

結核菌由来 Rv2613c タンパク質の Ser147Gln 変異体における結晶学的諸性質 Preliminary crystallographic analysis of Ser147Gln mutant of Rv2613c protein from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv

森茂太郎^{1*}, 和知野純一¹, 荒川宜親², 柴山恵吾¹

¹ 国立感染症研究所・細菌第二部、〒208-0011 武蔵村山市学園 4-7-1

² 名古屋大学大学院・医学系研究科、〒466-8550 名古屋市昭和区鶴舞町 65 番地

1 はじめに

これまでに、結核菌由来 Rv2613c タンパク質について詳細な機能解析を行い、本タンパク質が基質である diadenosine polyphosphate (Ap_nA) に対して加リン酸分解活性を示すヌクレオチド加リン酸分解酵素であることを明らかにした[1]。また、X 線結晶構造解析を行い、本酵素の詳細な立体構造を決定した[2,3]。その結果、Rv2613c は α/β 構造を有するとともに、特徴的な 4 量体構造を形成していることが明らかとなった。この 4 量体構造は、他の Ap_nA を基質として利用する加リン酸分解酵素や加水分解酵素には見られない Rv2613c のみの特徴であった。さらに、変異体を作製してその機能を解析した結果、この 4 量体構造が Rv2613c の基質結合部位形成に関与していることが示された[3]。

Rv2613c の立体構造と Ap_nA 加水分解酵素の立体構造を比較検討した結果、活性中心部位の構造そのものは類似しているものの、活性中心部位に存在している 3 つのアミノ酸残基 (Rv2613c では Asn-139 残基、Gly-146 残基、及び Ser-147 残基に相当) の種類が Rv2613c と Ap_nA 加水分解酵素とでは異なっていることが明らかとなった。そこで、これら 3 つのアミノ酸残基をそれぞれ置換した変異体を作成してその機能を解析した結果、Asn-139 残基は活性発現に必須であり、Gly-146 残基、並びに Ser-147 残基も活性発現に関与していることが示された。また、Gly-146 残基は Rv2613c において加リン酸分解反応を規定している重要な残基であることも示唆された。さらに速度論的解析を行った結果、Gly-146 残基と Ser-147 残基をそれぞれ置換した変異体の K_m 値はいずれも野生型の K_m 値とほぼ同じであるのに対して、変異体の V_{max} 値はいずれも野生型の V_{max} 値よりも著しく低下していることが示された。従って、Gly-146 残基と Ser-147 残基は、基質結合よりも触媒反応に関与していることが示唆された[3]。

そこで、さらに詳細に Ser-147 残基と活性との関連性を明らかにするために、Ser-147 残基を Gln 残基に置換した変異体 (Ser147Gln) を作成し、機能と構造の解析を試みた。

2 実験

Ser147Gln 変異体を市販のキットを用いて作製し、大腸菌内で大量発現させた後、SDS-PAGE 上で単一

バンドになるまで精製を行った。精製した Ser147Gln 変異体を用いて、蒸気拡散法により結晶化を行った。結晶化条件は、市販の結晶化スクリーニングキットを用いて決定した。

3 結果および考察

決定した結晶化条件 (0.1M カコジル酸ナトリウム, pH 6.3, 0.2 M 硫酸リチウム, 及び 28.5% ポリエチレングリコール 400) は野生型の結晶化条件[2]とほぼ同じであった。20°C において約 2 週間で最大辺の長さが約 0.3 mm の X 線測定に適した結晶が得られた。この結晶を用いて BL-NW12A で測定を行い、回折データの収集を行った。HKL2000 を用いて回折データの解析を行った結果、本結晶は Ser147Gln 変異体の立体構造決定に適した結晶であることが示された (Table 1)。現在は、野生型の構造をテンプレートに用いた分子置換法により、Ser147Gln 変異体の立体構造の決定を進めている。

Table 1 Ser147Gln 変異体の結晶学的諸性質 (括弧内の値は最終分解能シェルに対する値)

X 線源	Photon Factory
ビームライン	BL-NW12A
振り角 (°)	1
露光時間 (s)	2
波長 (Å)	1.0000
温度 (K)	100
空間群	C2
格子定数	
(Å)	$a = 101.0, b = 63.6, c = 79.0$
(°)	$\beta = 111.0$
分解能範囲 (Å)	50.0 – 2.80 (2.85 – 2.80)
独立した反射数	11269 (518)
平均冗長度	7.0 (3.4)
完全性 (%)	96.1 (87.4)
平均 $I/\sigma(I)$	21.3 (4.9)
$R_{merge}^{\#}$	0.074 (0.190)

$$^{\#}R_{merge} = \frac{\sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle|}{\sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)}$$

参考文献

- [1] S. Mori *et al.*, Protein. Expr. Purif. **69** (2010) 99-105.
[2] S. Mori *et al.*, Acta Crystallogr. **F66** (2010) 279-281.
[3] S. Mori *et al.*, J. Mol. Biol. **410** (2011) 93-104.

* mshige@nih.go.jp