

好冷化変異体ウリカーゼの予備的 X 線結晶構造解析 Preliminary X-ray Crystallization of Psychrophilic Mutant of Uricase

日 弁隆雄^{1*}, 伊藤貴文¹, 西矢芳昭²

¹ 福井県立大学生物資源学部、〒910-1195 福井県吉田郡永平寺町松岡兼定島 4-1-1

² 摂南大学理工学部 〒572-8508 大阪府寝屋川市池田中町 17-8

1 はじめに

好冷性酵素は、一般に 15-20°C 以下の温度領域で高い活性を示す酵素を指し、様々な分野での産業応用が期待される[1]。一般に、好冷性生物由来の酵素は不安定であり、これまで遺伝子工学的な手法による好冷性酵素の熱安定性化[2]や耐熱性酵素の低温適応化が検討されたが、50°C 以上での高い熱安定性を持ち、且つ 20°C 以下で十分高い活性を示す変異体酵素は得られていなかった。活性化エンタルピーが小さいという好冷性酵素の特徴は、遷移状態の安定化に寄与するタンパク質構造の柔軟性の増大としてしばしば説明され、それ故熱安定性が犠牲にされると解釈されてきた[3]が、耐熱性酵素と好冷性酵素の構造上の違いについて決定的な要素は未だ知られていない。また、酵素の不安定性と低温活性の間で厳密な直線的関係は成立せず[4]、高い安定性と低温活性の両立が可能かどうかは未解決であった。

我々は、*Bacillus* sp. 由来尿酸酸化酵素(bUOD)のインターフェースループ II (277-300) に着目し、その結晶構造に基づいてアミノ酸 2 残基を選択的に改変することで、至適温度 45°C の野性型酵素に対して至適温度が 30°C に大きく低下した変異体酵素 W279L+P287G を得た[5]。本変異体は、野性型酵素と同様 65°C 近傍まで熱安定性を保つことも CD 測定などから示された。その好冷化の分子基盤を明らかにするため、X 線結晶構造解析に取り組んでいる。今回は予備的測定の結果について報告する。

2 実験

結晶化は、ハンギングドロップ蒸気拡散法を用い、20°C で行った。リザーバーの初期溶液組成は、15%(w/v) PEG8000, 0.1 M Tris-HCl pH 8.0, 1 mM 9-methyluric acid, 0.04 M Na₂SO₄ とした。

X 線回折強度測定は SPring-8 ビームライン BL26B1 で行った。結晶は、10% PEG400 をリザーバー液に添加したクライオ溶液に浸した後、100K 窒素ガス雰囲気下で凍結させて測定に供した。

3 結果および考察

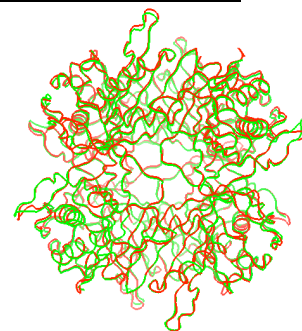
得られた 2.6Å 分解能回折強度データセットの統計値を表 1 に示した。野性型酵素の構造(1j2g)を用いた分子置換法により初期位相を求めた。精密化は ccp4 を用い、精密化の結果 $R = 0.19$ $R_{\text{free}} = 0.25$ の構造モデルを得た。本モデルは野性型酵素と比較した

場合、主鎖間の RMSD は 0.48 Å であり (図 1)、顕著な構造変化はインターフェースループ II 間のみ認められた。さらに高分解能データを得るため、結晶化温度など諸条件の検討を続行している。

表 1 : 回折強度データ収集の統計値

Space group	$P2_12_12$
Dimensions [Å]	$a = 132.34, b = 142.24, c = 70.56$
Resolution	2.6 Å
Total No. of reflections	202,023
No. of unique reflections	41,095
Completeness [%]	97.9 (98.9)
R_{merge}	0.104 (0.377)
$\langle I/\sigma \rangle$	17.3 (3.7)

図 1 : W297L+P287G 変異体(緑)と野性型(赤)との立体構造比較 (主鎖 C α 原子リボンモデルの重ね合わせ)



謝辞

今回の測定の機会をご提供していただいた SPring8/JASRI スタッフの皆様には厚く御礼を申し上げます。また、震災による復旧作業で忙しいに関わらず、尽力していただいた PF スタッフにも心より感謝申し上げます。

参考文献

- [1] Fller & Gerday (2003) *Nature Reviews*, **1**, 200-8; Yamagishi (2006) *Netsu Sokutei*, **33**, 2-9
- [2] D'Amico *et al.* (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 25791-6.
- [3] D'Amico *et al.* (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 7891-6; Cavicchioli *et al.* (2006) *Methods Microbiol.*, **35**, 395-436.
- [4] Wintrode *et al.* (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 31635-40.
- [5] Nishiya & Hibi (2010) 日本農芸化学会大会講演要旨集, 167.

* hibi@fpu.ac.jp