

# 研究報告書

京都大学 大学院理学研究科  
化学専攻 生物構造化学研究室  
博士後期課程 2年 秋山 信彦

課題番号 2007A1828

利用ビームライン BL38B1

課題名 ペリプラズム基質結合タンパク質の X線結晶解析

## 研究概要

### 目的および背景

細菌は、生命維持のためにさまざまな栄養源を周囲から取り込んでいる。この取り込みには種々の膜タンパク質が関与しており、その輸送形態もさまざまである。TRAP (tripartite ATP-independent periplasmic) transporter は、そのような栄養源の取り込みを行う輸送体の一つであり、膜貫通大サブユニット、膜貫通小サブユニット、そしてペリプラズム基質結合タンパク質(periplasmic solute-binding protein, SBP)からなり、グラム陰性細菌に存在している。基質となる物質は、外膜のポーリンを通過してペリプラズム空間に入り、ペリプラズム基質結合タンパク質に結合した後に膜貫通サブユニットに受け渡され、内膜のプロトン電気化学的濃度勾配に依存して細胞質内に輸送される。この TRAP transporter は、詳細な輸送機構や各サブユニットの構造、相互作用の様子などは解明されておらず、その分子機構を構造生物学的に解明することを目的とする。

我々はこれまでに *Thermus thermophilus* HB8 由来の TRAP transporter の SBP である TTHA0766 の構造解析に成功した。その構造から、TTHA0766 は金属イオンを介して基質が結合するというユニークな基質結合様式を有していることが明らかになった。しかし、基質結合の詳細なメカニズムは未だに不明である。このため、1.5 Å を超えるより高分解能での構造解析、さらには基質非結合型の構造や他の基質を結合した構造の解析を行うことが必要である。これにより基質結合による構造変化や結合特異性についての新たな知見を得ることが期待できる。さらには TRAP transporter 特有の輸送メカニズムについての知見を得ることも可能である。

### 実験・解析方法

構造解析は、X線結晶構造解析の手法を用いた。Sitting drop 蒸気拡散法により結晶を作成し、SPring-8 で X線回折データを収集した。

## 結果

本研究では、 $\text{Ca}^{2+}$ と乳酸が結合した構造 ( $\text{Ca}^{2+}$ -lactate form) と乳酸のみが結合した構造 ( $\text{Ca}^{2+}$ -free form) の解析を行った。  $\text{Ca}^{2+}$ -lactate 型の結晶は、PEG 4,000 と iso-propanol を主たる沈殿剤とする条件で得られた。 また、添加剤として OG を加えることで、結晶の質が大きく改善した。  $\text{Ca}^{2+}$ -free 型は、タンパク質溶液に EDTA-Na を加えて熱処理したサンプルを用い、PEG 8,000 を主たる沈殿剤とする条件で結晶を得ることができた。

$\text{Ca}^{2+}$ -lactate 型は BL38B1 において 1.4 Å 分解能のデータを収集し、  $\text{Ca}^{2+}$ -free 型は BL41XU において 1.75 Å 分解能のデータを収集した。 構造解析は、SeMet 置換体を用いた SAD 法によって行った。 データの統計値は Table 1 に示した。

## 考察

全体構造は、2つのドメイン (Domain I, Domain II) からなっており、いずれも  $\alpha/\beta$  構造をとっていた (Figure 1)。 いずれのドメインも、 $\beta$ シートが  $\alpha$ ヘリックスに囲まれる構造をとっていた。 Domain I の  $\beta$ ストランドは、 $\beta 2$ - $\beta 1$ - $\beta 3$ - $\beta 10$ - $\beta 4$  のトポロジーで並んでおり、TTHA0766 が type II の SBP に属していることを示していた。

2つのドメインは、2本のループと1本の長いヘリックスによってつながっており、2つのドメインの間には基質結合のためのクレフトが存在していた。 本研究では、このクレフトに基質が結合した状態の構造を得ることができた。 また、基質結合部位には金属イオンが存在し、基質の結合をアシストしていた。 後述するように、この基質と金属イオンはそれぞれ乳酸と  $\text{Ca}^{2+}$  であると同定した。 基質の結合により、Domain I と Domain II は閉じた構造をとっていた。

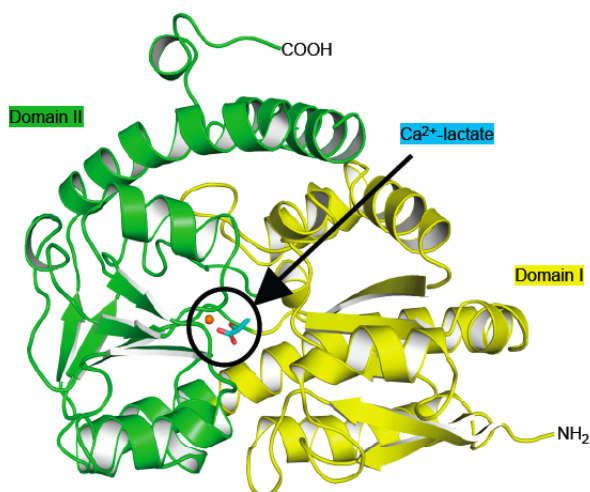


Figure 1. Overall structure of TTHA0766

ドメイン間のクレフトには、金属イオンを介して基質が結合していた (Figure 2)。 この金属イオンと基質は、タンパク質緩衝液や結晶化の沈殿剤に含まれるものではなく、タンパク質の発現・精製の段階から結合しているものであった。 基質は、電子密度の形状と周囲の環境から乳酸であると決定した。

また、金属イオンは周囲の残基と7配位で結合していた。このことから、金属イオンはCa<sup>2+</sup>であることがわかった。これは、異常分散差フーリエ電子密度やX線蛍光スペクトルの結果からも支持された。

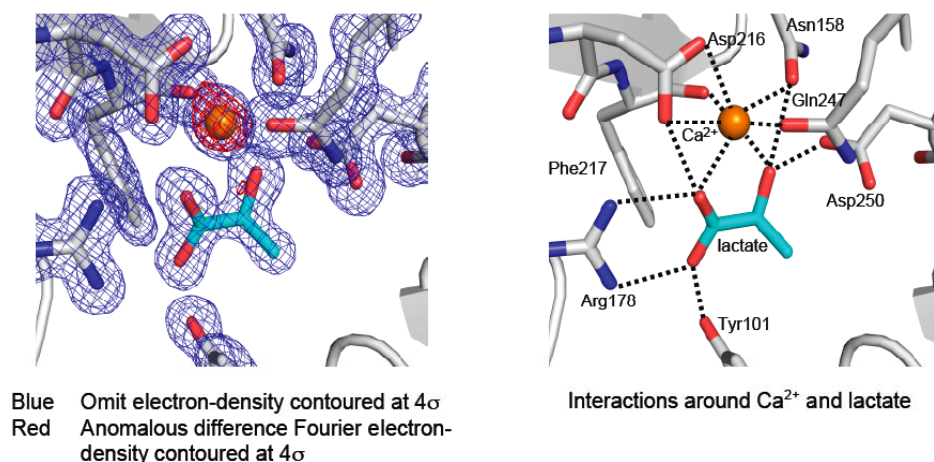


Figure 2. Solute-binding site

TRAP transporter の SBP の構造について、これまでに数例の報告がある。この中で TTHA0766 と最も相同性が高いのは、紅色光合成細菌 *Rhodobacter sphaeroides* 由来の TakP と呼ばれる SBP である。両者の全体構造の r.m.s.d. は 1.55 Å (for 300 Cα atoms) であり、類似していた。しかし、C 末端の構造は両者で大きく異なっていた (Figure 3)。TakP は C 末端の約 40 残基が、隣接する分子とヘリックスを交換し (helix-swap), 安定な二量体を形成している。TTHA0766 も結晶中で TakP と類似の二量体を形成しているが、C 末端は約 30 残基で TakP よりも短く、隣接する分子とのヘリックスの交換は見られなかった。このため、TTHA0766 の二量体接触面積は TakP よりもかなり少なく、安定な二量体を形成しないことが示唆された。

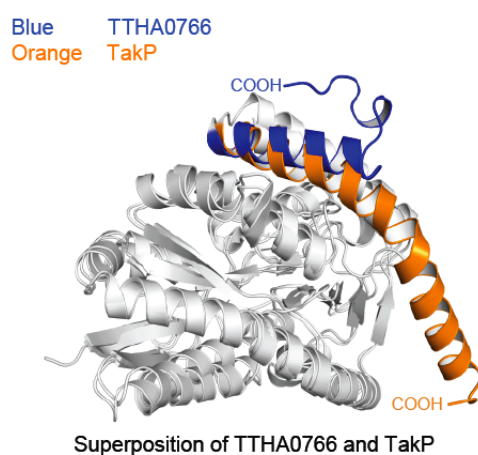


Figure 3. Comparison of overall structures between TTHA0766 and TakP

TakP はα-keto 酸結合タンパク質で、基質結合部位にピルビン酸が結合した状態の構造が報告さ

れている。また、基質結合に  $\text{Na}^+$  が関与していた。TTHA0766 と TakP の基質結合様式を比較すると、それぞれの金属結合様式は類似していた (Figure 4)。また、TTHA0766 の Arg178 と TakP の Arg177 は、それぞれの基質のカルボキシル基と塩橋を作っていた。このアルギニンは TRAP transporter の SBP で高度に保存されている。このため TRAP transporter の SBP は、保存されたアルギニンと基質のカルボキシル基との塩橋形成が、基質の結合に不可欠であることを示している。

一方で、それぞれの基質のメチル基部分と周囲の残基との疎水性相互作用は、大きく異なっていた。TTHA0766 では、乳酸のメチル基が Phe98 と Leu100 との疎水性相互作用によって安定化されていた。したがって、TTHA0766 の基質結合部位は乳酸の結合に適した構造をとっており、水素結合やイオン結合だけではなく疎水性相互作用も基質特異性の実現に寄与していることを示している。

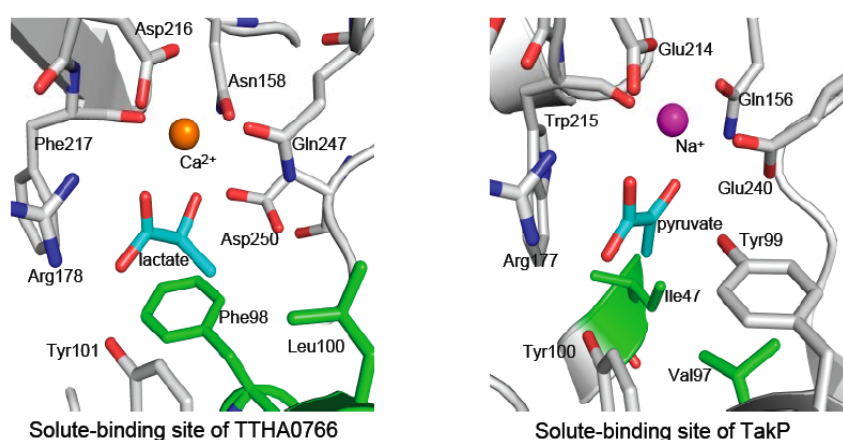


Figure 4. Comparison of solute-binding sites between TTHA0766 and TakP

$\text{Ca}^{2+}$ -free 型の構造は、非対称単位中に 4 分子存在した。4 分子の  $\text{Ca}^{2+}$  結合部位のうち、1 分子については  $\text{Ca}^{2+}$  を置いたが、残りの 3 分子については電子密度や温度因子から水分子を置いた。乳酸については 4 分子いずれも電子密度が確認できた。したがって、 $\text{Ca}^{2+}$  は乳酸の結合に必ずしも必要ではないことがわかった。しかし、 $\text{Ca}^{2+}$  を置いた分子については、タンパク質分子の温度因子 ( $19.7 \text{ \AA}^2$ ) が他の 3 分子 ( $21.1/25.4/24.7 \text{ \AA}^2$ ) よりも低く、この分子に結合している乳酸 ( $24.4 \text{ \AA}^2$ ) も他の分子に結合している乳酸 ( $34.8/43.7/29.2 \text{ \AA}^2$ ) よりも温度因子が低かった。このことから、 $\text{Ca}^{2+}$  はタンパク質分子の安定性ととも、乳酸の安定した結合にも寄与していると考えられる。

また、 $\text{Ca}^{2+}$ -lactate 型では His246 が Asp216 と水素結合を形成していたが、 $\text{Ca}^{2+}$ -free 型では His246 が Asp216 と水素結合を形成できないコンフォメーションをとっていた (Figure 5)。このことは、pH 変化による His246 のプロトン状態の変化によって、 $\text{Ca}^{2+}$  結合が制御されている可能性を示唆している。

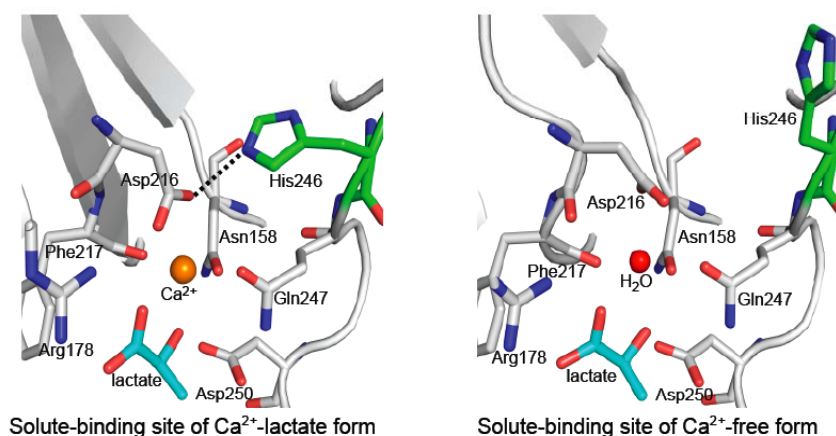


Figure 5. Comparison of solute-binding sites between Ca<sup>2+</sup>-lactate form and Ca<sup>2+</sup>-free form

Table 1.

Crystallographic data collection and refinement statistics for TTHA0766

	Ca <sup>2+</sup> -lactate	Ca <sup>2+</sup> -free	SeMet
<i>Data collection</i>			
Space group	<i>P</i> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	<i>C</i> 2	<i>P</i> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
Unit cell parameters			
<i>a/b/c</i> (Å)	75.1/77.3/136.4	162.8/103.5/90.8	74.9/77.3/136.5
$\beta$ (°)		101.9	
Wavelength (Å)	1.0000	1.0000	0.9790
Resolution (Å)	50.0 – 1.40	50.0 – 1.75	50.0 – 1.75
(outer shell)	(1.42 – 1.40)	(1.81 – 1.75)	(1.81 – 1.75)
Total reflections ( <i>I</i> > 0)	762306	443523	903750
Unique reflections ( <i>I</i> > 0)	147549	133774	153798
Redundancy <sup>a</sup>	5.2 (3.1)	3.3 (1.8)	5.9 (2.9)
Completeness (%) ( <i>I</i> > 0) <sup>a</sup>	93.7 (88.3)	90.1 (71.0)	98.6 (90.8)
<i>R</i> <sub>merge</sub> <sup>b</sup> (%) <sup>a</sup>	3.9 (19.7)	5.9 (20.7)	9.6 (19.2)
<i>l</i> / $\sigma$ ( <i>l</i> ) <sup>a</sup>	32.8 (4.1)	18.9 (3.3)	17.3 (4.2)
<i>Phasing statistics</i>			
FOM			0.37
FOM after RESOLVE			0.66
<i>Refinement statistics</i>			
Resolution (Å)	50.0 – 1.40	50.0 – 1.75	
<i>R</i> <sub>work</sub> / <i>R</i> <sub>free</sub> (%) <sup>c</sup>	16.6/18.6	17.7/20.7	
Number of atoms			
Protein	5301	10549	
Lactate/Ca <sup>2+</sup>	12/2	24/1	
Water	940	921	
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> /Glycerol		10/12	
Average B factor (Å <sup>2</sup> )			
Protein	14.2/18.0	21.1/25.4/19.7/24.7	
Lactate/Ca <sup>2+</sup>	12.0/12.3	33.0/34.3	
Water	30.3	32.8	
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> /Glycerol		40.1/43.5	
R.m.s. deviations			
Bond lengths (Å)	0.011	0.009	
Bond angles (°)	1.55	1.44	
Ramachandran plot (%) <sup>d</sup>	94.3/5.0/0.7/0.0	93.6/6.0/0.4/0.0	

<sup>a</sup> Values for the outermost resolution shell are in parentheses.

<sup>b</sup>  $R_{\text{merge}} = \frac{\sum_{hkl} \sum_i |I_{hkl,i} - \langle I_{hkl} \rangle|}{\sum_{hkl} \sum_i I_{hkl,i}}$ , where  $I_{hkl,i}$  is the  $i^{\text{th}}$  observed intensity and  $\langle I_{hkl} \rangle$  is the average intensity over symmetry equivalent measurements.

<sup>c</sup>  $R_{\text{work}} = \frac{\sum ||F_o| - |F_c||}{\sum |F_o|}$ , where  $F_o$  is observed and  $F_c$  is calculated structure factors, respectively.  $R_{\text{free}}$  is the same as  $R_{\text{work}}$ , but calculated for 5% of randomly chosen reflections that are omitted in the refinement.

<sup>d</sup> Most favored/ additionally allowed/ generously allowed/ disallowed regions.