

ヤムイモ貯蔵タンパク質 Dioscorin の X 線結晶構造解析 X-ray Crystallography of Yam Storage Protein Dioscorin

薛友林¹, 宮川拓也¹, 澤野頼子¹, 秦野賢一², 田之倉 優^{1,*}

¹ 東京大学大学院農学生命科学研究科, 〒113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1

² 群馬大学工学部, 〒376-8515 群馬県桐生市天神町 1-5-1

You-Lin Xue¹, Takuya Miyakawa¹, Yoriko Sawano¹, Ken-ichi Hatano² and Masaru Tanokura^{1,*}

¹ Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, 1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan

² Faculty of Engineering, Gunma University, 1-5-1 Tenjin, Kiryu, Gunma 376-8515, Japan

1 はじめに

ヤムイモ (*Dioscorea* sp.) に含まれる全タンパク質の 85% を占めているのが、dioscorin と呼ばれる貯蔵タンパク質である。我々はこれまでに、*Dioscorea japonica* から dioscorin の 4 種類のアイソフォームを同定し、それらが糖鎖修飾を受けていることを明らかにした[1]。 *D. japonica* 由来の dioscorin はそのアイソフォームの種類によらず、トリプシン阻害活性、炭酸脱水素酵素 (carbonic anhydrase, CA) 活性、デヒドロアスコルビン酸 (dehydroascorbate, DHA) 還元活性などの複数の生化学的な活性を有しており、CA 活性及び DHA 還元活性は、dioscorin の糖鎖修飾により増強されることも示されている[1]。また、Dioscorin はマクロファージを活性化し免疫調節作用を示すことも報告されている。Dioscorin のアミノ酸配列からは、dioscorin が各活性に対応した複数のドメインにより構成されている可能性は示唆されておらず、dioscorin の多機能性の理解には立体構造の取得が不可欠である。本研究では、dioscorin の各活性を担う機能部位の同定、各活性の構造基盤及び酵素反応メカニズムの解明を目指し、Photon Factory のビームラインを利用して dioscorin の X 線結晶構造解析を実施した。

2 実験

D. japonica からクローニングした dioscorin アイソフォーム 4 (dioscorin-4) を pET28a ベクターに挿入し、大腸菌 Rosetta(DE3) でタンパク質発現を行った。His タグを利用した Ni アフィニティー精製後に thrombin を用いて His タグを除去し、さらにイオン交換カラムに供することで、dioscorin-4 を SDS-PAGE 上でほぼ単一にまで精製した。20 mg/ml に濃縮した dioscorin-4 について結晶化スクリーニングを行い、最終的に 0.1 M CAPS (pH 10), 0.2 M lithium sulfate, 1.8 M ammonium sulfate を沈殿剤溶液として 5°C で蒸気拡散法により結晶化した。30% ethylene glycol を含む抗凍結剤を用いて結晶を液体窒素下で凍結し、PF AR-NW12 ビームラインにおいて X 線回折実験を行い、XDS で X 線回折データを処理した。

3 結果および考察

波長 1.0000 Å、露光時間 2 秒で分解能 2.11 Å の X 線回折データを取得した (図 1)。空間群は C222₁ で、格子定数は $a = 83.5$ Å, $b = 156.8$ Å, $c = 83.6$ Å であった[2]。 *Neisseria gonorrhoeae* 由来炭酸脱水素酵素の結晶構造 (PDB id: 1KOP, 相同性 32%) を鋳型として MOLREP を用いて分子置換を行い、dioscorin-4 の結晶構造を決定した。非対称単位中に 2 分子の dioscorin-4 が観測され、この結晶構造から dioscorin-4 は単一のドメイン構造であることが示された。さらに、典型的な炭酸脱水素酵素の構造と比較し、触媒部位を構成するアミノ酸残基が異なることが明らかになった。

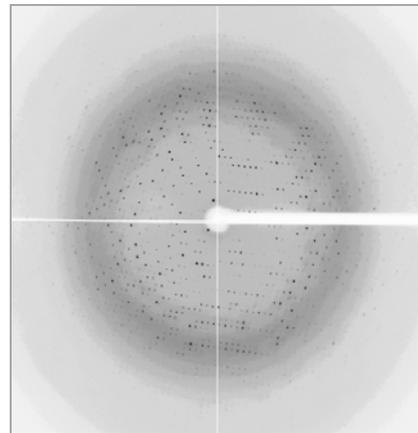


図 1 : Dioscorin の X 線回折像

4 まとめ

Dioscorin-4 の結晶構造を分解能 2.11 Å で決定したことにより、dioscorin の多機能性を説明する構造基盤の解明が進むものと期待される。

参考文献

- [1] Y.L. Xue *et al.*, *Plant Sci.* **183**, 14-19 (2012).
[2] Y.L. Xue *et al.*, *Acta Crystallog. Sect F*, **68**, 193-195 (2012).

* amtanok@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp