

時間分割 X 線結晶構造解析の標的: 高度好熱菌 HB8 由来 ADP-Ribose Pyrophosphatase
**ADP-Ribose Pyrophosphatase from *Thermus thermophilus* HB8, as A Target for
Time-Resolved X-Ray Crystallography**

甲斐健太郎^{1,2}, 宮原郁子^{1,2}, 中川紀子^{2,3}, 倉光成紀^{2,3}, 神谷信夫^{1,2}

Kentaro Kai^{1,3}, Ikuko Miyahara^{1,3}, Noriko Nakagawa^{2,3}, Seiki Kuramitsu^{2,3}, Nobuo Kamiya^{1,3}

(¹大阪市立大学理学研究科, ²大阪大学理学研究科, ³理研播磨研究所 / SPring-8)

(¹Graduate School of Science, Osaka City University, ²Graduate School of Science, Osaka
University, ³RIKEN Harima Institute at SPring-8)

e-mail: kai@sci.osaka-cu.ac.jp

1. 時間分割 X 線結晶構造解析

時間分割X線結晶構造解析では、酵素の反応機構を時間軸に沿って四次元的に追跡することができ、反応機構を直接的に解明することができる。しかしながらこの手法には現在でもなお、解決すべき二つの問題が残されている。第一に、より一般的に利用可能な反応開始トリガーを開発する必要がある。これまでのところでは、可視光を外部要因トリガーとしたいいくつかの成功例が報告されているが、多くの酵素に対して可視光に官能して活性化する特性を期待することはできない。可視光を吸収して阻害剤から基質に変化するケージド化合物を利用することにより研究対象を拡大することも考えられるが、ケージド化合物の種類や光による反応効率、バルキーなケージド基による複合体形成能の低下や、光反応後に結晶に与えるダメージなど克服すべき問題が多く、ケージド化合物を利用した時間分割X線結晶構造解析の成功例は数える程しかない。解決すべき第二の問題としては、出発材料となる結晶の回折分解能を向上させる必要がある点があげられる。反応過程に出現する準安定状態は、複数の反応中間構造の混合となる。占有率の低いそれぞれの構造をX線結晶構造解析により同定するためには、より多くの回折点に対する反射強度データが必要となるため、時間分割X線結晶構造解析では、高分解能の回折点を与える結晶を準備することが前提となる。

我々はこれらの問題を克服するために、酵素に一般的な特性として至適pHとガラス転位という二つの特性に着目して、pHと温度をジャンプさせる反応開始トリガー系の開発を目指している。また高い温度で生息する高度好熱菌 (Tt) HB8の酵素群が容易に結晶化すること、その熱安定性から高分解能結晶になり易いと期待できることに着目し、その構造データベースを検索して、まずADP-ribose Pyrophosphatase (ADPRase) をターゲットとしてpH温度ジャンプトリガーによる時間分割X線結晶構造解析を試みることにした。ADPRaseでは後述するように、pHジャンプにより活性化可能な不活性型酵素の基質複合体について結晶構造が既に報告されている。我々は本研究の成果を基礎として、可能な限り多くのTt由来酵素について時間分割X線結晶構造解析を成功させ、それぞれの機能、すなわち反応機構を実証するという側面からシステムバイオロジーの発展に寄与できるものと考えている。

2. 対象となるADPRaseの結晶構造

ADPRaseはNudixファミリーに属する酵素で、Nudixモチーフ(GX₅EX₇REUXEEXGU:Uは通常I、V、L)と呼ばれる共通のアミノ酸配列を有する。ヌクレオチド二リン酸の代謝に関わっており、ADP-ribose(ADPR)からAMPとribose 5'-phosphateへの加水分解を、二価金属依存的に触媒する。これまでの研究から、至適pH(pH6-7)を外れた不活性な条件で二価金属イオンとADPRの複合体が結晶化され、その結晶構造[1]から、活性部位のADPRに隣接した二つの金属結合部位(M、M)が見いだされている。

我々はADPRとZn()の複合体結晶の改良を進め、放射光施設Photon Factoryにて収集したX線回折強度データを基に、1.6 Å分解能の構造決定に成功した。この分解能は時間分割X線結晶構造解析のための条件を満足している。また、pHを若干高くしたpH4.7の条件において三つ目の金属結合部位Mを新たに見いだした。この結晶構造では、MとMのZnイオンは、共に、ADPRのリン酸基とGlu86のカルボキシル基の中間に位置している。またMとMを橋掛けする水分子が、インライン反応機構により進行するヌクレオチド二リン酸の加水分解反応にとって、立体化学的に有利な位置を占めていることも見いだすことができた。

研究会ではこれまでに得られた結晶構造について報告するが、この結晶を出発材料として、低温下の結晶状態において、そのpHを至適pHへジャンプさせ、かつ温度を時間分割X線結晶構造解析の時間分解能に合わせて調節する、すなわちジャンプさせることができるならば、上述した中間状態を経てADPRがインライン機構に従ってAMPとribose 5'-phosphateに加水分解される過程をその場観察できるものと期待している。pH温度ジャンプトリガー系の開発については現在、低温下、結晶のpHをシフトさせるプロトコルを確立するための結晶保存装置を製作中である。

Reference

[1] Yoshida, S. et al. (2004) *J. Biol. Chem.* 279.37163-74