



## Lys48 型ユビキチン鎖変異体の X 線結晶構造解析

佐藤匡史<sup>1</sup>, 矢木宏和<sup>1</sup>, Methanee Hiranyakorn<sup>2,3,4</sup>, 矢木真穂<sup>1,2,3,4</sup>, 加藤晃一<sup>1,2,3,4</sup>

1 名古屋市立大学・大学院薬学研究科, 2 総合研究大学院大学・物理科学研究科, 3 分子科学研究所・自然科学研究機構, 4 生命創成探究センター(ExCELLS)・自然科学研究機構,

キーワード：ユビキチン, イソペプチド結合

### 1. 背景と研究目的

ユビキチン鎖は、ユビキチンが (イソ) ペプチド結合を介して連結した重合体であり、タンパク質の細胞内における機能や運命を制御する働きを担っている。なかでも、Lys48 を介して連結されたユビキチン鎖は、プロテアソームによるタンパク質分解の目印として機能している。我々はこれまでの研究を通じて、Lys48 を介して連結されたユビキチン 2 量体は、水溶液中で専ら疎水表面を露出した開構造を呈していることを明らかにしてきた。また最近 NMR 解析によって、特定のアミノ酸部位に変異を導入して作製した人工型のユビキチン 2 量体は、天然型のものとは比べて疎水表面の露出度が小さい閉構造の割合が増加することを明らかにした。

本研究では、Lys48 結合型ユビキチン 2 量体 K48C 変異体の結晶構造を取得し、ドメイン内およびドメイン間の相互作用ネットワークの詳細を明らかにする。これにより、ポリユビキチン鎖のコンフォメーションのダイナミクスの分子メカニズムに関する知見を得る。

### 2. 実験内容

Lys48 結合型ユビキチン 2 量体 K48C 変異体の結晶化条件の検討は、ランダム希薄マトリックス法を用いた結晶化スクリーニングによって行った。その結果、4°Cにおいて 2-メチル-2,4-ペンタンジオールを沈殿化剤とする結晶化条件において良質の結晶を得ることができた。得られた結晶の X 線回折強度データは、BL2S1 ビームライン ( $\lambda=1.1200 \text{ \AA}$ ) を用いて収集した。

### 3. 結果および考察

X 線回折実験の結果、 $1.50 \text{ \AA}$  の回折強度データを収集することができた。結晶は空間群  $P2_1$  に属し、格子定数は  $a=31.2 \text{ \AA}$ ,  $b=25.3 \text{ \AA}$ ,  $c=83.1 \text{ \AA}$ ,  $\alpha=90.0^\circ$ ,  $\beta=91.4^\circ$ ,  $\gamma=90.0^\circ$ であった。得られた回折強度データを用いて、野生型 Lys48 結合型ユビキチン 2 量体の結晶構造 (PDB code: 1AAR) をサーチモデルとした分子置換法により初期位相を決定することができた。最終的に、構造精密化は SPring-8 BL44XU においてデータ収集した  $1.25 \text{ \AA}$  の回折強度データを用いた。得られた初期構造を用いて構造精密化を行った結果、最終的に  $R_{\text{work}}=18.7\%$ ,  $R_{\text{free}}=22.5\%$  の精度で、立体構造を決定することが出来た。

本実験では、あいちシンクロトロン BL2S1A ビームラインを用いることによって、Lys48 結合型ユビキチン 2 量体変異体の X 線回折能の迅速なスクリーニングおよびデータ収集を行うことが出来た。今後は、得られた高分解能の結晶構造を初期構造とした MD シミュレーションによって、K48C 変異がドメイン間の相互作用に与える影響を精査し、ドメイン内およびドメイン間の相互作用ネットワークの詳細を明らかにする。

### 4. 参考文献

なし