

核磁気共鳴法と X 線結晶構造解析の融合による
リン酸基転移酵素の動的立体構造解析Analysis of the dynamic structures of kinase by a concerted use of
NMR and X-ray crystallography竹内 恒^{1,*}, 羅 羽華², 千田 美紀², 千田 俊哉²¹産業技術総合研究所, 〒135-0063 東京都江東区青海 2-23-26²高エネ機構, 〒305-0801 茨城県つくば市大穂 1-1Koh Takeuchi^{1,*}, YuHua Lo², Miki Senda², Toshiya Senda²¹AIST, 2-3-26 Aomi, Koto, Tokyo 135-0063, Japan²KEK, 1-1 Oho, Tsukuba, 305-0801, Japan

1 はじめに

PI5P4K β は、インスリンシグナル伝達において重要な役割を果たす代謝制御タンパク質である[1]。研究代表者と協力者は、PI5P4K β が細胞のがん化を促進する因子であること、PI5P4K β が GTP を補酵素として用いる特異な特徴を有することを見出し、細胞内の GTP 濃度が PI5P4K β を介してインスリンシグナルや細胞増殖を制御する新たな調節機構を提唱している。この PI5P4K β の GTP によるシグナル制御機構を立体構造に基づき理解するため、human PI5P4K β と GTP/ATP 非加水分解性アナログ (GMPPNP/AMPNP), GDP/ADP, GMP/AMP との複合体の立体構造解析を行った。

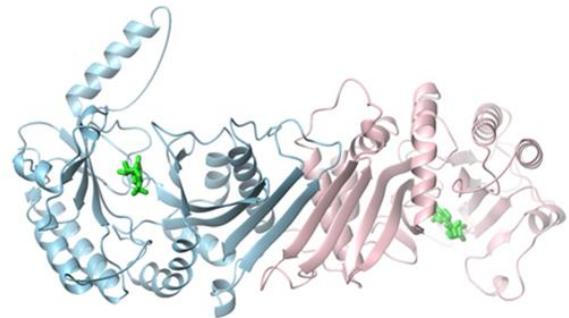
2 実験

結晶化に供する試料 (human PI5P4K β) は大腸菌において発現し、N 末端の His*6 タグを用いた精製の後、His*6 タグを酵素的に切断し、さらに Resource Q カラムによる精製を行った。その結果、高純度の human PI5P4K β 標品を調製することができた。結晶化は、PI5P4K β の apo 体の結晶化条件に基づいて行った。apo 体結晶の分解能は 2.7-3.0 Å 程度であった。また、GTP/ATP 非加水分解性アナログ (GMPPNP/AMPNP), GDP/ADP, GMP/AMP との複合体の立体構造解析のためのソーキング条件を確立し、添加剤・抗凍結剤・発現領域の再構築などによる結晶性の改良も継続して行っている。立体構造決定は PDB に登録されている類縁タンパク質を用いた分子置換法により行い、Phenix 及び Coot を使用して構造精密化とモデル構築を行った。

3 結果および考察

apo 結晶に対する補酵素のソーキング・結晶凍結条件の最適化を行った結果、apo を含むすべての条件で、2.2-2.7 Å 分解能の結晶構造を得ることに成功した (図 1)。また GXP 複合体と AXP 複合体の立体構造を比較することで、GTP 認識様式を明らかにすることが出来た。さらに提唱した GTP 認識メカニズムに基づき変異体を作成し、GTP および ATP 結合能、酵素活性を NMR 実験により解析することで、

結合部位に存在する各残基の結合活性への寄与を明らかにした。その中で、Thr201, Phe205 は GTP 結合能を選択的に減少させ、GTP 特異性を決定する責任残基であることが明らかとなった。また野生型および当該残基への変異を施した PI5P4K β を PI5P4K β ノックダウン細胞に再導入したところ、PI5P4K β の GTP 特異性が細胞増殖に寄与していることが明確となった。

図 1 : PI5P4K β -GMPPNP 複合体構造

4 まとめ

本研究により PI5P4K β のユニークな GTP 特異的認識機構が明らかとなった。結晶構造中で apo 体、PI5P4K β -GXP 複合体ともに活性中心を構成すると考えられる補酵素リン酸基周辺の複数のループが電子密度を与えず、運動性が亢進した状態にあることが示唆された。今後はこれらのループの溶液中における運動性を NMR 法により解析する予定である。

謝辞

本研究は新学術領域研究「構造細胞生物学」の助成を受けて遂行したものです。

参考文献

[1] L.E. Rameh et al., *Nature*, **390** 192, (1997)

*koh-takeuchi@aist.go.jp