



ゲルゾリンファミリータンパク質との共結晶化による F 型アクチン原子構造の解明

武田修一
名古屋大学

キーワード：アクチン，ゲルゾリン，カルシウム，活性制御

1. 背景と研究目的

ゲルゾリンファミリータンパク質は様々な病理現象との関連が示されており、その作用機序の解明は非常に重要である。ゲルゾリンファミリータンパク質は複数のドメインからなるアクチン繊維切断タンパク質であり、その活性はカルシウムイオン(Ca^{2+})によって制御されている。種間で広く保存されている Ca^{2+} 結合部位(type-1, type-2 sites)が知られていた。これまでの我々の研究において、真正粘菌におけるゲルゾリンファミリータンパク質の一種であるフラグミンには、上述の2箇所以外に加えて、新規 Ca^{2+} 結合部位が存在することが確認されている。本研究では、この新規カチオン結合部位がゲルゾリンにも存在するのかを確かめるために、ゲルゾリンドメイン2-3(G2-G3)を Ca^{2+} 、および Mg^{2+} 存在下で結晶化し、そのX線構造を決定した。

2. 実験内容

ヒトゲルゾリン G2-G3 は大腸菌を用いて発現・精製した。得られた G2-G3 を用いて、10 mM CaCl_2 、および 10 mM MgCl_2 存在下で結晶化条件のスクリーニングを行った。初期結晶について、さらに結晶化条件を最適化することで、回折実験に適したサイズの結晶を得た。結晶化溶液条件は、カチオンとして Ca^{2+} のみを含む場合とほぼ同様であった。BL2S1において凍結操作を行なった後(100 K)、回折データ測定を行なった(波長:1.12 Å, 検出器:ADSC Q315r)。得られた回折データを備え付けのXDSを用いて処理し、既知の活性化型ゲルゾリン構造(PDB: 3ffk)を探索モデルとしてMolrepにより分子置換法で初期位相を決定した。coot, および phenix refine を用いて構造精密化を行なった。

3. 結果および考察

いくつかの結晶を用いて測定を行ない、最高分解能 1.5 Å の回折データから、構造を決定した。上述のように G2-G3 を材料として結晶を得たが、カチオンとして Ca^{2+} のみを含む場合と同様に、非対称単位中には G3 ドメインのみが2分子含まれていた。おそらく結晶ドロップ中で G2-G3 間の構造的にフレキシブルと予想されるリンカー部位で分解が起こってしまったことが原因であると考えられる。したがって当初の目的であるドメイン間のカチオン結合を検証することはできなかった。構造が得られた G3 は既報のゲルゾリン構造、またカチオンとして Ca^{2+} のみを含む結晶とほぼ同様の構造をしており、type-2 site への Ca^{2+} の結合が観察された (Fig. 1)。本研究の成果は参考文献 1 で報告した。また原子構造は Protein Data Bank (accession code: 6LJE) に登録した。

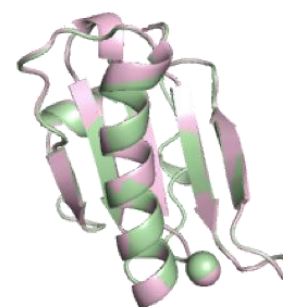


Fig. 1 ゲルゾリンG3(10 mM CaCl_2 および MgCl_2 存在下)の結晶構造(桃:本研究;分解能1.5 Å)を前回の測定で得られたゲルゾリンG3ドメイン構造(緑;10 mM CaCl_2 存在下)と重ね合わせた。Type-2 siteに結合した Ca^{2+} をボールモデルで示す

4. 参考文献

- Novel inter-domain Ca^{2+} -binding site in the gelsolin superfamily protein fragmin
Shuichi Takeda*, Ikuko Fujiwara, Yasunobu Sugimoto, Akihiro Narita, Toshiro Oda, Yuichiro Maéda
J Muscle Res Cell Motil, (2019) DOI: 10.1007/s10974-019-09571-5