

二重特異性脱リン酸化酵素の結晶構造解析

謝勇¹、竹本千重¹、岸下誠一郎¹、内窪友美、村山和孝^{1, 2}、田仲昭子¹、
寺田貴帆¹、白水美香子¹、横山茂之^{1, 3}

Xie Y¹, Takemoto C¹, Kishishita S¹, Uchikubo T¹, Murayama K^{1, 2}, Tanaka A¹,
Terada T¹, Shirouzu M¹, Yokoyama S^{1, 5}

(¹理研横浜研究所 GSC・タンパク質基盤研究グループ ²東北大学先進医工学研究機
構・生命機能科学分野、⁴東大・院理)

(¹RIKEN, GSC ²TUBERO, Tohoku Univ. ⁴Department of Biochemistry and Molecular
Biology, Univ. of Georgia, USA. ⁴Grad. Sch. Sci. Tokyo Univ)

e-mail: xieyong@gsc.riken.jp

タンパク質のリン酸化・脱リン酸化は、細胞の生理機能調節における中心的なメカニズムのひとつである。基質となるたんぱく質は、特定の位置の Tyr, Ser, Thr 残基に修飾を受けると、核酸やタンパク質への結合能、あるいはそれ自身のリン酸化・脱リン酸化活性が変化する。このように1つのシグナルが、様々なタンパク質のリン酸化・脱リン酸化反応を介して、ネットワークのように伝播し、細胞の分化・増殖・アポトーシスといった細胞応答の制御が行われる。脱リン酸化酵素のうち、二重特異性脱リン酸化酵素(Dual specificity phosphatase, DSP)は、Tyr の脱リン酸化を行うチロシン脱リン酸化酵素(protein tyrosine phosphatase, PTP)のサブファミリーで、Ser/Thr の脱リン酸化も行う¹⁾。ヒトのゲノムには38個の DSP が見つかっており、そのうち16個は、MAP (mitogen-activated protein) kinase の脱リン酸化酵素であることがわかっている。

我々はタンパク 3000 プロジェクトにおいて、ヒトの二重特異性脱リン酸化酵素 DUSP26/MKP-8 の触媒ドメインについて、複数のコンストラクトの可溶性画分への発現を大腸菌のセルフリースシステムによって検討した。その結果、全長211残基のうち151残基の大量発現・精製に成功し、結晶構造解析行ったので報告する。大腸菌セルフリースシステムによって SeMet 体 (0.1 mg/ml, 6.5 ml) を調製した後、光散乱測定によって緩衝液の pH を検討していたところ、4°C で保存中に結晶が析出したため、再調製し (1.7 mg/ml, 0.7 ml)、即座に結晶化実験を行って、良好な結晶を得た。結晶は凍結して、SPring-8 BL26B2 の自動ビームラインに送付し、Web ベースのデータベースシ

ステム D-cha (Database for Crystallography with Home-lab. Arrangement) を利用し、遠隔操作によって回折データの収集を行った。MAD (multiwavelength anomalous diffraction) 法によって構造を決定したところ、非対称単位に 1 分子あり、2 次構造やトポロジーは、最近報告された VHR (human *vaccinia* H1-related phosphatase)²⁾, VHY (H1-related member Y)³⁾, JSP-1 (c-Jun N-terminal kinase stimulatory phosphatase-1)⁴⁾ とよく似ていた。

Reference

- 1) Hunter (1989) *Cell*, **80**, 225-236
- 2) Yuvaniyama *et al.*, (1996) *Science* **272**, 1328-1331
- 3) Yoon *et al.*, (2005) *Proteins* **61**, 694-697
- 4) Yokota *et al.*, (2007) *Proteins* **66**, 272-278