

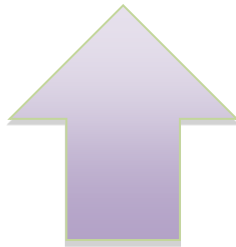
# 放射光を用いた細胞シグナリング 複合体の解析と将来展望

H22. 7. 12. PF研究会  
KEK研究本館小林ホール  
東京大学放射光連携研究機構  
分子細胞生物学研究所  
深井 周也

# 構造生物学の進展と解析対象

「細胞の形・機能・運命」を制御する因子群

微量の発現・「柔らかい」構造



細胞制御  
複合体

細胞シグナルリング  
を担うタンパク質複合体  
(受容体・アダプター・GTPase・  
エフェクター複合体など)

「細胞・生命の基礎」を構成する因子群

豊富な発現・「硬い」構造

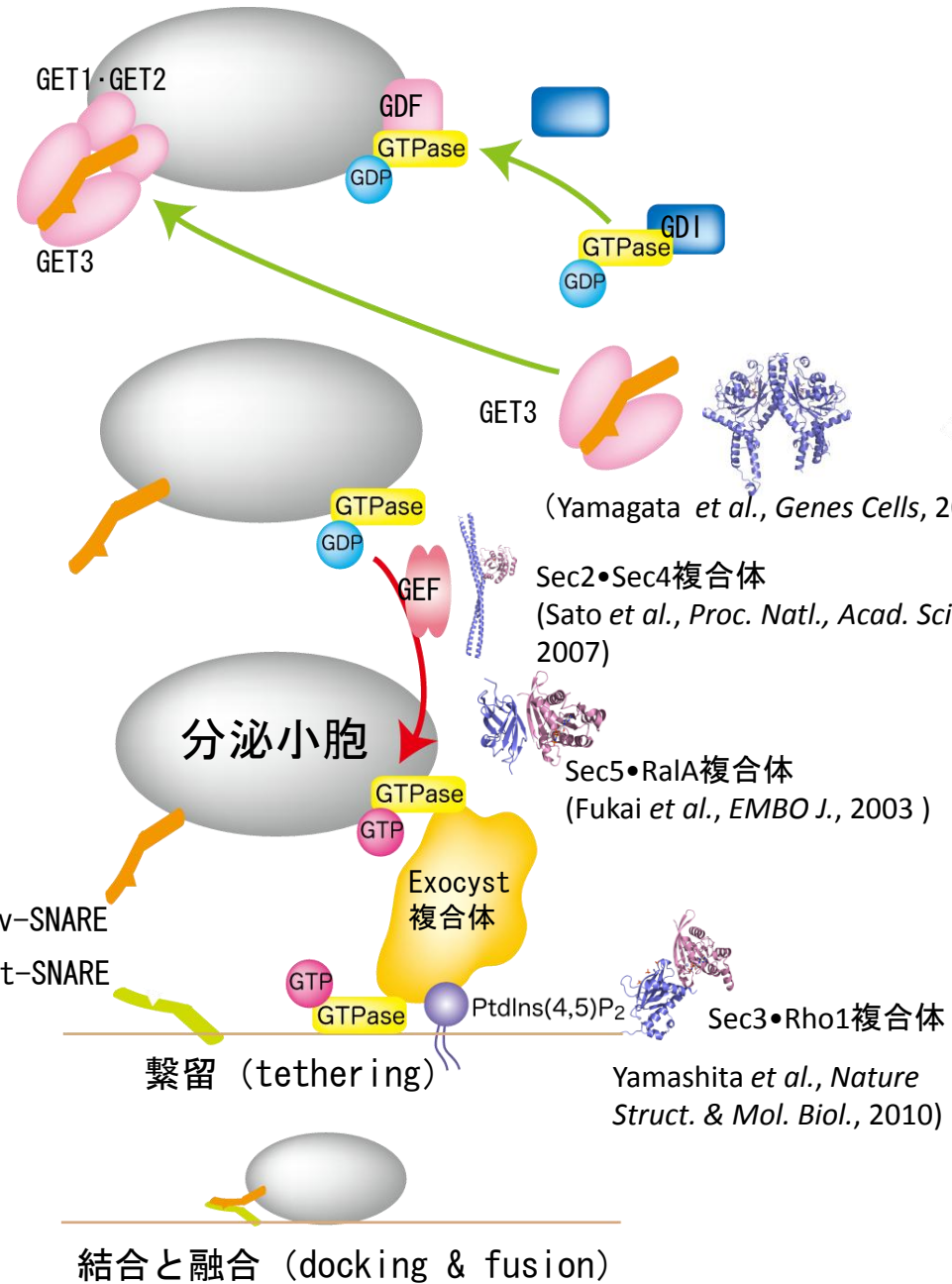
超高精度解析

活性中心の電子軌道  
(酵素・電子伝達など)  
<化学の領域>

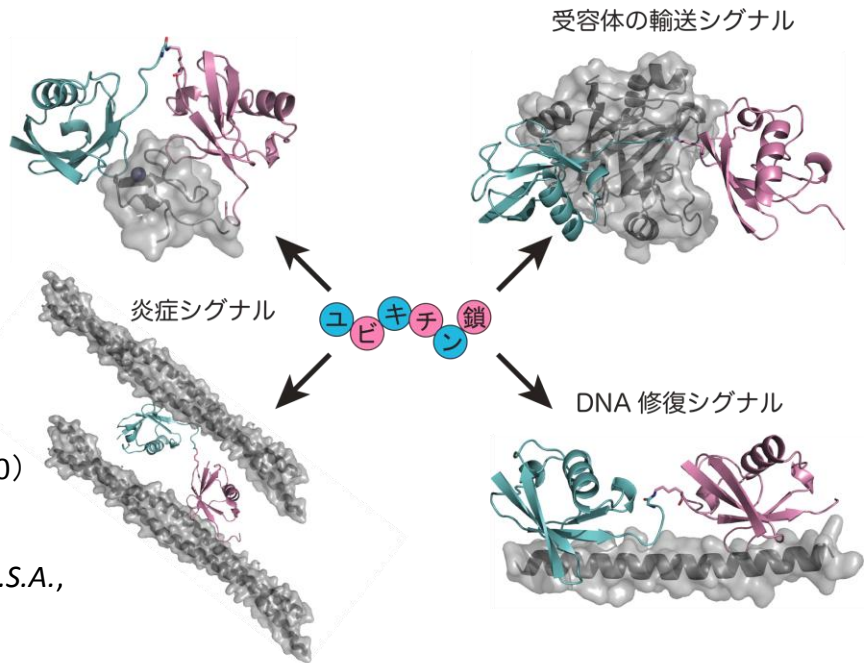
生体超分子

生体マシナリー  
(ポリメラーゼ・リボゾーム・  
ボルト・ウイルスなど)

# 1. 低分子量GTPaseによる開口放出の制御



# 2. ユビキチン鎖シグナリング



左上: TAB2•K63-Ub<sub>2</sub>複合体 (Sato et al., EMBO J., 2009a)      右上: AMSH-LP•K63-Ub<sub>2</sub>複合体 (Sato et al., Nature., 2008)

左下: NEMO•K63-Ub<sub>2</sub>複合体 (Yoshikawa et al., FEBS Lett., 2009)      右下: RAP80•K63-Ub<sub>2</sub>複合体 (Sato et al., EMBO J., 2009b)

**構造決定の方法**

SAD (autoSHARP)  
MR (MoIRep)

# 異常分散を利用した位相決定のための 測定ストラテジー

## 分解能・強度と冗長性のバランス

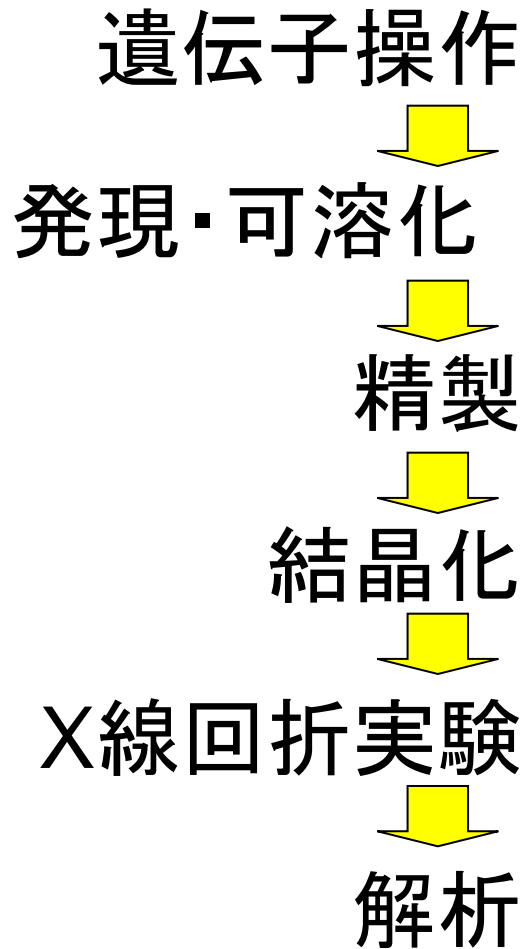
結晶学的対称性の高低に関わらず， peakの波長で $720^\circ$  ぶんの回折データを収集する。

SeやZnの位置がSHELXやSnBで決定できるまでは， peakの波長での測定に集中する（複数のpeakデータの収集）。

X線照射による損傷の度合いを $B$  factorやscale factorの変化から判断し， アッテネータや照射時間・位置の変更を検討する。  $R_{\text{sym}}$  やモザイク幅などの変化は参考にするが， 絶対的な指標とはしない。

X線照射による損傷に強く， 冗長性の高いデータ収集が可能な結晶を作る。 分解能が中程度でも冗長性が高いデータが収集できれば， 位相決定・モデル構築の希望が見いだせる。

# 結晶構造解析の流れ



試行錯誤しながら結晶解析に適するタンパク質試料を調製する。

結晶構造解析を行う上で最も困難な段階。

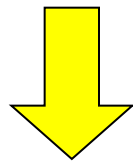
良好な回折データがあれば容易

どこかのステップで上手いかなければそこで悩むより遺伝子操作からやり直した方が早い

# 結晶構造に適したタンパク質試料

- ・「SDS-PAGEで単一バンド」
- ・「100%の活性がある」
- ・「ゲルろ過で単一ピーク」
- ・「動的な光散乱で単分散」

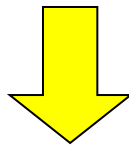
タンパク質の純度が高いことを意味する



- ・ 上の条件を満たしたとしても高分解能( $\sim 3 \text{ \AA}$ )の結晶が得られるという保証は一切無い。  
経験上一つのタンパク質の結晶構造を決定するためには15~40種類程度のコンストラクト構築が必要と言われ、そのうちのほとんどは結晶化すらしない。

# 結晶化をタンパク質全長で行う必要があるか？

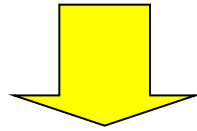
- 真核生物の場合disorder領域が大部分を含むことも多く、全長での構造決定に固執する必要は無い。
- 結晶化を行う際、タンパク質全長をターゲットにすると上手くいかないことが多い。  
(特に真核生物のタンパク質の場合は難しい)



- どのようにタンパク質を切り詰めていくかが迅速な構造決定には重要である。

# タンパク質を切り詰めるときに注意する点

- 何を知りたいかを明確にする。

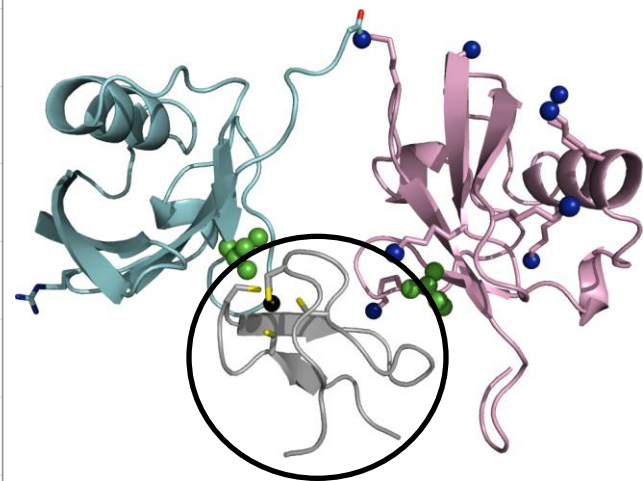
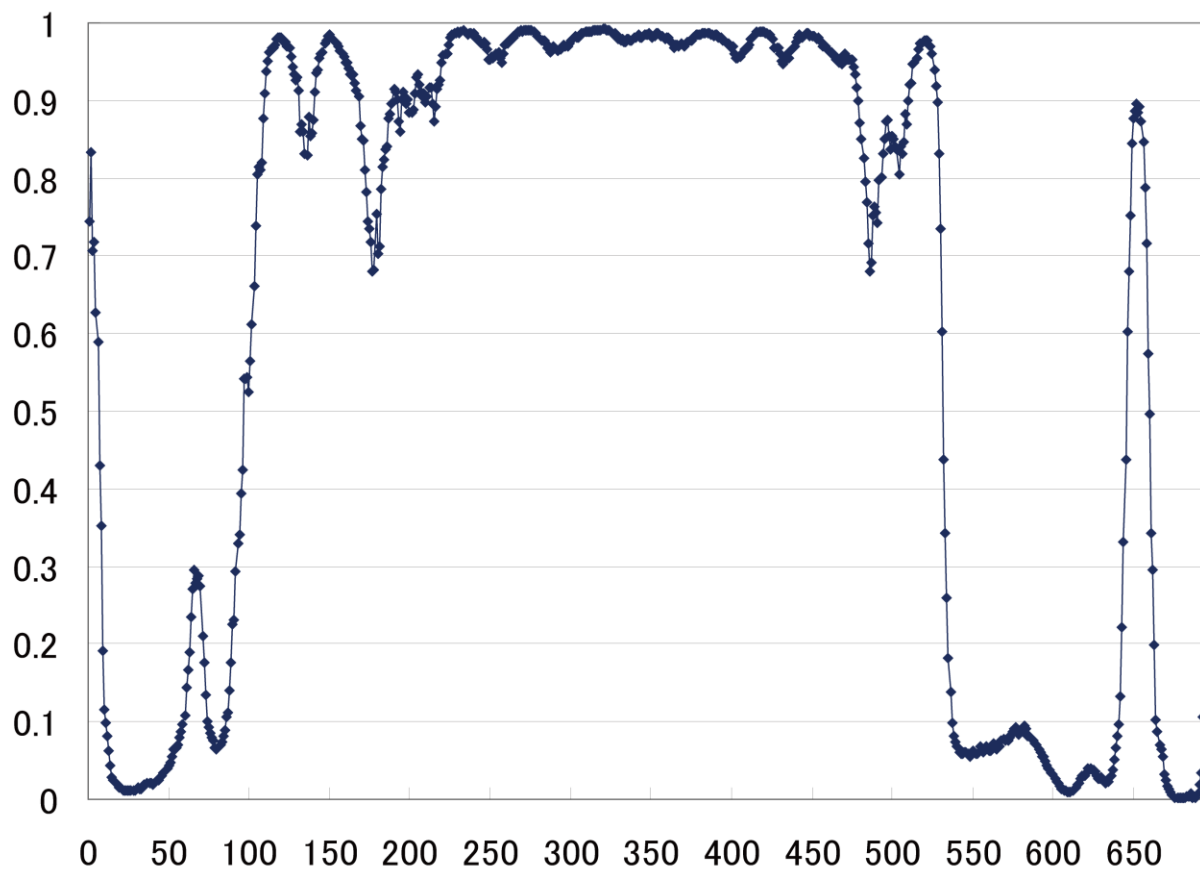


- 酵素であれば酵素活性を、受容体であれば基質との結合能を指標にし切り詰めていく。
- 全長と同等の活性が見られなくなった場合、構造決定できたとしてもそこから議論することができないため、活性は必ず確認する。



# disorder領域予測プログラムの利用

disorder領域予測プログラムを活用することで良好な結晶が得られた例。



TAB2•K63-Ub<sub>2</sub>複合体  
(PDB ID:3A9J)

結晶化成功  
結晶化失敗

# タンパク質の切り詰めを行う際のまとめ

- 機能や基質がわかっているのならば、基質との結合能や活性が損なわれない範囲で切り詰める。
- disorder予測プログラムを使えば1次配列を入力するだけで高精度な予測結果が得られる。  
(Disopred2、POODLEなど)
- disorder予測プログラムの予測結果では新規のモチーフや複合体形成による安定化などについてはミスもあるため、予測結果と生化学的な実験の両者をあわせて考え、切り詰めていく。

# 違う生物種やホモログを利用する際のまとめ

- 違う生物種やホモログのタンパク質の結晶構造から、目的タンパク質の機能についても議論できる。
- 違う生物種やホモログを利用することで発現量や性質に大幅な改善が見られることがある。
- 性質に差が見られなくても、結晶化するかどうかはやってみるまでわからないので網羅的に実験を行うことが必要。

迅速な、あるいは、強引な位相決定のために

大きくない結晶で位相決定に必要なデータを収集する

マイクロフォーカス }  
高いフラックス } 両立

精度の高いセンタリング

低いバックグラウンドの結晶マウント法

高感度の検出器

...

短時間のX線照射で十分な強度の回折像を得る