

(様式第5号)

X線小角散乱によるヌクレオシド二リン酸キナーゼ融合蛋白質およびストレプトアビジン融合蛋白質の会合構造の解明
SAXS analysis of the assembly forms of nucleoside diphosphate kinase fusion protein and streptavidin fusion protein

新井栄揮、柴崎千枝、清水瑠美、安達基泰
Shigeki Arai, Chie Shibazaki, Rumi Shimizu, Motoyasu Adachi

日本原子力研究開発機構・量子ビーム応用研究センター
Quantum Beam Science Center, Japan Atomic Energy Agency

- ※1 先端創生利用（長期タイプ、長期トライアルユース、長期産学連携ユース）課題は、実施課題名の末尾に期を表す（Ⅰ）、（Ⅱ）、（Ⅲ）を追記してください。
- ※2 利用情報の公開が必要な課題は、本利用報告書とは別に利用年度終了後2年以内に研究成果公開（論文（査読付）の発表又は研究センターの研究成果公報で公表）が必要です。（トライアルユース、及び産学連携ユースを除く）

1. 概要（注：結論を含めて下さい）

蛋白質の空間配置や会合を自在に操作できれば、高密度に空間充填した固定化酵素等の新規機能性分子材料やバイオセンサーの開発、結晶構造解析に有利な結晶格子・空間群を人工創製する技術開発、難結晶性蛋白質を結晶化する新規技術の開発などが可能になると考えられる。我々は、蛋白質の空間配置・会合を制御する研究の一環として、*Deinococcus radiodurans* 由来 DNA 修復促進蛋白質(PprA) の N 末端側に六量体を形成する *Thermus thermophilus* 由来ヌクレオシド二リン酸キナーゼ(TtNDK)を接続した“TtNDK+PprA 融合蛋白質”（以下 TtNDK+PprA と呼ぶ）や、PprA の N 末端側に四量体を形成する *Streptomyces avidinii* 由来ストレプトアビジン(StAv)を接続した“StAv+PprA 融合蛋白質”を作製し、TtNDK や StAv を介した PprA の会合制御の可能性を調査している。今回我々は、PprA 単独と、TtNDK+PprA の X 線小角散乱測定を行い、それらの溶液構造の解明を試みた。得られた散乱曲線から dummy atom model を構築した結果、PprA 単独では直鎖状の会合体を形成するのに対し、TtNDK+PprA は三又に分岐したネットワーク状の会合体を形成する可能性が示された。

To operate the spatial arrangement and assembly of protein molecules is helpful to develop the immobilized enzyme, a biosensor and so on. In order to operate the assembly of the pleiotropic protein promoting DNA repair A (PprA) from *Deinococcus radiodurans* via the nucleoside diphosphate kinase (TtNDK) from *Thermus thermophilus*, we made the TtNDK+PprA fusion protein. In this study, we collected small-angle X-ray scattering profiles of the wild-type PprA and the TtNDK+PprA fusion protein to clarify their assembly forms. Ab initio dummy atom models obtained from the scattering profiles suggest that the TtNDK+PprA fusion protein forms a Y-shaped network, while the wild-type PprA forms the straight chain-like structure.

2. 背景と目的

近年、蛋白質などの複雑な分子において、その機能を保持したまま一定の空間に規則正しく配置させる研究は、新規の分子デバイスの創製のために大きな注目を集めている。例えば、生体高分子を固定化して配置する技術（インクジェット技術、ピン法など）は、DNA チップ・プロテインチップやバイオセンサー等のバイオデバイスの開発に不可欠となっている。しかし、従来の技術は、基板など

の支持体上に蛋白質分子を二次元的に配置させることに止まっている。

一方、生体分子を人工的に三次元配置させた例は、結晶化を除くと極めて少ない。一般に蛋白質結晶は高い含水率（体積の 40~70%程度）を有し、結晶内においても蛋白質分子は基質との結合や酵素活性の発現が可能な例が多数報告されている。また、結晶中の蛋白質は高度な安定化を受けることが知られる。従って、結晶と同程度に蛋白質分子を高密度に充填させ、蛋白質分子の三次元的配列や会合を自在に操作して固定化したり、蛋白質結晶内の分子配置を操作することが可能になれば、それ自身が新しい結晶化技術となるだけでなく、新規の機能性分子材料の創製に繋がると考えられる。

これらの背景から、我々は蛋白質の空間配置や会合構造を操作する技術の確立を目指している。その研究の一環として、多量体構造を有する分子 (TtNDK) を介して空間配置・構造構造を操作したい蛋白質 (PprA) を架橋し、PprA の会合構造の操作を試みた。

3. 実験内容 (試料、実験方法、解析方法の説明)

野生型 PprA は一次元的に連結したオリゴマーを形成すると予想されている[1]。また、変異型 PprA はホモ二量体、TtNDK はホモ六量体を形成することが知られている。今回我々は、大腸菌の遺伝子組換え発現系を利用して、(A) 野生型 PprA 単独、および、(B) 変異型 PprA の N 末端側にリンカーを介して TtNDK を接続した“TtNDK+PprA 融合蛋白質”を調製し、X 線小角散乱測定を行って、(A), (B) の会合構造の解明を試みた。測定条件・解析方法を下記に示す。

ビームライン： BL11

溶媒： 20 mM Tris-HCl buffer pH8.0, 0.2 M NaCl

露光時間： 90 min

カメラ： Pilatus

カメラ長： 2.649 m (コラーゲンを用いて校正)

波長： 1.55Å

上記(A), (B) の二次元散乱像を測定後、プログラム Fit2D を用いて二次元散乱像を散乱曲線に変換した。続いて、溶媒の散乱曲線を蛋白質溶液の散乱曲線から差し引いて蛋白質由来の散乱曲線を得た。更に、得られた散乱曲線から、プログラム GASBOR[2] を用いて dummy atom model を構築し、(A), (B) の構造を比較した。

4. 実験結果と考察

まず、野生型 PprA 単独における散乱曲線の濃度依存性を評価した(Fig.1a)。2~5 mg/ml の野生型 PprA

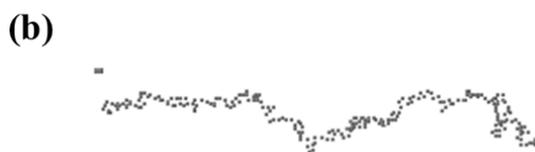
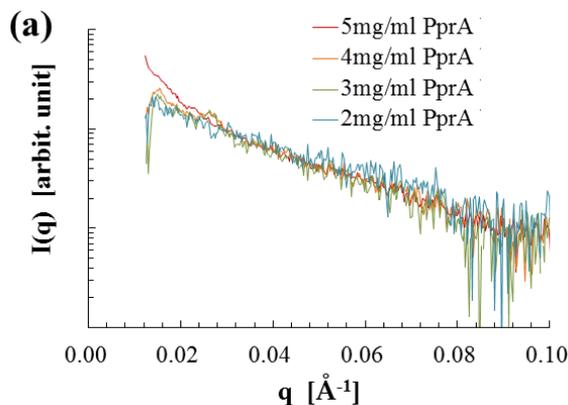


Fig. 1 (a) 野生型 PprA 単独における散乱曲線の濃度依存性。(b) GASBOR によって構築した野生型 PprA の dummy atom model。

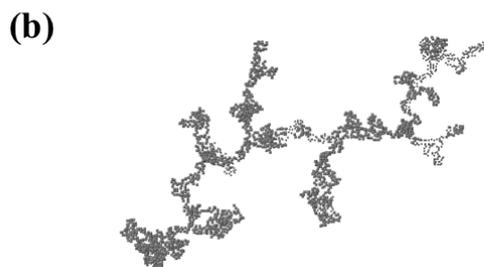
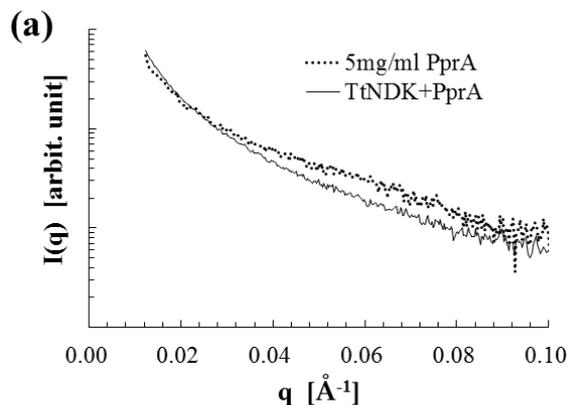


Fig. 2 (a) 5mg/ml PprA 単独および 2mg/ml TtNDK+PprA における散乱曲線の比較。(b) GASBOR によって構築した TtNDK+PprA の dummy atom model。

の散乱曲線は類似したプロファイルを描くが、 $q < 0.03 \text{ \AA}^{-1}$ の小角域においては、PprA濃度の増加とともに散乱強度が増加する。この結果はPprA濃度の増加とともにPprA分子の会合が進行したことを示唆する。比較的精度良く測定できたと考えられる5 mg/ml PprAの散乱曲線から、GASBORを用いてdummy atom modelを構築した結果、当初の予想通り、野生型PprAは直鎖状のオリゴマーを形成することが明らかになった(Fig. 1b)。

続いて、TtNDK+PprAのX線小角散乱測定を行った。TtNDK+PprAは沈殿しやすいため、蛋白質濃度は2mg/mlとした。得られた散乱曲線と、GASBORによって構築したdummy atom modelをFig.2に示す。本研究で構築したdummy atom modelから、TtNDK+PprAは三又の分岐を多く有することが示唆された。即ち、TtNDKを介してPprAの会合構造を改変することができ、PprA単独では形成できないネットワーク構造を形成できることが明らかになった。今回の実験により、蛋白質の空間配置・会合制御技術開発のための基礎的知見を得ることができた。

5. 今後の課題

蛋白質の会合構造を改変することは成功したが、蛋白質の空間配置に規則性を付与する必要がある。そのためには、TtNDKとPprA間のリンカー配列を調整したり、StAv等TtNDK以外の架橋分子の利用も検討する必要がある。

6. 参考文献

1. Adachi M, Hirayama H, Shimizu R, Satoh K, Narumi I, Kuroki R. Interaction of double-stranded DNA with polymerized PprA protein from *Deinococcus radiodurans*. *Protein Sci.*, (2014) 23, 1349-1358.
2. Svergun, D.I., Petoukhov, M.V. and Koch, M.H.J. (2001) Determination of domain structure of proteins from X-ray solution scattering. *Biophys. J.*, 80, 2946-2953.

7. 論文発表・特許 (注：本課題に関連するこれまでの代表的な成果)

今後、随時発表していく予定

8. キーワード (注：試料及び実験方法を特定する用語を2～3)

PprA、NDK、X線小角散乱

9. 研究成果公開について (注：※2に記載した研究成果の公開について①と②のうち該当しない方を消してください。また、論文(査読付)発表と研究センターへの報告、または研究成果公報への原稿提出時期を記入してください(2015年度実施課題は2017年度末が期限となります。))

長期タイプ課題は、ご利用の最終期の利用報告書にご記入ください。

① 論文(査読付)発表の報告

(報告時期：2017年度末を予定)