



細胞核融合因子のシステインリッチドメインの結晶構造解析

渡邊信久¹ 河野慎²

1 名古屋大学, 2 京都産業大学

キーワード：植物の有性生殖, 細胞核融合タンパク質, native-SAD 法

1. 背景と研究目的

細胞核の融合は有性生殖における必須の過程のひとつである。被子植物の有性生殖では、重複受精における 2 回の精核融合と雌性配偶体形成時の極核融合の合計 3 回の核融合が観察される。これらの核融合は核膜崩壊と再構成を伴わず、核膜融合によって 2 つの核が融合する。小胞体の分子シャペロン Hsp70 は核膜局在の膜融合タンパク質の機能を調節することで核膜融合を制御していると予想される。本研究は、このような核膜融合タンパク質や、相互作用する因子の構造と機能の解析によって核膜融合の制御機構の解明を目指している。

2. 実験内容

本細胞核融合関連因子のシステインリッチドメインは構造未知の新規タンパク質である。これまで Met の Se-Met 化等も試みたが難航し、比較的小型のタンパク質であるため重原子化も成功していない。本ドメインは Cys を 6 個、Met を 2 個含むため、今回は BL2S1 を用いて native-SAD(S-SAD)法による結晶構造解析を試みた。イオウの異常散乱効果を利用するため、1.5 Å で測定を行った。サイズが十分に大きいタンパク質結晶 (0.5×0.5×0.3 mm) が得られているため、光子数は追及しなくても測定は問題無いとの判断で、1.12 Å 用に集光条件が最適化された分光結晶をそのまま用いた。

Native-SAD 法では、イオウ原子由来の 1% 程度しか無い Bijvoet 差を利用するために測定の冗長性を上げる必要がある。しかし、本ドメインの結晶は空間群が $P2_1$ と対称性が低いため、例えばゴニオの回転軸で全周測定しても十分な冗長性を確保できない。そのため、今回の測定は 1 個の結晶を用いて、BL2S1 に保有する手動 α 結晶マウントアダプタで結晶方位を約 30 度ずつ変えて 3 度全周測定を行った。それにより、各反射の平均測定回数を 9.3 回とすることが出来た。露光時間は 1 度あたり 2 秒、360 度の全周で約 40 分である。

3. 結果および考察

3 度の全周回折測定データを、iMosflm で積分し、Pointless/Aimless でマージ・スケールリングした後、Crank-2 パイプラインで自動構造回折を試みた (CCP4 Program Suite)。Aimless による統計評価では、測定データの実用分解能は 1.59 Å であった。

1.5 Å ではイオウの異常散乱寄与 f' は 0.53e しか無いため、Crank-2 の shelxd の標準トライ数 (2,000 回) では、イオウ原子の部分構造を解くことが出来なかったが、10,000 回 (スクリプトの上限) で、図 1 に

示すように解を得ることが出来、非対称単位中の全 188 残基の構造を構築することに成功した。現在高分解能データを使って、水分子を含む分子構造の精密化を進めている。

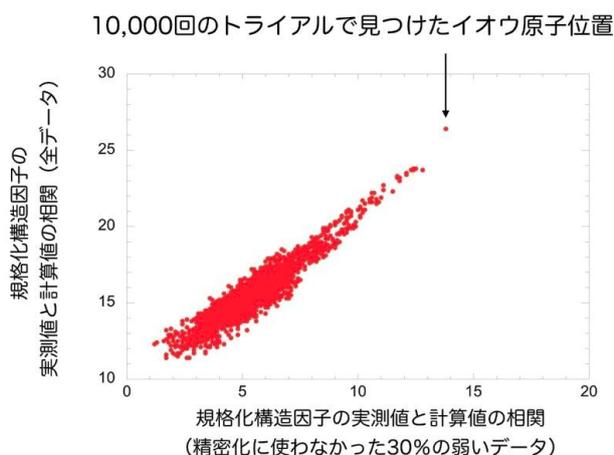


Fig. 1. 部分構造 (イオウ原子位置) の決定.