

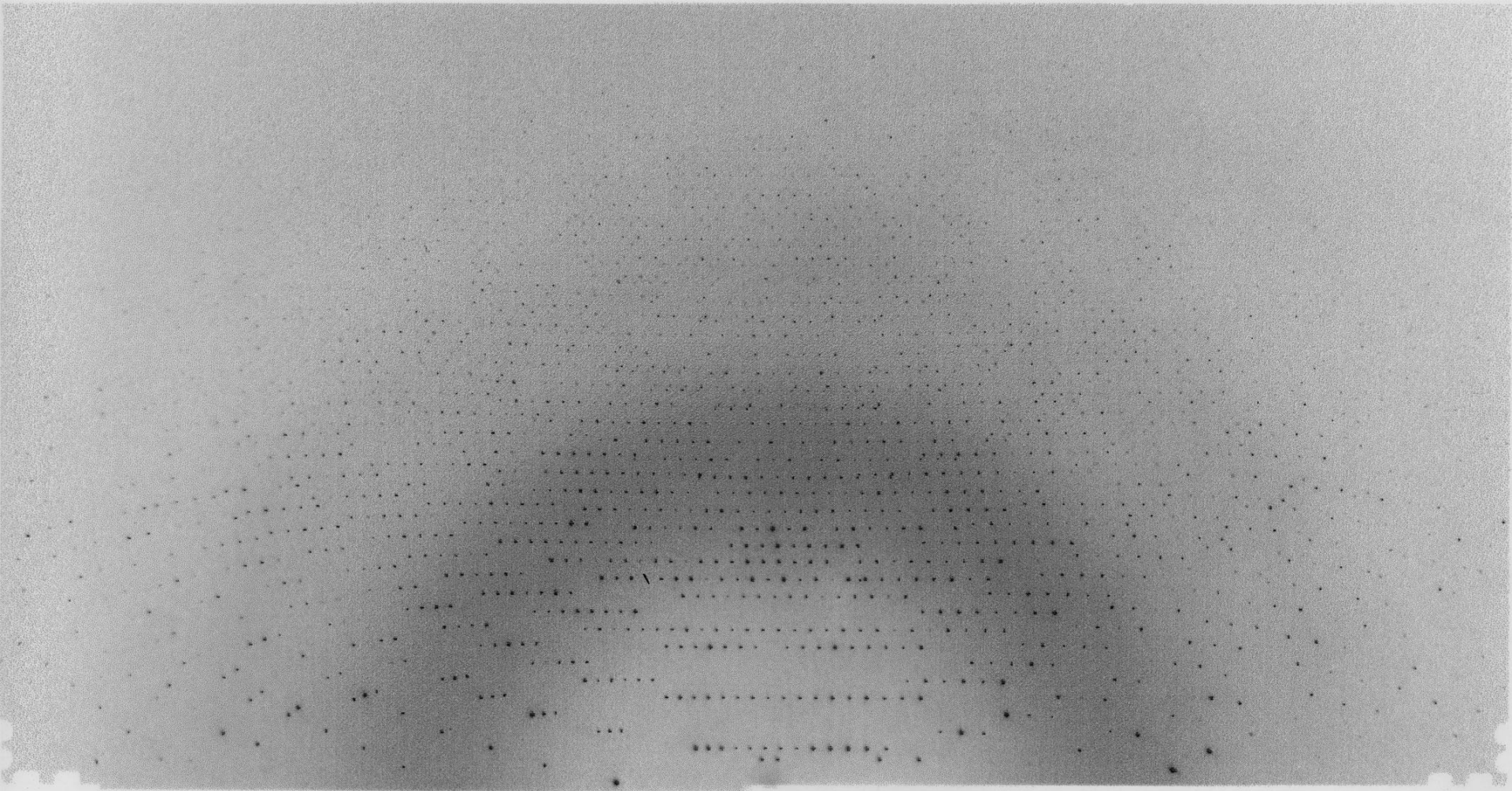
放射光を用いた有用タンパク質 の構造解析と今後への期待

田之倉 優

東京大学 大学院農学生命科学研究科

クロコウジカビ由来プロテアーゼAのX線回折像

1991年 PF BL-6Aにて

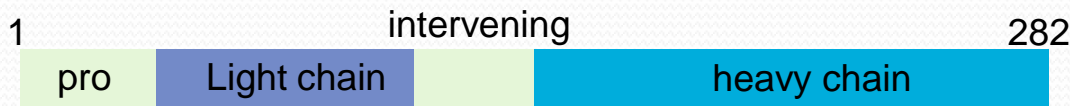


坂部式巨大分子用ワイセンベルグカメラで取得したX線回折像

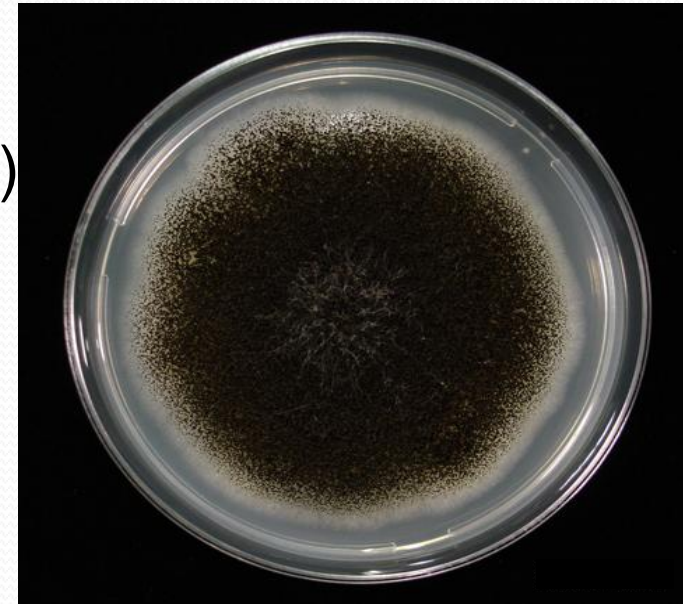
Aspergilloglutamic peptidase (AGP)



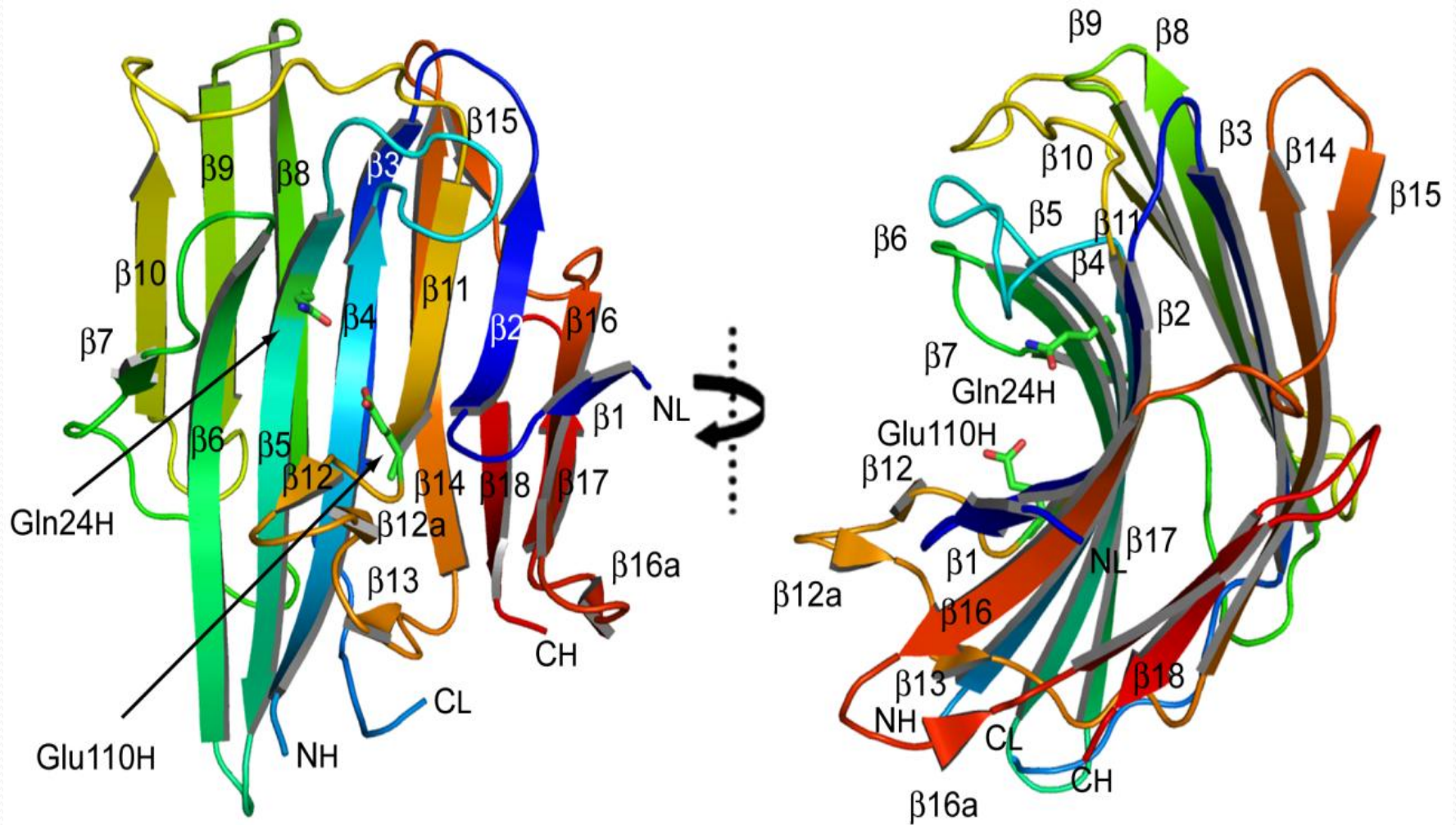
- ・ クロコウジカビ (*Aspergillus niger*) が菌体外に放出する酸性プロテアーゼ
- ・ 別名 aspergillopepsin II, *Aspergillus niger* proteinase A
- ・ 新規peptidase family G1 (Glutamic peptidase family)
MEROPS ID: G01.002
- ・ pepstatin A 非感受性
- ・ 2本鎖酵素
(light chain 39 残基, heavy chain 173 残基)



- ・ 活性部位 Gln24_H, Glu110_H,



AGPの全体構造



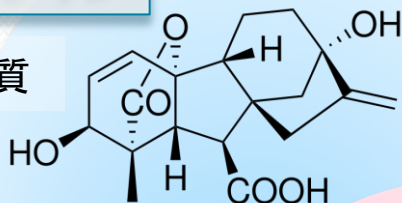
- ・ 軽鎖と重鎖が共同して2つの逆 β シートを形成し、 β サンドウイッチ構造を形成していた。
- ・ 活性部位 Gln24H と Glu110H は、くぼみの中央に位置していた。

植物ホルモン

植物体内で生産され、低濃度で植物の発生・成長・分化および恒常性を調節する有機化合物

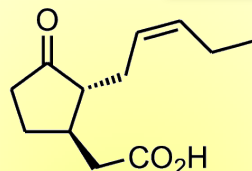
ジベレリン

GID1: F-boxタンパク質



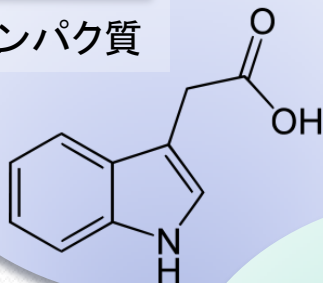
ジャスモン酸

COI1: F-boxタンパク質

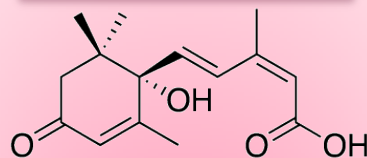


オーキシシン

TIR1: F-boxタンパク質



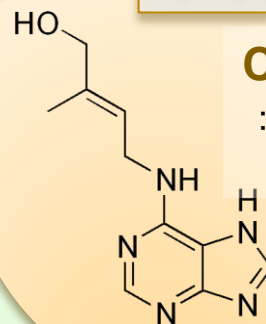
アブシシン酸



PYR/PYL/RCAR
: STARTタンパク質

サイトカイニン

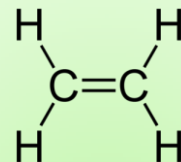
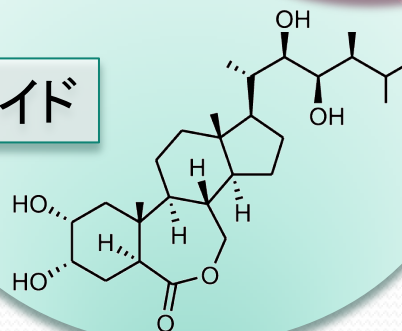
CRE1
: 膜貫通型ヒスチジンキナーゼ



ブラシノステロイド

BRI1

: Leucine-rich 受容体型
キナーゼ



ETR1

: 膜貫通型ヒスチジンキナーゼ

エチレン

ABA依存的な乾燥ストレス応答 (ABAシグナル伝達経路)

乾燥ストレス

ABA

ABA受容体

PYR/PYL/RCAR

ABA

非ストレス環境下

非ストレス環境下

タンパク質
脱リン酸化酵素

PP2C

阻害

SnRK2

阻害の解除

タンパク質
リン酸化酵素

SnRK2

リン酸化

Pi

AREB/ABF

転写制御因子

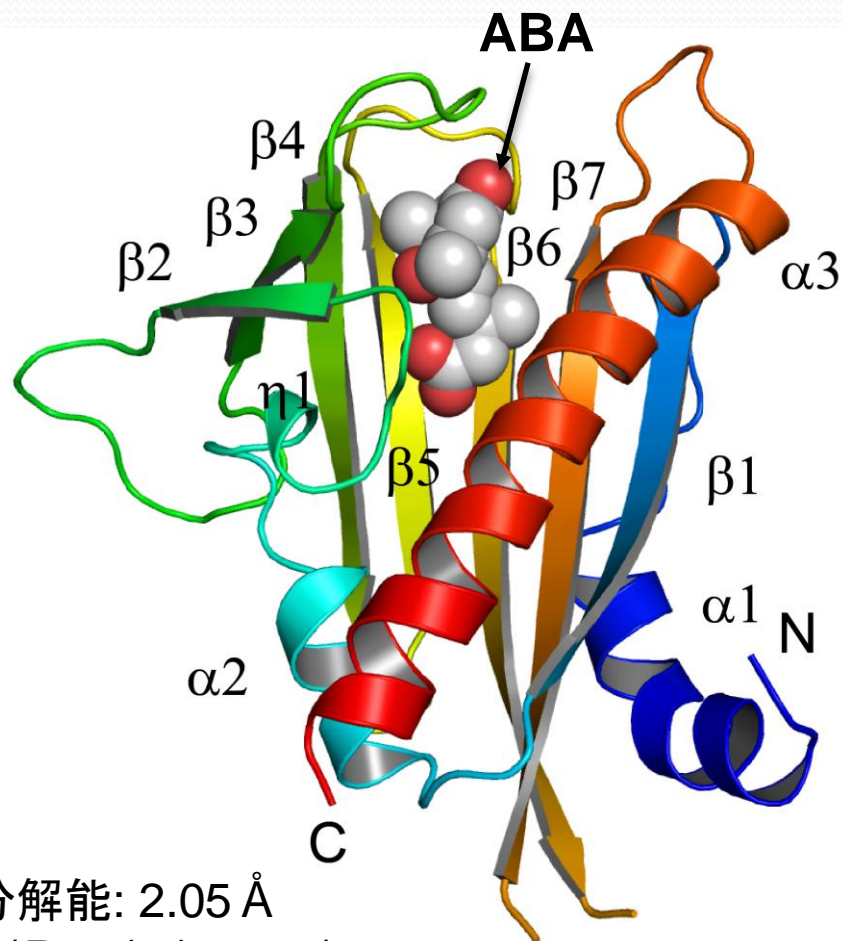
乾燥耐性付与タンパク質群の合成

乾燥ストレス応答・耐性獲得

X線結晶構造解析

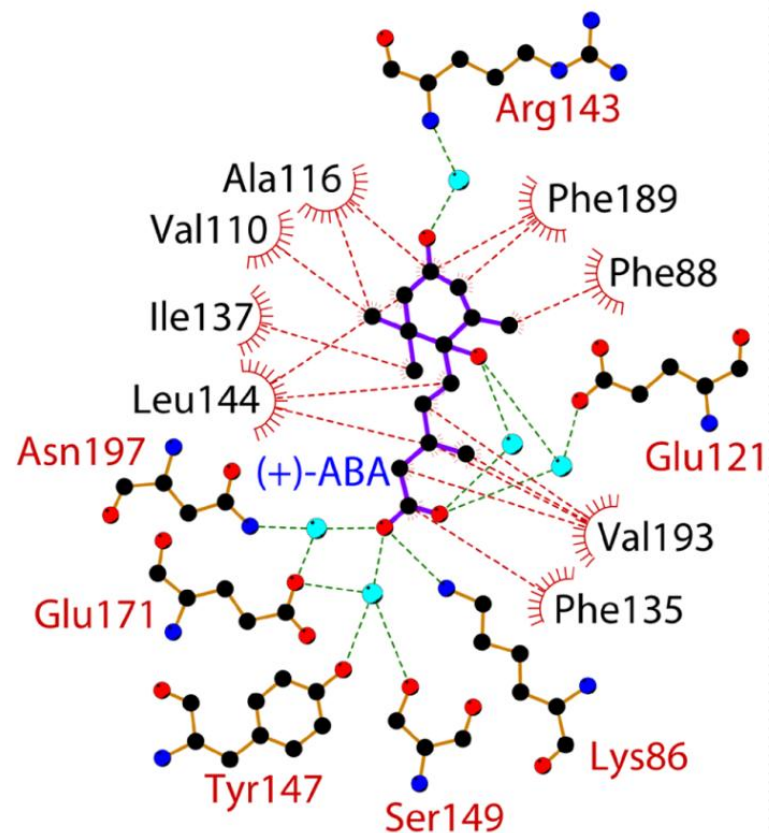
- ABA認識機構
- ABA受容による構造変化
- ABA依存的な PP2C阻害機構

ABA結合型PYL1の立体構造



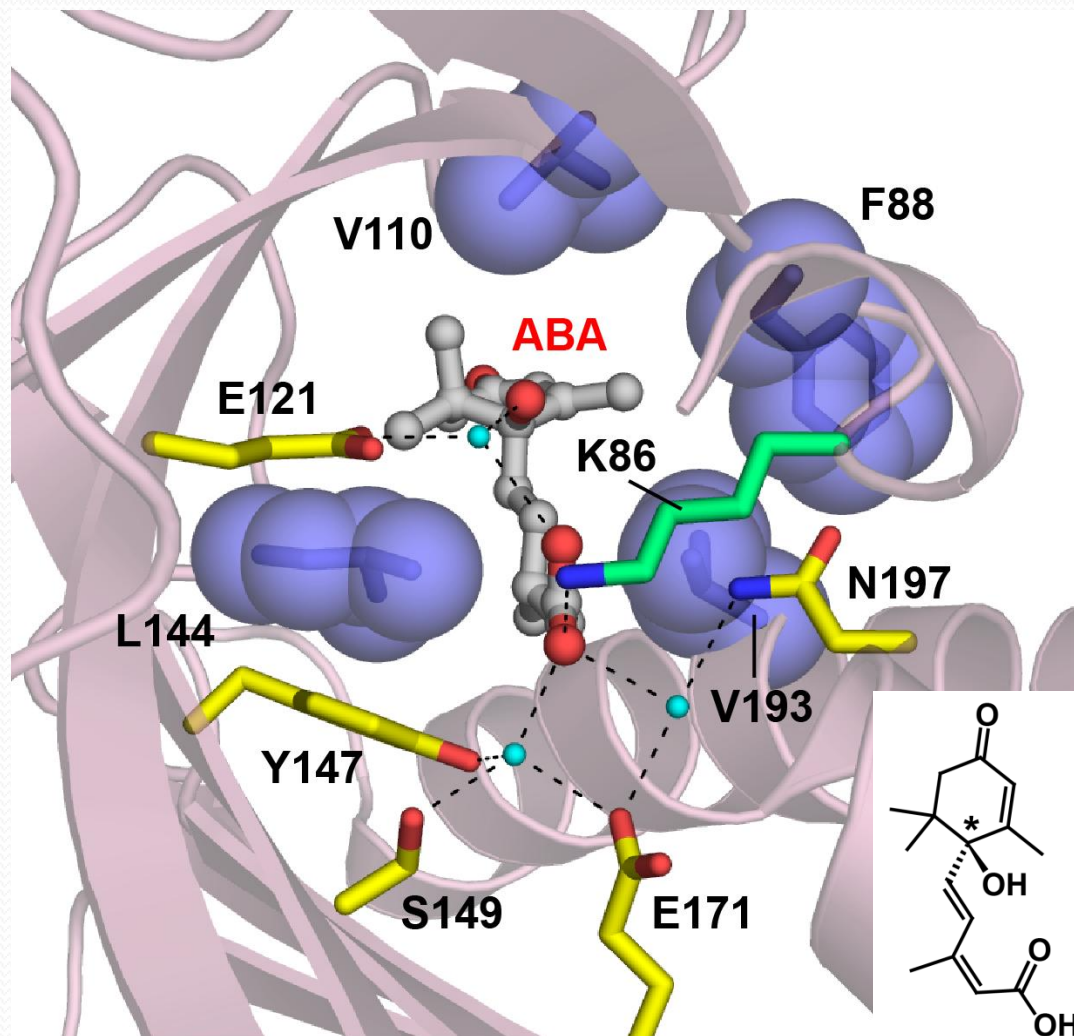
分解能: 2.05 Å

R/R_{free} (%): 19.2/22.9



ABAの認識に関わる
アミノ酸残基

(+)-ABAの立体選択的認識の構造基盤



ITCデータ

	K_D	ΔH	ΔS
WT	52	1.4	24
K86A	n.d.	n.d.	n.d.
N197A	n.d.	n.d.	n.d.
F88A	30	4.8	22
V110A	40	0.8	23
L144A	60	1.1	23
V193A	n.d.	n.d.	n.d.

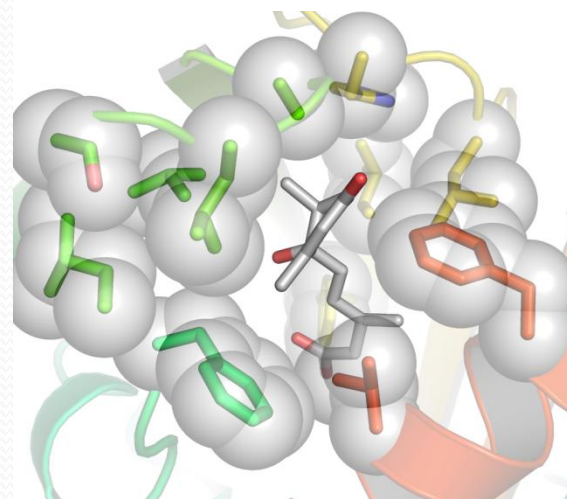
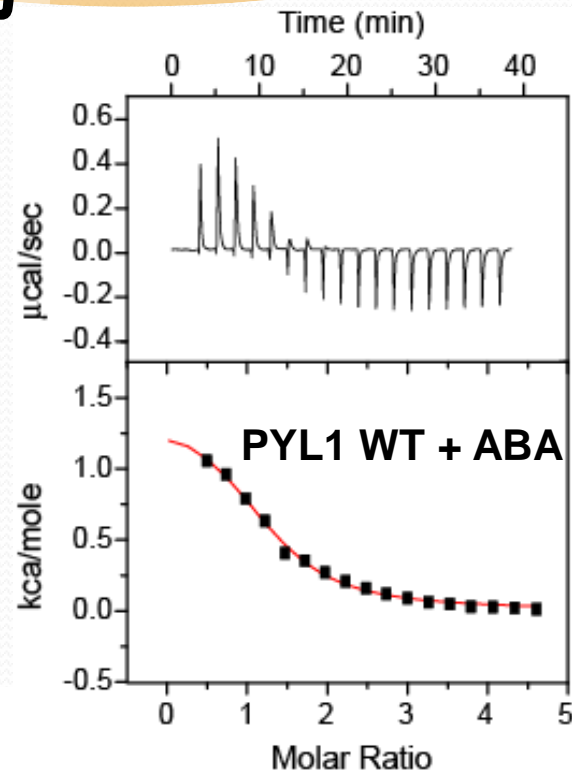
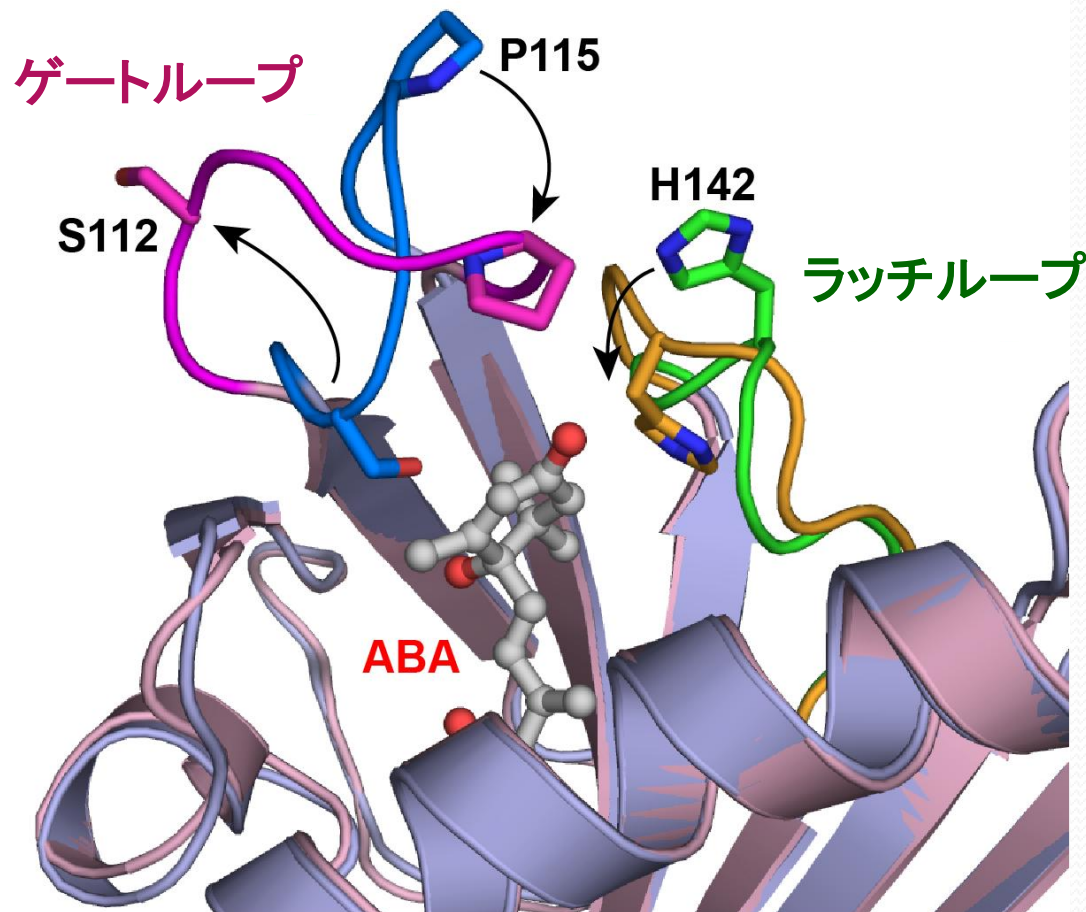
ペンタジエン酸骨格を結合して
不斉炭素原子の位置を固定する。

シクロヘキセン環周辺の疎水性残
基がメチル基の配向を制限する。

ABA結合に伴うPYL1の構造変化

開構造(アポ型) → 閉構造(ABA結合型)

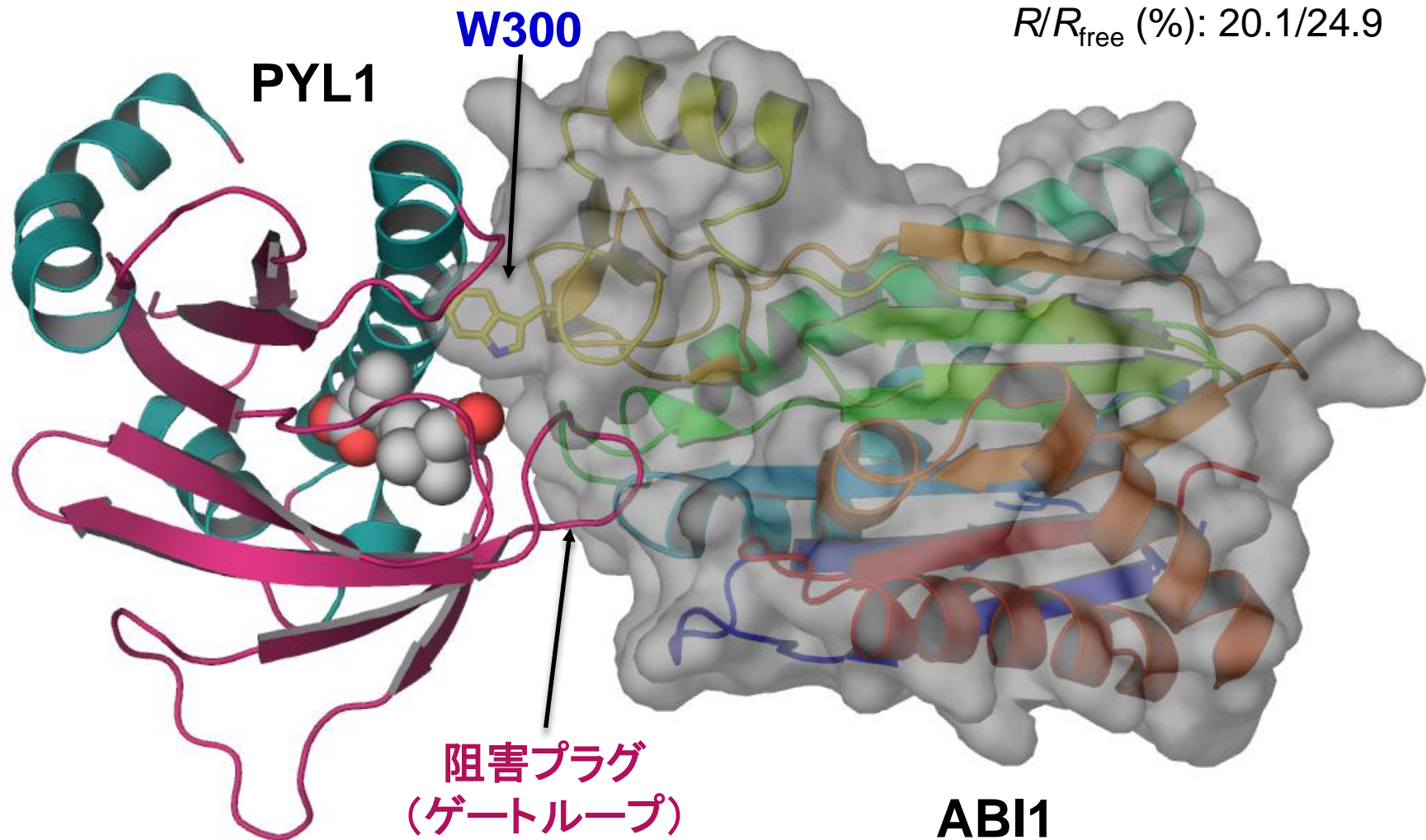
Melcher et al. (2009), PDB ID: 3KAY



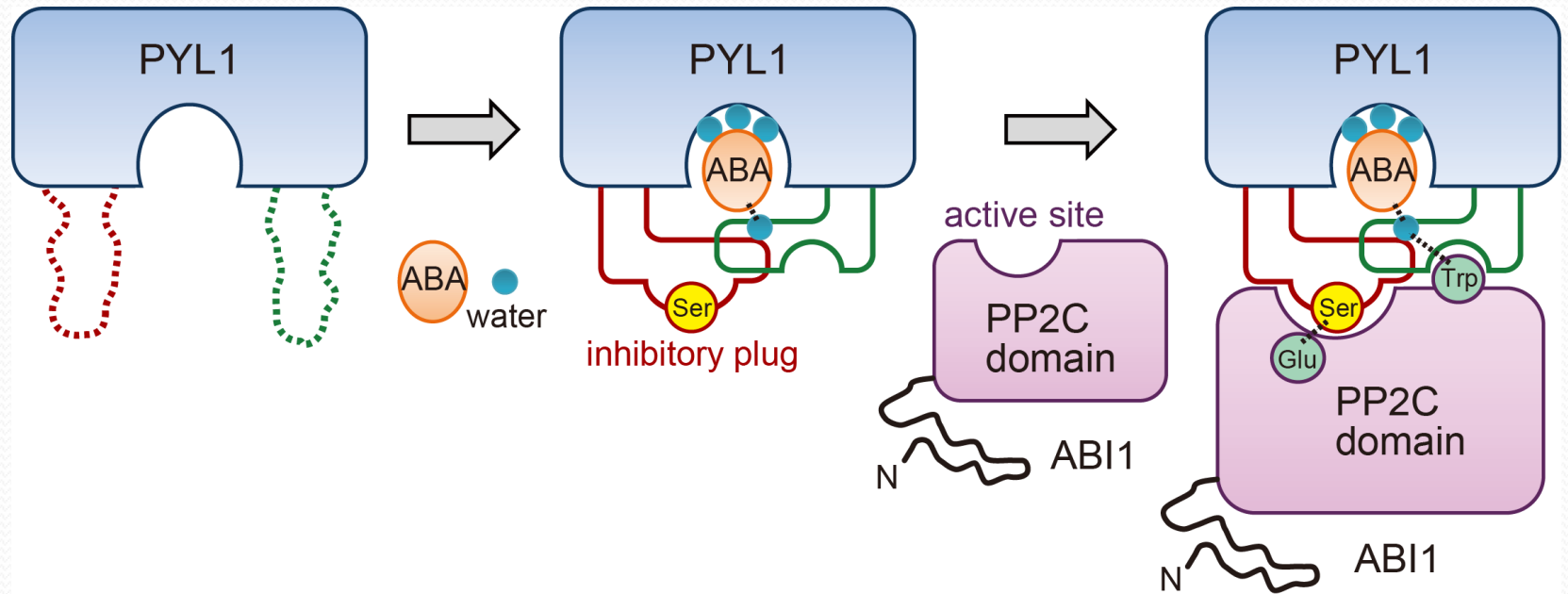
ABA結合型 PYL1とABI1の複合体構造

分解能: 2.1 Å

R/R_{free} (%): 20.1/24.9



PYL1を介したABAによるABI1制御機構



- ① PYL1にABAが結合する。
- ② ABA結合部位の蓋となる2つのループにおいて、ABI1のPP2Cドメインとの結合に重要な構造が形成される。
- ③ ラッチループ(緑)はABI1のW300を捕捉する疎水性ポケットをつくり、ABI1を強く結合して複合体を安定化する。
- ④ ゲートループ(赤)は、ABI1の活性部位にはまり込めるようなプラグ構造を形成し、ABI1の基質となる下流のSnRK2に対する脱リン酸化活性を競合的に阻害する。

今後の放射光への期待

放射光施設でのX線回折データの測定は、BL-6AでAGPを解析していた時代とは比べ物にならないほど短時間で測定できるようになった。

X線の高輝度化、CCDによる検出(取り込みの高速化)、クライオ、波長の切り替え(多波長異常分散法への対応)

様々なタンパク質の立体構造が決定され、構造生物学研究が加速した。

高難度なタンパク質をターゲットとし、結晶自体を得ることが困難に！

微小結晶のスクリーニングまでを考えた放射光施設の利用が望まれ、限られたビームタイムを有効に利用するためには、更なる効率化・高速化が求められる。

メールイン測定サービスの実現、自動センタリング、個々の結晶のX線照射条件の見積もりの自動化(どのような条件でX線を照射すれば、放射線損傷の影響なく十分なデータが得られるか)等を期待したい。