察していく。そして、将来的には中性子回折実験によって水素の位置まで含めた構造解析をし、過去に示されたリゾチームの構造と比較していく。

## 2 実験

### ・緩衝溶液作成

pH メーターの値が 4.5 となるまで酢酸溶液(1.0M)に酢酸ナトリウム溶液(1.0M)を加えていき pH4.5 の酢酸-酢酸ナトリウム緩衝溶液を作成した。

### ・リゾチーム-NAG2 溶液、結晶化剤の作成

作成した緩衝溶液を用いて、リゾチーム溶液(50mg/mL、60mg/mL、70mg/mL)と塩化ナトリウムの結晶化剤(1.2M、1.4M、1.6M)を作成した。その後、リゾチーム溶液にリゾチーム : NAG2 のモル比で 1 : 1.2 となるように溶かした。

### ・バッチ法による共結晶化

リゾチーム-NAG2 溶液 3 $\mu$ L と結晶化剤 3 $\mu$ L をマイクロピペットでマイクロバッチのバッチ内でピペッティングにより混合し、その上から流動パラフィン 5 $\mu$ L で蓋をした。その後 20°C で 1~2 日間インキュベートした。

### ・ソーキング準備

重水を溶媒に酢酸と酢酸ナトリウムで pD4.5 の緩衝溶液を、重水を溶媒に HEPES と水酸化ナトリウムで pD7.0 の緩衝溶液を、軽水を溶媒に HEPES と水酸化ナトリウムで pH7.0 の緩衝溶液をそれぞれ作成した。これらの緩衝溶液を使用し、リゾチームの濃度を 10mg/mL、結晶化剤を 0.6M、0.7M、0.8M にしてタンパク質溶液を調製しソーキングを行った。

### ・ソーキング

結晶が確認できた well の流動パラフィン 5 $\mu$ L、well 内のタンパク質溶液 3 $\mu$ L をそれぞれマイクロピペットで吸い上げた後、素早くソーキング用のタンパク質溶液を 3 $\mu$ L 入れ well 内に残ったタンパク質溶液と、ピペッティングで混合し流動パラフィン 5 $\mu$ L で蓋をしてから、20°C でインキュベートした。

### ・X線回折

適当な大きさのループで結晶をすくい、グリセリン緩衝溶液 30%(v/v)の抗凍結剤にくぐらせてから液体窒素で凍結し、X 線回折実験を行い、データ処理は XDS で行った。

### ・解析

CCP4i と Phenix、COOT を用いて解析を行った。

## 3 結果および考察

Lysozyme-NAG2 の複合体の結晶化が確認され、ソーキング後に X 線回折を行った。

表 1 : データ処理、解析統計表

	pH4.5	pD4.5	pH7.0	pD7.0
Resolution(Å)	1.48	1.39	1.82	1.41
Water	60	123	94	95
R-work	0.299	0.232	0.192	0.223
R-free	0.315	0.269	0.240	0.234
Bonds	0.004	0.008	0.012	0.005
Angles	0.92	1.11	1.31	0.87

pH4.5、pD4.5、pH7.0、pD7.0それぞれ X 線構造解析を行った。構造解析によって各条件で構造に相違点はほとんどなかった。

結晶の状態が良く中性条件である、pD7.0 でソーキングを行った結晶の構造解析の結果で考察した。

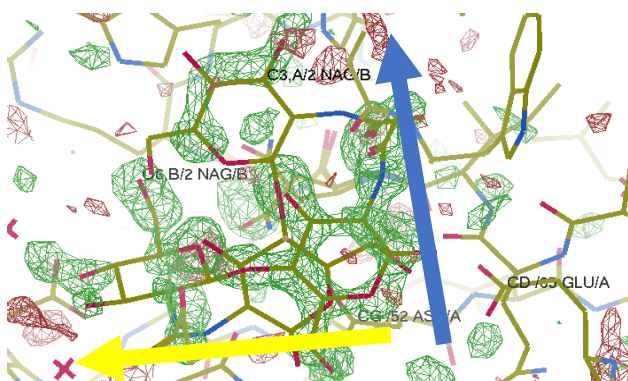


図 1 : Lysozyme-NAG2 complex, pD7.0 活性部位

青矢印方向と黄矢印方向に NAG2 が配向している様子が確認できた。青矢印方向を A conformation(A conf)、黄矢印方向を B conformation(B conf)とする。B conf の NAG2 は A conf の NAG2 よりも占有率が高く安定的な構造であることがわかる。実際に青矢印方向の NAG2 よりも黄矢印方向の NAG2 の側鎖が周囲のアミノ酸残基との距離が近く、水素結合を成すと考えられる原子が多くあった。

NAG2 の-1 サイトとアミノ酸残基との距離が近いものを A conf と B conf に分けて示す。

表 2 : A conf の NAG2 とアミノ酸残基の距離

A conf		
NAG (-1 site)	アミノ酸残基	Distance(Å)
O6	OE1/Glu35	2.88

表 3 : B conf の NAG2 とアミノ酸残基の距離

B conf		
NAG (-1 site)	アミノ酸残基	Distance(Å)
O1	OE1/Glu35	2.73
N2	O/Ala107	3.00
O7	N/Asn59	3.12
O3	ND2/Asn59	3.13

特に、Glu35 との距離が近く Glu35 の水素をより安定的にしていることより、NAG2 は Lysozyme に対して阻害剤として働くと考えられる。

#### 4 まとめ

- NAG2 をリガンドに用いた共結晶化で、NAG2 が活性部位に入ることが分かった。

- NAG2 は NAG4 と同じように-1 サイトと-2 サイトに入ることが確認できたが、NAG4 とは違う方向に NAG2 が入ることも確認出でき、NAG4 の方向を決めるのは-4 サイトのアミノ酸との相互作用である。

- NAG2 を入れることでリゾチーム単体と比較すると、Glu35 付近の水の位置やアミノ酸の構造が変化した。

- 水の位置が変わると Glu35 との相互作用が変化する。

#### 参考文献

- [1] T. Chatake *et al.*, Acta Cryst. D78, 770-778 (2022).
- [2] K. Bartik *et al.*, Biophys. J. 66, 1180-1184 (1994).
- [3] Y. Yang *et al.*, Biochem. J. 87, 1003-1014 (1980).
- [4] H. Yamada *et al.*, Acta Cryst. D71, 742-753 (2015).

\*24nm905t@vc.ibaraki.ac.jp

\*ichiro.tanaka.h27@vc.ibaraki.ac.jp