



アシネトバクテリア由来高付着性三量体オートトランスポーターと細胞表面提示補助タンパク質の複合体の結晶解析

鈴木淳巨, 小原優季, 吉本将悟
名古屋大学大学院工学研究科 生命分子工学専攻

キーワード : 三量体オートトランスポーター, AtaA, TpgA, タンパク質複合体, 結晶構造

1. 概要

細菌由来の細胞表面接着タンパク質である AtaA とこのタンパク質を細胞表面に運ぶ過程を助けるタンパク質である TpgA の相互作用を明らかにするために、AtaA の膜貫通ドメインと TpgA の複合体の結晶解析を行った。あいち SR のビームライン BL2S1 で放射光 X 線を使った回折実験を行ったところ、3.8 Å 分解能のデータを収集することができた。しかしながら、得られた構造は、TpgA の C 末端側のドメインを欠いており、当初の目的であった TpgA 全長を含む複合体は得られなかった。今後、さらなる結晶化条件の検討や精製プロトコルの改善により、TpgA 全長を含む複合体の結晶解析を目指したい。

2. 背景と研究目的

細菌 *Acinetobacter Sp. Tol5* は、AtaA と呼ばれる接着タンパク質を細胞表面に持っており、この AtaA を介してプラスチック、ガラス、金属等の様々な物質の表面に強く接着する。AtaA 遺伝子の下流には TpgA と呼ばれるタンパク質がコードされており、この遺伝子を破壊すると AtaA の接着機能が低下する。また、TpgA は、AtaA が細胞表面に移行する過程でペリプラズム内で相互作用することが生化学実験から明らかとなった。これらのことから、TpgA は、AtaA の細胞表面への移行、あるいは、立体構造の形成を助ける分子シャペロンと推定されるが、そのメカニズムは不明である。そこで本研究では、AtaA と TpgA の複合体の結晶解析を行い、その構造から、TpgA の機能を解明することを目的とする。AtaA と TpgA の複合体としては、AtaA の膜貫通ドメイン (AtaA_TM) と TpgA の N 末端ドメインとの複合体である AtaA_TM-TpgA_N の結晶構造が既に解かれている。そこで、本研究では、TpgA の C 末端側ドメインの役割を明らかにすることを目的として、AtaA_TM と TpgA 全長の複合体である AtaA_TM-TpgA_full の結晶解析を目指す。

3. 実験内容

AtaA の C 末端側の膜貫通ドメインフラグメント (AtaA_TM、残基番号 3524~3630) と TpgA 全長をそれぞれ大腸菌で発現し、両者の菌体破砕液を混合して AtaA_TM-TpgA_full 複合体を調製した後、界面活性剤を使って抽出し、クロマトグラフィーにより精製した。結晶化スクリーニングは、市販のスクリーニングキットを使って行い、得られた結晶は液体窒素中で急冷して、回折データ収集用のサンプルとした。回折データの収集では、ビームライン BL2S1 において波長 1.12 Å の放射光 X 線を使い、検出器には、ADSC Q315r (9 分割された検出面の内の左上の 1 つが不良で使用できない) を用い、100K の窒素気流下で行った。回折データの積分には、XDC を用い、回折データのマージには SCALA を使った。構造解析は、AtaA_TM-TpgA_N 複合体を使った分子置換法で行い、得られたモデルは、REFMAC で精密化した。

4. 結果および考察

AtaA_TM-TpgA 複合体の結晶から、3.8 Å 分解能の回折データが収集できた。表 1 に得られた回折データの統計値を示す。結晶構造を解いたところ、結晶中の AtaA_TM-TpgA 複合体は、TpgA の C 末端

ドメインを欠いていた。複合体の精製時、または、結晶化時に C 末端側が失われたものと推測される。このため、得られた構造は、既に結晶解析がなされている AtaA_TM-TpgA_N 複合体とほぼ同じものとなった。今回の複合体と以前に解かれた AtaA_TM-TpgA_N 複合体の構造を重ね合わせてみても、両者の間に有意な差は見られなかった。その一方で、2つの複合体の結晶は、空間群こそ同じだが c 軸の長さに大きな違いがあり（今回の結晶では $a=63.84 \text{ \AA}$ 、 $c=333.3 \text{ \AA}$ であるのに対し AtaA_TM-TpgA_N 複合体の結晶では $a=61.94 \text{ \AA}$ 、 $c=428.9 \text{ \AA}$ ）、分子のパッキングにも大きな違いが見られた。図 1 に、2つの複合体の結晶中での分子パッキングを示す。

表1 回折データの統計値	
Space Group	R32
Cell parameters	
a (\AA)	63.84
c (\AA)	333.324
Resolution range (\AA)	50-3.8 (4.01-3.80)
Total reflections	16,589
Unique reflections	2,832
Completeness (%)	99.9 (100.0)
Redundancy	5.9 (5.7)
$I/\sigma(I)$	7.1 (3.3)
Rmerge (%)	15.9 (46.1)

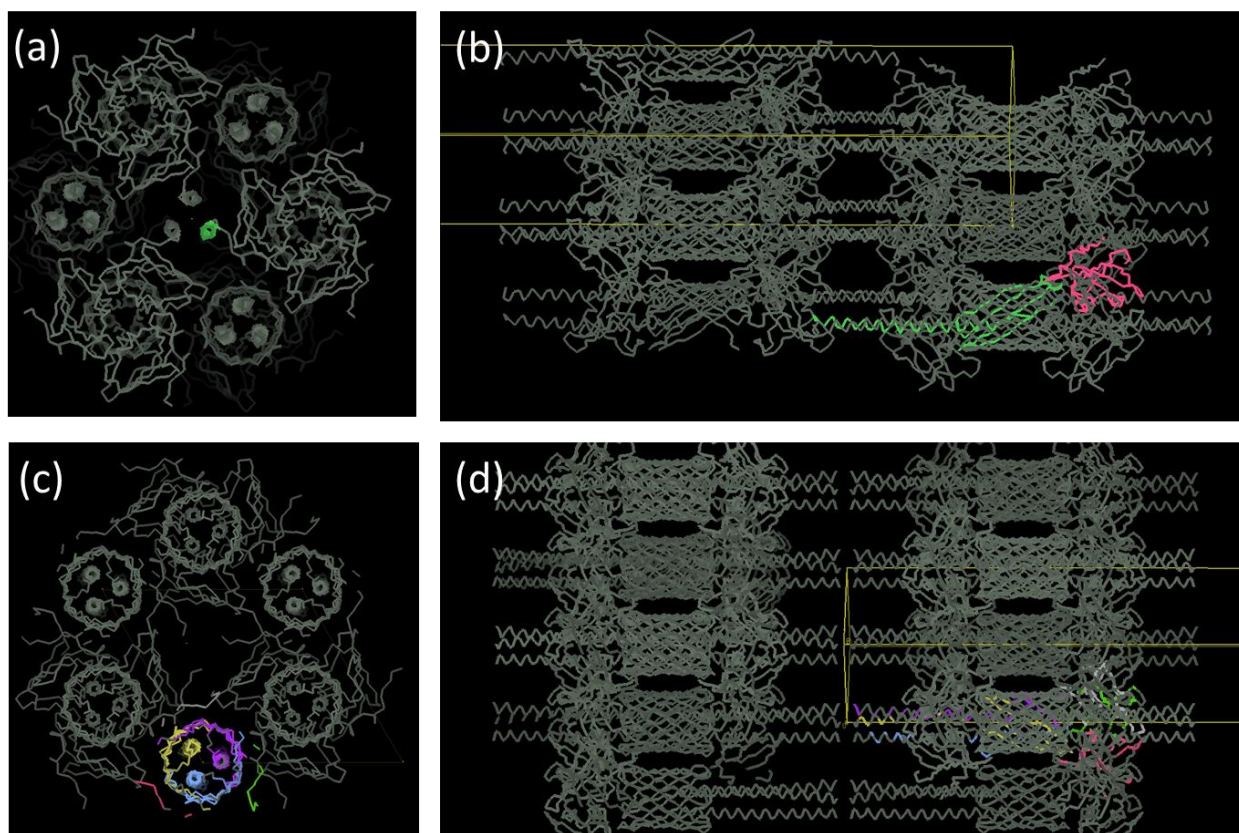


図1 結晶中での複合体のパッキング

(a)(b)今回の複合体の結晶中でのパッキング、(c)(d)AtaA_TM-TpgA_N 複合体の結晶中でのパッキング。
(a)(c)は c 軸方向から、(b)(d)は c 軸と種直な方向から見ている

5. 今後の課題

本研究の最終目標は、全長の TpgA を含む AtaA_TM-TpgA_full 複合体の結晶構造を得ることである。今後、この目標達成のために、(1)今回とは別の結晶化条件で得られた結晶の構造解析を行う、(2)精製プロトコルや結晶化プロトコルに変更を加える、を予定している。

6. 参考文献

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