

植物の配糖化酵素の精密構造解析

利用者 鈴木正彦、柳野利也、菅野善明、野田尚信
 所属 青森県農林総合研究センター・グリーンバイオセンター

1. 目的

植物の二次代謝産物の多くは配糖体の形態で存在する。その中には医薬品として重要なステロイドアルカロイド配糖体や花の着色に必要なフラボノイド配糖体が知られている。我々が花色の発現に関与する新規のアントシアニン配糖化酵素を植物（チョウマメ）から単離したところ、アミノ酸配列の相同性は非常に高いが基質特異性の異なる数種の配糖化酵素が存在することが分かった。その様な酵素の基質特異性を解明する上で、高次構造を決定することが必要不可欠である。さらに、活性部位の詳細な水分子の配向やプロトン化の情報を利用し酵素活性や基質特異性を改変することにより、新たな医薬品の創生や、これまでになかった花色を持つ植物の育種が期待できる。そこで本プログラムでは、まず配糖化酵素の大腸菌による組換え大量発現を行い、得られたタンパク質を結晶化しX線さらには中性子による精密構造解析を行うことを目的とする。

2. 実施手順

クローニングしたチョウマメ配糖化酵素（Ct3'5'GT、Ct3GT-A、Ct3GT-B）をコードするDNAを挿入した大腸菌発現ベクターはすでに構築済である。大腸菌でそれらが可溶性として大量に発現できることを確認する。発現できたタンパク質を用い結晶化スクリーニングを行い、結晶成長に適した緩衝液、沈殿剤条件を決定する。得られた結晶を用いX線回折実験を行い配糖化酵素の立体構造を決定する。さらに結晶を大型化し、中性子回折実験を行う。ただし、本タンパク質は可溶性発現、結晶化、X線回折実験を成功させた後、中性子回折実験を実施する必要があり、年度のビームタイムまでに中性子回折実験が実施できない可能性があることから、その場合には替わりに大腸菌大量調製、結晶化可能なシアノバクテリア由来光センサータンパク質BLUFについて回折実験を行う。

3. 実験結果

前述の3酵素をコードするDNAを発現ベクターそれぞれpGEX、pET28及びpQEに挿入し、大腸菌でさまざまな条件で発現実験を行った。その結果、すべてのタンパク質の発現は確認されたが、フォールディングしていない（機能構造を持たない）不溶性タンパク質として発現した。そこでpQEベクターを用いた20の発現を実施したところ、Ct3GT-Aのみ可溶性発現が可能であった。菌体内で発現したCt3GT-Aを精製するため、発現菌体を超音波破碎後、Ni-NTAカラムクロマトグラフィー及び陰イオン交換クロマトグラフィー精製を行った。その結果、Ct3GT-Aは均一に精製することができた。回収率は1Lの培養菌体当たり5.5 mgであった。得られたタンパク質を結晶化する条件を調べるため、結晶化スクリーニングキットCrystal Screen（Hampton Research社）、Wizard（Emerald Biosystems社）及びThe Classics Suite（Qiagen社）を用いて1000条件以上スクリーニングを行った。しかしながら結晶が析出する条件を見出すことはできなかった。

配糖化タンパク質について結晶が得られなかったことから、対象をBLUFタンパク質とし、まずBLUFタンパク質を発現した大腸菌体からBLUFタンパク質を精製した。すなわち超音波破碎した菌体抽出液から45%硫酸アンモニウム沈殿画分を回収し、ゲルろ過及び2回の陰イオン交換クロマトグラフィーによりBLUFタンパク質を精製した。培養液1L当たり10 mgのBLUFタンパク質を得ることができた。得られたBLUFタンパク質はCrystal Screen I, II, Lite及び1/2 IIの192条件、タンパク質濃度9、4.5 mg/mlの2条件、トータル384条件で結晶化を試みた。その結果、BLUFタンパク質の結晶が得られた。いずれの条件もpHは4.6であり、PEGやアルコールの沈殿剤でのみ結晶が得られた。BLUFタンパク質の結晶を大型化するため沈殿剤（10% PEG8000、0.1 M酢酸ナトリウム緩衝液(pH 4.6)、0.2 M酢酸アンモニウム）15 µl、タンパク質溶液15 µlを混合し、結晶化を開始し一晩経過したドロップにマイクロシーディング法で結晶核を添加し、ドロップ中の結晶数が1-2個となるようにシーディングを行った。得られた結晶は1週間後0.8 x 0.6 x 0.6 mm程度まで成長した。

前述の方法で得られた結晶を用いて中性子回折実験を行った。BLUFタンパク質結晶を、重水で調製した14%PEG8000、0.3 M酢酸アンモニウムを含む0.1 M酢酸ナトリウム(pH 4.6)に一晩浸漬した後、結晶を1.5 mmのクォーツキャピラリーに詰め（図1）。浸漬後の結晶には見かけ上大きな変化は見られなかった。phi角度0°及び90°に対しそれぞれ6時間中性子を照射した。回折実験では最大で6-8の回折点を確認できたにすぎなかった。この原因の一つはBLUF蛋白質が多量体構造を取り、結晶格子長が極めて大きいことにあると思われる。

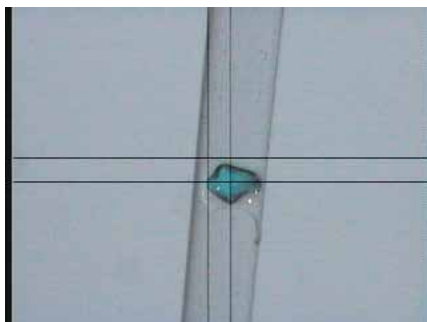


図1 回折実験に用いた結晶

BLUF (Blue-Light Using FAD) No.1 回折像 拡大

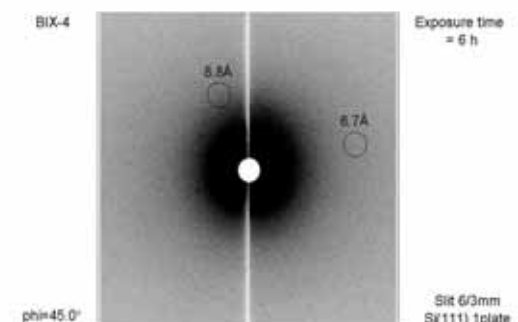


図2 中性子回折像(6時間照射)

植物の転移酵素及び光センサータンパク質の精密構造解析

利用者 佐々木 秀治

所属 青森県農林総合研究センター・グリーンバイオセンター

1. 目的

植物の二次代謝産物の多くは配糖体の形態で存在する。中には医薬品として重要なステロイドアルカロイド配糖体や花の着色に必要なフラボノイド配糖体が知られている。我々が花色の発現に関する新規のアントシアニン配糖化酵素を植物（チョウマメ）から単離したところ、アミノ酸配列の相同性は非常に高いが基質特異性の異なる数種の配糖化酵素が存在することが分かった。その様な酵素の基質特異性を解明する上で、高次構造を決定することが必要不可欠である。さらに、活性部位の詳細な水分子の配向やプロトン化の情報を利用し酵素活性や基質特異性を改変することにより、新たな医薬品の創生や、これまでになかった花色を持つ植物の育種が期待できる。そこで本プログラムでは、まず配糖化酵素の大腸菌による組換え大量発現を行い、得られたタンパク質を結晶化しX線さらには中性子による精密構造解析を行うことを目的とする。

2. 実施手順

図1 Ct3GT-AとFGTのアミノ酸配列の比較及び結晶化促進配列の導入部位

クローニングしたチョウマメ配糖化酵素（Ct3GT-A）は大腸菌で可溶性発現可能であるが、いかなる条件を用いても結晶化ができなかった。これまでに結晶化が困難なタンパク質のヘリックス上に規則的なロイシン（L）残基を導入することで結晶化が可能となることを報告している（*Protein Sci.* 16 1389-1397 2007）ことから、これと同様の試みをCt3GT-Aでも行った。すなわちCt3GT-Aと50%程度のアミノ酸配列相同性があり、すでに構造が報告されているブドウ糖転移酵素（FGT）の立体構造（PDB:2C1Z）から配列導入に適したC末端付近のヘリックスを選択し（図1 立体構造）、分子外側へ向いていると考えられるK409をLに置換したGT-1L、K409/K410をLに置換したGT-2L、K409/K410/D413をLに置換したGT-3L及びK409/K410/D413/K417をLに置換したGT-4Lの調製・結晶化を実施する。ただし、本タンパク質は可溶性発現、結晶化、X線回折実験を成功させた後、中性子回折実験を実施する必要があり、年度のビームタイムまでに中性子回折実験が実施できない可能性があることから、その場合には替わりに大腸菌大量調製、結晶化可能な光センサータンパク質BLUFについて回折実験を行う。

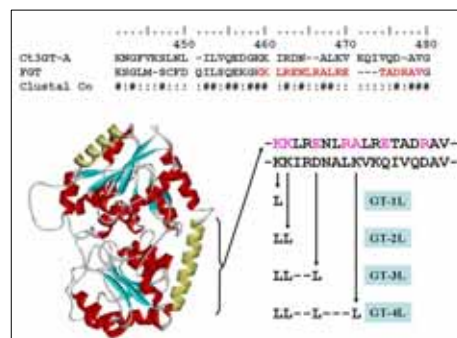


図1 Ct3GT-AとFGTのアミノ酸配列の比較及び結晶化促進配列の導入部位

3. 実験結果

変異体Ct3GT-Aの発現・精製：ロイシン残基を導入したCt3GT-Aの変異体（4種：GT-1L～4L）の発現・調製を行った。1.2 mM IPTG、18 ℃で20時間誘導を行った4リットルの培養液からそれぞれの変異体をHisTrap FFカラム及びResourceQカラムで精製を行った。GT-1Lは培養液1リットル当たり0.85 mgのタンパク質が調製できた。これは野生型Ct3GT-Aの調製量 5 mgの1/6程度であった。一方、GT-4LではCt3GT-AがHisTrapFFカラムの段階でほとんど回収できず調製できなかった。GT-2L、3Lについても同様に精製を行ったところ1リットルの培養液当たりそれぞれ0.6 mg、0.2 mgのタンパク質が調製することができた。



図2 GT-2Lの結晶と結晶化条件

Ct3GT-A変異体の結晶化、X線回折実験：調製できた1L、2L及び3L変異体についてCrystal Screen I及びII（Hampton research社）を用いて結晶化条件のスクリーニングを実施した。その結果、2L変異体で図2に示した条件で結晶の成長が見られた。一方、1L及び3L変異体では2ヵ月後においても結晶成長が見られる条件を見出せなかった。得られた結晶についてX線回折実験を行った結果、Crystal Screen No.37の条件で得られて結晶から3.3 分解能の回折データを得ることができた。空間群はI222、格子定数はa=56, b=119, c=163であり、Ct3GT-Aと44%のアミノ酸配列相同性がある葡萄GTのX線結晶構造を用い分子置換を行ったところ図3(B)の様に初期位相を決定することができた。

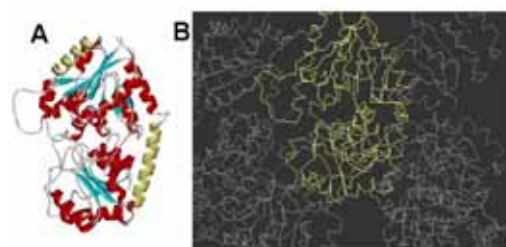


図3 葡萄GT（PDBid:2C1Z：A）のX線結晶構造とCt3GT-Aの結晶内での配置（B）

BLUFタンパク質結晶の中性子回折実験：BLUFタンパク質結晶を重水で調製した14% PEG8000、0.3 M 酢酸アンモニウムを含む0.1 M 酢酸ナトリウム(pH 4.6)に浸漬した後、結晶を 1.5 mmのクォーツキャピラリに詰めた（図2）。浸漬後の結晶には見かけ上大きな変化は見られなかった。phi角度0°及び90°に対しそれぞれ6時間中性子を照射した。その結果、最大で36 程度の回折点のみが確認できた。Ct3GT-Aに関しては結晶化条件をさらに最適化し、より高分解能のX線回折データを得られる結晶を得る。BLUFタンパク質は昨年度から継続して中性子回折実験を行っているが、良好な結果が得られていないことから、さらに大型の結晶取得を試みると共に、稼働予定のJ-PARC利用を視野に入れた実験を計画する必要がある。

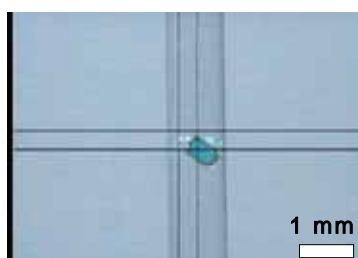


図1 回折実験に用いた結晶

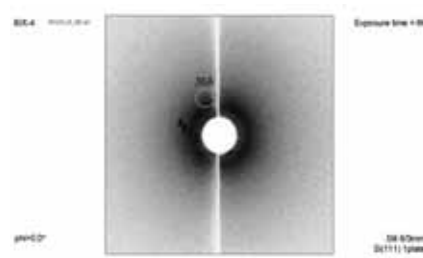


図2 中性子回折像（6時間照射）

植物の糖酵素の精密構造解析

利用者 佐々木 秀治

所属 青森県農林総合研究センター・グリーンバイオセンター

1. 目的

植物の二次代謝産物の多くは配糖体の形態で存在する。その中には医薬品として重要なステロイドアルカロイド配糖体や花の着色に必要なフラボノイド配糖体が知られている。我々が花色の発現に関する新規のアントシアニン配糖化酵素を植物（チョウマメ）から単離したところ、アミノ酸配列の相同性は非常に高いが基質特異性の異なる数種の配糖化酵素が存在することが分かった。その様な酵素の基質特異性を解明する上で、高次構造を決定することが必要不可欠である。さらに、活性部位の詳細な水分子の配向やプロトン化の情報を利用し酵素活性や基質特異性を改変することにより、新たな医薬品の創生や、これまでになかった花色を持つ植物の育種が期待できる。そこで本プログラムでは、まず配糖化酵素の大腸菌による組換え大量発現を行い、得られたタンパク質を結晶化しX線さらには中性子による精密構造解析を行うことを目的とする。

2. 実施手順

Ct3GT-Aの発現・精製及び結晶化：発現ベクターpQE31_Ct3GT-AのDNA塩基配列分析を行ったところCt3GT-AのHisタグはエンテロキナーゼで除去できることが分かった。そこでNiカラム精製後のCt3GT-Aをエンテロキナーゼで処理後、pHを5.0に調整した後、陽イオン交換クロマトグラフィーによりHisタグを除去したCt3GT-Aを精製した。その結果、図1Aに示すようにCt3GT-Aが単一ピークとして得られ、エンテロキナーゼ処理していないCt3GT-Aよりも分子量が若干小さい単一のバンドとして観察され、Hisタグ領域（20残基：約2kDa）が除去されていることが確認された（図1B）。得られたタンパク質試料について結晶化スクリーニングを実施したところ、4条件で棒状の結晶成長が見られ、いずれも酸性条件化、PEGを沈殿剤とした条件であった（図1C）。

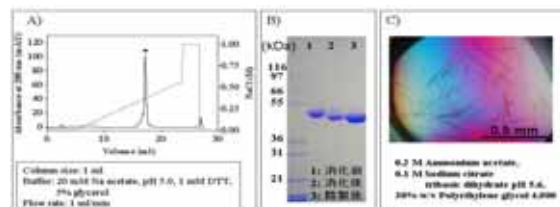


図1 エンテロキナーゼ処理したCt3GT-Aの精製と結晶化
A)陽イオン交換クロマトグラム； B)SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動； C)エンテロキナーゼ処理したCt3GT-Aの結晶

Ct3GT-AのX線結晶構造解析

得られた結晶についてPhoton Factory BL6AでX線回折データの収集を行った。その結果、30秒露光で回折データ（0-180°）を収集し1.8 分解能のデータを得ることができた。回折データから今回得られた結晶はa=50.2、b=55.2、c=86.2 の格子長を有することから中性子回折実験向きの結晶であることが分かった（図2）。また、回折データをR/R_{free}値が18.2/22.6まで精密化を行いCt3GT-Aの1.8 分解能のモデルを構築した（図2）。

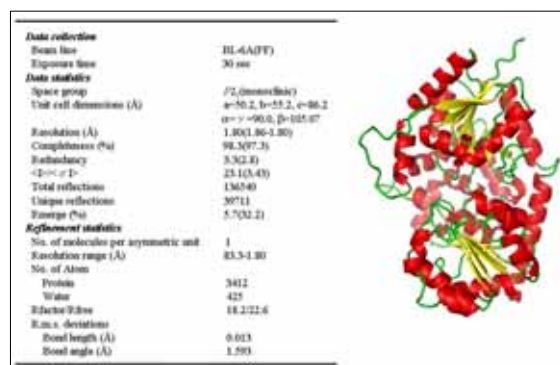


図2 X線結晶構造解析の統計値と1.8 分解能のCt3GT-Aの結晶構造

Ct3GT-AのX線結晶構造解析（グルコース受容体・供与体を含む）

中性子結晶構造解析法で酵素の構造機能解析を行う際には基質となる化合物との複合体との水素結合情報を得ることが重要になる。そこでCt3GT-Aの酵素活性でグルコース受容体となるデルフィニジンやケンフェロール、供与体となるUDP-グルコースとの複合体結晶を作成し、その構造解析を実施した。その結果、化合物を含まない結晶と同等のデルフィニジン結晶については2.2Å、その他は1.8 分解能のデータ得ることができた。今回得られたグルコース受容体の結合状態を以前報告された葡萄糖由来グルコシルトランスフェラーゼの立体構造と重ね合わせたとこ葡萄糖とチョウマメグルコシルトランスフェラーゼのケンフェロールに対する結合方向が全く異なることが分かった。すなわちグルコースが付加される3-OHは、ほぼ同じ座標に存在するが、両グルコシルトランスフェラーゼ間ではフラボノール骨格がO1-C3を結ぶライン（図4A点線）でほぼ180°対称に結合しており、フラボノールのA-C環の角度は23度異なっていた（図4B）。デルフィニジンの結合状態はケンフェロールよりも1位の酸素原子を中心にB環が右回りにおよそ12度回転しており（図3A-B）、B環の3'(5)及び4'位のOH基がプロリン78主鎖Oと水素結合を形成し安定な状態で結合しているものと考えられた。

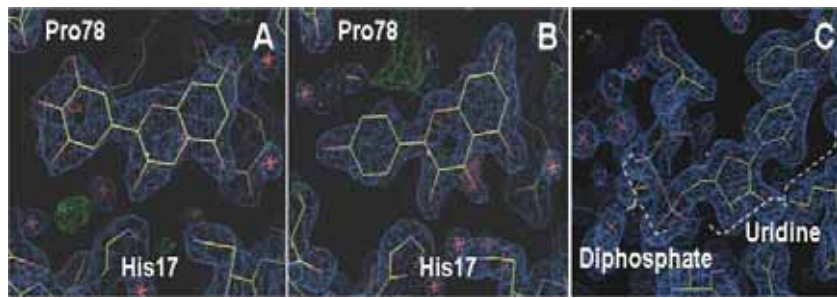


図3 グルコース受容体、デルフィニジン（A）、ケンフェロール（B）及び供与体UDP-グルコース（C）の2|Fo|-|Fc|電子密度マップ

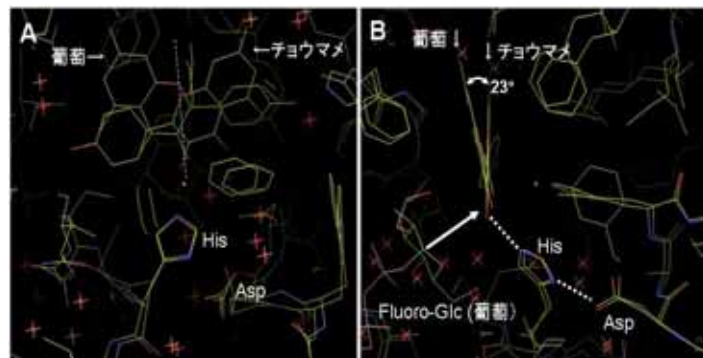


図4 葡萄糖とチョウマメグルコシルトランスフェラーゼにおけるケンフェロール結合方向の違い（A:フラボノール骨格に対し垂直方向視線 B:水平方向視線）

Ct3GT-A結晶の中性子回折実験：先の実験より得られたCt3GT-A結晶の単位格子長はa=50Å、b=55Å、c=86Åであり中性子回折実験に適したものであったが、外形が細長い棒状であり、さらに結晶成長もコントロールが難しかったことから0.05 × 0.05 × 0.5 mm程度の大きさの結晶を用いて中性子回折を試みた。角度を変え12時間及び24時間露光で回折実験を行ったが、いずれも明確な回折点を得ることはできなかった。Ct3GT-Aのフラボノールとアントシアニン認識の違いを知ることができたが、両受容体に対する糖転移の効率の理由を知るためには水素原子を含めた詳細な構造解析が必要であると考えられた。