

SMP30 の生理学的機能解明に向けた構造解析

X-ray crystal structure determination of SMP30 for its physiological function analysis

原田彩佳¹、相澤真悟²、千田美紀¹、丸山直記²、石神昭人²、千田俊哉^{1,*}、¹放射光科学研究施設, 〒305-0801 つくば市大穂 1-1²東京都健康長寿医療センター研究所, 〒173-0015 東京都板橋区栄町 35-2Ayaka Harada¹, Shingo Aizawa², Miki Senda¹, Naoki Maruyama², Akihito Ishigami², Toshiya Senda¹¹Photon Factory, Tsukuba 305-0801, Japan²TMIG, 35-2 Sakaemachi, Itabashi-ku, Tokyo 173-0015, Japan

1 はじめに

加齢指標タンパク質 30 (SMP30) は加齢ともないう減少する分子量約 3 万のタンパク質として、ラットの肝臓から発見された。これまでの研究により、SMP30 はグルコノラクトナーゼ(GNL; EC 3.1.1.17)活性を持つことが示されており、生物学的及び生化学的解析の結果から SMP30 はマウス体内では、アスコルビン酸 (ビタミン C) の生合成経路に含まれる L-グルロン酸を環化し γ -ラクトン環を形成する反応を触媒することが報告されている(Figure 1)。しかし、SMP30 とその基質との複合体の構造は解明されておらず、 γ -ラクトン環が形成されるメカニズムは謎のままであった。そのため我々は、マウス由来の SMP30 と基質類似体・生成物類似体との複合体の結晶構造を決定することで SMP30 の触媒反応機構についての知見を得るために研究を進めている。

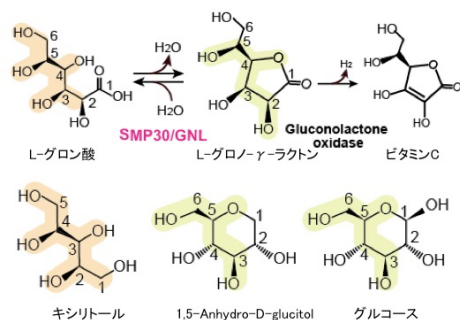


Figure 1. Structure of substrate analogues

2 実験

マウス SMP30 結晶を基質類似体であるキシリトール、生成物類似体である 1,5-anhydro-D-glucitol (1,5-AG)、グルコースにソーキングすることで複合体結晶を作製した。X 線回折強度データの収集は、Photon Factory の構造生物学ビームライン(BL5A, BL-17A, PF-AR NE3A)を利用して行った。2010 年にヒト SMP30 の結晶構造 (PDB ID: 3G4E, 3G4H) が決定されていたため、マウス SMP30 の結晶構造は 3G4E をモデルとして用いた分子置換法により決定

した。また、構造精密化は phenix.refine を用いて行った。現在までに、マウス SMP30 については基質フリー型、1,5-AG 結合型、グルコース結合型、キシリトール結合型、ヒト SMP30 については基質フリー型、1,5-AG 複合体の結晶構造を決定した(Table 1)。

3 結果

マウス SMP30 とヒト SMP30 の結晶構造解析の結果、どちらも β -プロペラ構造の中心には二価イオンが存在していることが明らかになった。マウス SMP30 については、基質類似体として用いたキシリトールが二価イオンや触媒残基と相互作用することで環状に近い状態で活性中心に結合していた。さらに、他の類縁酵素にはみられない基質ポケットを覆うループ構造 (Lid loop) の存在が明らかとなり、このループ構造は基質が鎖状になることを阻害し環化を促進する役割を果たしていると考えられた。また、マウス SMP30 とヒト SMP30 の結晶構造を比較した結果、基質結合ポケットを覆っている loop 領域 (lid loop) の開閉状態に違いがあり、マウス SMP30 の活性中心は L-グルロン酸を環化し γ -ラクトン環を形成する触媒反応を促進させるために適した構造を持つことが明らかになった(Figure 2)。

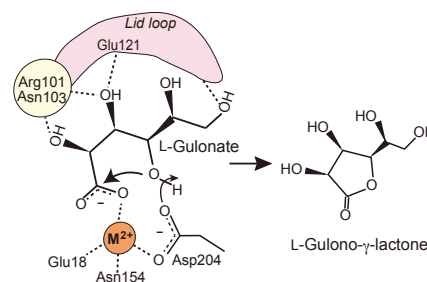


Figure 2. Catalytic reaction of SMP30

Reference

S. Aizawa *et al.*, *PLOS ONE*8(1): e53706. doi:10.1371/journal.pone.0053706 (2013).

Table 1 Crystallographic summary

Species	Mouse	Mouse	Mouse	Mouse
Bound compound	Substrate free	1,5-AG	Glucose	Xylitol
Data collection				
Light source	PF BL-17A	PF BL-17A	PF-AR NE-3A	PF BL-17A
Space group	$P3_12 1$	$P3_12 1$	$P3_12 1$	$P3_12 1$
Cell dimensions (Å)				
<i>a</i>	102.68,	102.59,	101.86	101.97
<i>b</i>	102.68,	102.59,	101.86	101.97
<i>c</i>	147.82,	149.71,	146.83	147.55
α, β, γ (°)	90, 90, 120	90, 90, 120	90, 90, 120	90, 90, 120
Resolution (Å)	76.2-1.95	76.4-1.70	75.62-2.00	56.62-1.85
Highest resolution shell	2.06-1.95	1.79-1.70	2.11-2.00	1.95-1.85
R_{merge}	0.050 (0.445)	0.042 (0.494)	0.076 (0.643)	0.046 (0.475)
I / σ	31.34 (6.61)	37.56 (6.75)	23.0 (3.96)	34.07 (5.97)
Completeness (%)	100.0 (100.0)	99.9 (100.0)	99.9 (100.0)	99.9 (100.0)
Redundancy	10.9 (11.1)	10.8 (11.0)	7.3 (7.4)	10.8 (11.0)
Refinement				
Resolution (Å)	51.34-1.95	49.90-1.70	75.62-2.00	56.62-1.85
No. reflections	66221	100500	60052	76106
R_{work}	0.1852	0.1705	0.1759	0.1657
R_{free}	0.2153	0.1895	0.2076	0.1845
No. atoms				
Protein	4638	4724	4680	4688
Ligand/ion	0/67	101/67	96/32	20/26
Water	373	470	334	403
<i>B</i> -factors (Å ²)				
Protein	31.6	22.4	31.3	28.0
Ligand/ion	-/47.3	32.6/36.6	48.9/46.2	41.0/43.1
Water	36.1	32.0	35.9	34.4
Rms deviations				
Bond lengths (Å)	0.007	0.007	0.014	0.006
Bond angles (deg)	1.169	1.166	1.228	1.141
PDB ID	4GN7	4GN8	4GN9	4GNA

Species	Human	Human
Bound compound	Substrate free	1,5-AG
Data collection		
Light source	PF BL-5A	PF BL-17A
Space group	$P2_1$	$P2_1$
Cell dimensions (Å)		
<i>a</i>	64.50,	64.41,
<i>b</i>	50.79,	50.20,
<i>c</i>	86.56	86.57,
α, β, γ (°)	90, 100.24, 90	90, 99.65, 90
Resolution (Å)	20.0-1.50	50.0-1.75
Highest resolution shell	1.58-1.50	1.81-1.75
R_{merge}	0.045 (0.530)	0.058 (0.375)
I / σ	24.09 (3.59)	19.48 (2.24)
Completeness (%)	98.3 (96.0)	99.3 (97.2)
Redundancy	5.3 (4.9)	4.6 (3.8)
Refinement		
Resolution (Å)	19.53-1.50	47.29-1.75
No. reflections	86999	54737
R_{work}	0.1893	0.1951
R_{free}	0.2181	0.2300
No. atoms		
Protein	4613	4535
Ligand/ion	0/3	55/2
Water	391	159
<i>B</i> -factors (Å ²)		
Protein	15.6	24.485
Ligand/ion	-/13.4	30.249/20.420
Water	24.7	26.268
Rms deviations		
Bond lengths (Å)	0.007	0.011
Bond angles (deg)	1.144	1.139
PDB ID	4GNB	4GNC