

論文の内容の要旨

応用生命化学専攻
平成 12 年度 博士課程入学
氏名 本間 康平
指導教官名 田之倉 優

論文題目

大腸菌由来ニトロ還元酵素 NfsB の相図による結晶化条件最適化と F124S 変異体の結晶構造解析

現在環境に存在するニトロ化合物のほとんどは人間の活動によるものである。爆薬、農薬、染料、可塑剤などの製造段階で大量に使われており、大きな環境汚染の問題となっている。このためニトロ化合物の分解、代謝機構は環境工学の観点から興味深い。実際にニトロ化合物を代謝する菌による TNT などの環境汚染物質の浄化は活発に研究されている。

大腸菌では NfsA, NfsB, NfsC などのニトロ還元酵素があり、その中で NfsA と NfsB は生化学的研究が進んでいる。本研究の試料である NfsB は補酵素として FMN を有し、反応速度論的解析により Ping Pong Bi Bi 機構であると判明した。この酵素では第一基質の NADH または NADPH から 2 電子を受け取った補酵素の FMN が、第二基質のニトロ化合物に電子を与え還元させる。しかし、構造に基づいた反応機構の詳細はまだ不明なままである。

1 大腸菌由来ニトロ還元酵素 NfsB の結晶化条件最適化

タンパク質分子の作用機構を解明するための立体構造決定は主にタンパク質結晶の X 線結晶構造解析で行う。しかしタンパク質は結晶化させることが容易ではない。タンパク質の結晶化が困難な理由は、タンパク質の化学的、物理的性質が多様であるためにその結晶化条件も多様であるのに加えて、タンパク質の結晶化条件のパラメータも、タンパク質濃度、結晶化剤の種類、結晶化剤濃度、温度、pH など多様であるからである。このことは確

かに結晶化溶液条件設定の困難さを表しているが、同時に適切な溶液条件を選んでやれば結晶化をコントロールできる可能性があるということを表している。タンパク質の結晶化パラメータが変化すると、結晶析出の有無、結晶形、結晶の大きさ、結晶析出までの時間と、結晶化の挙動、様子にあらゆる変化をもたらす。パラメータに依存した、それらの挙動を網羅的に解析するために、マッピングという手法で結晶のモルフォロジーについての形態的な相図（モルフォドロム）を描く必要がある。

モデルタンパク質として大腸菌由来ニトロ還元酵素 NfsB の析出状態や結晶の形態などの様子を、[タンパク質濃度-沈殿剤濃度]の平面上にモルフォドロムとして表した。パラメータを細かく網羅的に変化させることで NfsB の結晶化の全体像を把握出来るようになる。まず、良質な結晶化を実現させるため精製方法を再検討した。菌体破碎後に硫酸分画の行程を加えた。また、各段階で補酵素である FMN を添加し、常に過剰量存在するように改良した。これにより SDS-PAGE による純度検定で 99%以上の純度を実現した。次に以前の結晶化条件を再検討した。以前の結晶化条件は、100mM MES buffer (pH6.0)、ポリエチレングリコール (PEG) 4,000 20% (w/v)であったが、pH を MES Buffer の緩衝能の範囲 (5.5-7.0) において 0.2 刻みで、また沈殿剤である PEG の濃度と種類 (分子量) を 6,000 と 10,000 に換えて検討をおこなった。その結果、pH は 5.5、PEG 4,000 10% (w/v)程度において最良の結晶が得られることが明らかになった。これ以後の実験には結晶化剤は 100mM MES buffer (pH5.5)、PEG 4,000 を用いた。また、NfsB は結晶化添加剤として NAD^+ を添加すると、対称性の高い正方晶の結晶が得られるが、 NAD^+ の添加量についても検討した。0.1M, 0.2M, 0.5M の NAD^+ を、結晶化溶液量の 1/10 量添加して検討した。その結果、0.1M の NAD^+ で得られる結晶が最も析出が早く良質であったので、これ以後の実験において添加剤はこれを用いた。

従来、タンパク質の結晶化実験で取られる蒸気拡散法はタンパク質試料が少量で済み、かつ濃縮されることにより結晶化条件をある程度検索出来るという利点があるが結晶化溶液の状態は変化していくため、結晶化の全体像を把握することは出来ない。ここでは結晶化の全体像を知るために、結晶化方法はマイクロバッチ法を用いた。この方法は試料調製後にサンプルは外部の系との接触がないので、NfsB の結晶化のモルフォロジーを [NfsB 濃度-沈殿剤濃度] 平面上に点としてマッピングすることが出来る。また、野生型 NfsB と同様のモルフォドロムを F124S 変異体について作製した。さらに、野生型と変異体において NAD^+ を添加した系についても作製した。F124 は活性ポケットの一番奥に位置することから、F124S 変異体の結晶化条件は野生型の結晶化条件と大差はないと予測されていたが、 NAD^+ 添加の系においても無添加の系においても、野生型と変異体の結晶化モルフォドロムの比較によって、確かに差がないことが明らかになった。

次に沈殿剤である PEG 4,000 の蒸気輸送速度の定量化をおこなうことにより、蒸気拡散法による結晶化ドロップの濃縮履歴を把握することが出来た。この情報によりこれまで把握しにくかった蒸気拡散法での結晶化のコントロールが可能になり、欲しい結晶を欲しい日数で得られるようになった。

本章における結晶化のモルフォドロム作製等の実験によって、NfsB 結晶化条件の全体像が把握出来、結晶化の自在なコントロールも可能になった。

2 タンパク質結晶成長研究への新たな試み

タンパク質の結晶化条件のパラメータには、上に挙げた化学的なパラメータの他に、重力、磁場、対流など物理学的なパラメータが存在する。そのようなパラメータがタンパク質の結晶化にどのような影響があるか、特殊な実験環境下において盛んに研究されている。

本章ではクリノスタットという一種の回転装置を用いて NfsB の結晶化実験をおこなった。三次元クリノスタットは、直交する二軸を、三次元的にむらなく回転させることにより、試料搭載面の試料に印加される重力ベクトルの方向性が打ち消され、時間的な平均としての重力効果が相殺されて、擬似的な微小重力環境が作出される装置である。これをタンパク質の結晶化に利用した例はまだ報告がなく、初めての試みである。

搭載試料の調製はモルフォドロムの結果を利用してマイクロバッチ法でおこなった。クリノスタットのハード的な制限により、結晶化プレートは蒸気拡散用プレートを用いてハンギングドロップ方式でおこなったが、結晶化ドロップ溶液の沈殿剤濃度とスポンジ状のリザーバ保持材に浸潤させる沈殿剤溶液の沈殿剤濃度を同一にして行った。これにより、通常の密閉型バッチ法と同様の結晶が得られる。コントロールとしては、同一の結晶化条件のプレートを表置きと裏置きの2通りでおこなった。

このコントロールプレート裏表とクリノスタット搭載試料の比較において、興味深い観察がされた。つまり、上から下への地球重力の影響で析出した結晶は沈降し、器壁界面あるいは気液界面に囚われて成長したが、クリノスタットでは結晶は界面に完全に囚われることなく溶液中に浮かんだ状態での成長が進んだような観察がされた。器壁界面や気液界面に結晶が沈降してしまうと、極微結晶の取り込みやスタックによって構造解析には適さない結晶になることがある。これがクリノスタットによって沈降が解消され、単結晶のままの成長を可能にしていることが示唆された。また、条件によっては、クリノスタットでは結晶化ドロップ中央部に小結晶の集合ができ、その周りにドロップ中央部で集合を作っている結晶よりもやや大きい結晶が成長しているのが観察された。クリノスタットの回転による流れによって小結晶が集合し、その集合に取り込まれなかった結晶が結果的に溶液中のタンパク質を優先的に取り込み、大きく成長していることが示唆された。

これらの結果を受けて、クリノスタット利用で得られた結晶について、X線回折強度データを収集した。その結果、コントロールと比較して、結晶の大きさに由来する、より高分解能のデータを得ることが出来たが、結晶の質については顕著な向上がみられなかった。したがって、NfsB の結晶成長へのクリノスタットの効果は、前述した沈降のキャンセル効果と流れの効果であると示唆された。

タンパク質結晶成長へのクリノスタット利用は新たな試みであり、結晶化のパラメータをひとつ増やすことで、構造解析に適した単結晶の育成のさらなる可能性を広げる有意な実験方法である。

3 大腸菌由来ニトロ還元酵素 NfsB F124S 変異体の結晶構造解析

NfsB の F124 を Ser に換えた変異体は野生型 NfsB より高いフラビン還元活性を示すことが分かっており、構造機能相関の観点から興味深い。そこで本章では NfsB F124S 変異体の X線結晶構造解析をおこなった。

前章において最適化された単結晶を用いて解析をおこなった。結晶学的パラメータを計算した結果、この結晶は空間群 $P4_12_12$ 、格子定数は $a = b = 57.4 \text{ \AA}$, $c = 263.3 \text{ \AA}$, $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ であり、野生型の結晶と同じである。すでに結晶構造が解かれている NfsB の野生型の立体構造のモデルを用いて分子置換法による X線結晶構造解析を行った。その結果、 2.0 \AA の分解能で FMN との複合体の構造解析に成功した。その際の NfsB の立体構造モデルの精度を表す統計値は、 $R\text{-factor} = 19.4\%$, $\text{free-}R = 22.8\%$ であった。これは良質な立体構造モデルが得られたことを意味する。

非対称単位中の NfsB はホモダイマーであるが、A 鎖と B 鎖では電子密度マップに差がみられた。A 鎖の S124 残基付近に位置する補酵素 FMN ではイソアロキサジン環の *re face* において NAD^+ とみられる電子密度が現れた反面、FMN の N1 原子に隣接する B 鎖の F70 残基はその電子密度がみだれていた。これは結晶化バッファーに添加した NAD^+ が産物阻害により、活性中心に結合していることを示唆する。しかし、その電子密度は形がはっきりしないため複合 NAD^+ の分子モデルを作成するにはいたらなかった。今までラベリングなど生化学的な研究では FMN の *re face* と相互作用する還元型 NADH のニコチン環の水素は *pro-R* 水素であることがわかっていることから NAD^+ と NfsB の複合体形成の様式は推定可能であった。さらに、野生型の NfsB と F124S 変異体の立体構造モデルを重ね合わせた結果、特に A 鎖の F123, B 鎖の N67, F70 において側鎖が大きく変化し、変異体の構造は野生型に比べて活性ポケットが大きく広がっていることが明らかになった。このことから、NfsB のフラビン還元活性上昇は活性部位の広がりにより、ニトロ化合物よりも大きなフラビン類が基質となり得たと考えられた。