



アシネトバクター由来高付着性三量体オートトランスポーター・ アドヘシン変異体の結晶解析

AichiSR

¹鈴木淳巨、吉本将悟、北原知恵

1 名古屋大学大学院工学研究科 化学・生物工学専攻

1. 背景と研究目的

細菌 *Acinetobacter Sp. Tol5* は、AtaA と呼ばれるタンパク質を細胞表面に持っており、この AtaA を使ってプラスチック、ガラス、金属等の様々な物質の表面に強く接着する。AtaA は、残基数 3630 のペプチド鎖 3 本からなる分子量 1.08 MDa の巨大膜タンパク質で、細胞外ドメインを 37 個も持ち、これらが α ヘリックスの 3 本束 coiled-coil 構造で連結されることにより、全体として剛直で直線的な繊維構造をとる。2014 年 12 月の BL2S1 におけるトライアル利用では、AtaA の N 末端ドメインの結晶解析に成功した。今回は、3 本束 coiled-coil にテルビウム結合サイトを構築した変異体タンパク質の結晶解析を目指す。この変異体は、タンパク質のフォールディングが正しく行われるとテルビウムが蛍光を発するように設計されており、AtaA 繊維が適切にフォールドされていることを確認するセンサーとして働く。本研究では、結晶解析により、当初の設計通りに結合サイトが構築できていることを確認するとともに、より強い蛍光を発するサイトの設計のための構造情報を得ることも目的としている。

2. 実験内容

AtaA の C 末端側のフラグメント¹⁾ (CsalkFL、残基番号 3170~3651) を使い、この中に含まれる 35 番目と 37 番目の α ヘリックス束にそれぞれテルビウム結合サイトを構築した変異体、 α 35 変異体と α 37 変異体を設計した。2 つの変異体タンパク質を大腸菌を使って発現し、クロマトグラフィーによる精製後、結晶化を行った。得られた結晶からの X 線回折データの測定を、ビームライン BL2S1 において行った。

3. 結果および考察

α 35 変異体と α 37 変異体の結晶 (大きさ約 0.1 mm) からそれぞれ 4 Å 分解能と 3 Å 分解能の回折データを得ることができた。野生型の CsalkFL の構造 (PDB ID:3WPA、変異体の結晶と同型) をスタートモデルとして、それぞれの変異体の構造の精密化を行ったが、設計した結合サイトにテルビウムの結合が見られなかった。同じ変異体タンパク質を使った溶液状態における蛍光測定では、結合サイトへのテルビウムの比較的強い結合が確認されている (それぞれ $K_d=1.8 \mu\text{M}$ と $0.3 \mu\text{M}$)。そこで、結晶化と蛍光測定に用いた溶液の組成を比較したところ、結晶化溶液に含まれるクエン酸がテルビウムイオンをキレートし、テルビウムの変異体タンパク質への結合を阻害している可能性があることが判明した。実際に、クエン酸を含む溶液で蛍光測定を行ったところ、変異体へのテルビウムの結合に伴う蛍光は観測されなかった。そこで、現在、クエン酸を使わなくても変異体の結晶が得られる条件をスクリーニング中である。

4. 参考文献

- 1) *J. Biol. Chem.* (2016) **291**(8), 3705-242.