

#### (4) X線異常分散測定による好塩性細菌由来 $\beta$ -lactamaseのCs<sup>+</sup>選択性結合部位の発見

新井栄揮<sup>1</sup>、柴崎千枝<sup>1</sup>、清水瑠美<sup>1</sup>、安達基泰<sup>1</sup>、玉田太郎<sup>1</sup>、  
徳永廣子<sup>2</sup>、石橋松二郎<sup>2</sup>、徳永正雄<sup>2</sup>、黒木良太<sup>1</sup>

<sup>1</sup>日本原子力研究開発機構、<sup>2</sup>鹿児島大学

##### 1. はじめに

タンパク質は生物の生命活動のために、金属イオンの電荷数の違いやイオン半径のわずかな違いを識別して結合するなど、緻密な原子・分子認識機構を有する。多くのタンパク質が必須元素の金属を結合することは広く知られている。しかし、タンパク質が必須元素ではないセシウム(Cs)を選択して結合しうるのは、また、その結合部位はどのような構造をしているのか等は明らかとされていなかった。特に、東京電力株式会社福島第一原子力発電所事故によって放出された放射性Csの生物への影響を知るためや、タンパク質を利用したCs吸着剤を開発するためには、タンパク質におけるCs<sup>+</sup>の結合のしやすさや結合部位の構造を解明することが重要と考えられた。

そこで我々は、好塩性タンパク質とCs<sup>+</sup>の相互作用の研究に着手した。好塩性タンパク質は、塩湖・岩塩・塩蔵食品・発酵食品などの高塩濃度環境に生息する好塩性細菌が作るタンパク質である。好塩性タンパク質は、高塩濃度環境に適応するために多く酸性アミノ酸を含有し、多くの負電荷を有することから、Cs<sup>+</sup>を含む様々な金属イオンを結合する可能性があると考えた。本研究では、好塩性タンパク質の中でも比較的高い酸性アミノ酸含量を有し[(Asp + Glu) / (Arg + Lys) = 2.11] (表1)、且つ、大腸菌への遺伝子組換えによって大量調製が可能な好塩菌 *Chromohalobacter* sp. 560由来 $\beta$ -lactamase (以下、HaBLA) について、立体構造の解明とCs<sup>+</sup>結合部位の検出を試みた。

##### 2. 実験

###### 2-1 試料調製

野生型 HaBLA は、アミノ酸配列の 288-289 番目及び 321-322 番目に Asn-Gly 配列を有する。Asn-Gly

配列は、脱アミド化を生じて結晶中のタンパク質分子を不均一化し、回折分解能を低下させる原因となる。そこで、Asn-Gly 配列を Gln-Gly 配列に変異させた疑似野生型 HaBLA (以下、NQ-HaBLA) を標準試料とした。

NQ-HaBLA の遺伝子を組込んだ pET-15b ベクター(Novagen 社製)を作製して、*E. coli* BL21 Star (DE3)の遺伝子組換えを行い、N 末端側に His-tag を付加した NQ-HaBLA を発現させた後、Ni-IMAC カラム (PhyNexus 社製) を用いて NQ-HaBLA の粗精製を行った。続いて、NQ-HaBLA の His-tag を thrombin により切断し、Resource Q カラム (GE Healthcare 社製) を用いた陰イオン交換クロマトグラフィーにより最終精製物を得た。

###### 2-2 結晶作製

NQ-HaBLA の結晶化スクリーニング実験は、96 穴の Intelli-plate (Hampton Research 社製) を用い、PEG/Ion、PEG/Ion2、Crystal Screen、Crystal Screen2 (Hampton Research 社製)、及び、Wizard Screen I、Wizard Screen II (Emerald Bio 社製) などの沈殿剤溶液を用いて行った。続いて、結晶が析出した条件付近において、タンパク質濃度、沈殿剤濃度等を最適化した。最終的には、温度 20°C、タンパク質濃度 30 mg/mL、200 mM 酢酸カルシウム及び 18%(w/v) PEG8000 を含む 100 mM MES buffer (pH6.5)の結晶化溶液 (以下、条件 A) から、回折実験に適用できる NQ-HaBLA 結晶を得た。

###### 2-3 立体構造決定、及び、X線異常分散測定

まず、NQ-HaBLAの立体構造を解明するために、高エネルギー加速器研究機構のPF-ARに設置された NW12A (波長1.000 Å) を利用して、条件Aにおいて

得られたNQ-HaBLA結晶のX線結晶構造を解明した。

続いて、結晶構造中のCs<sup>+</sup>を検出するために、Cs<sup>+</sup>を含む結晶化母液にNQ-HaBLA結晶を浸漬し、SAGA-LSのBL07を用いてX線異常分散測定及びX線回折測定を行った。この測定では、波長1.000 ÅのX線を用いて回折データセットを収集した後、同一の結晶を用いて、CsのX線異常分散効果が現れる波長2.166 ÅのX線により回折データセットを収集した。

全てのデータセットは、NVHオイル (Hampton Research社製) を抗凍結剤とした100 Kの低温条件下において収集した。回折データの指数付け及び積算はXDS<sup>1)</sup>、分子置換法による初期位相決定はMOLREP<sup>2)</sup>を用いて行った。また、構造精密化はREFMAC5<sup>3)</sup>及びCoot<sup>4)</sup>を用いて行った。X線データ収集及び構造精密化の統計値を表2に示す。

### 3. 結果・考察

PF-ARのNW12Aにおいて事前に行った条件AのX線結晶解析の結果、NQ-HaBLAは通常細菌由来のclass c β-lactamaseと高い立体構造相同性を有することが明らかになった (CaのRMSDは1.3 Å程度)。一方、分子表面の静電ポテンシャルは他のβ-lactamaseと大きく異なり、活性部位 (Ser64, Lys67, Tyr150, Glu272, Lys315) の周辺を除いて、ほとんどが負電荷で占められていた (図1)。負電荷密度も、他のβ-lactamaseと比較して顕著に高い値を示した (表1)。これらの特徴から、NQ-HaBLAの分子表面は金属イオンの結合に適することが示唆された。

そこでSAGA-LSのBL07では、Na<sup>+</sup>/Cs<sup>+</sup>の濃度比を0/100 mM (条件B)、75/25 mM (条件C)、90/10 mM (条件D) と変えた3種類の結晶化溶液にNQ-HaBLA結晶を浸漬してX線結晶解析を実施し、CsのX線異常分散効果を利用して、分子表面に結合したCs<sup>+</sup>の検出を行った。その結果、異常分散差フーリエ図において、条件Bでは17.5σレベル、条件Cでは17.0σレベル、条件Dでは9.0σレベルのCs<sup>+</sup>に由来する電子密度を、一分子のNQ-HaBLA当たり一ヶ所検出することに成功した。従って、NQ-HaBLAには少なくとも一ヶ所のCs<sup>+</sup>結合部位が存在し、その部位はNa<sup>+</sup>がCs<sup>+</sup>の9倍量含まれる溶液でもCs<sup>+</sup>を選択して結合することが明らかに

なった。

発見したCs<sup>+</sup>結合部位は、Trp 189側鎖のベンゼン環とのカチオン-π相互作用、及び、配位子となるGln 186主鎖及びThr188主鎖の酸素原子2つによって、Cs<sup>+</sup>を結合していた (図2a)。Cs<sup>+</sup>とTrp 189側鎖のベンゼン環の炭素原子 (Cδ2, Cε2, Cε3, Cζ2, Cζ3, Cη2) との間の距離は3.2~4.0 Åであった。また、Cs<sup>+</sup>とGln186及びThr188主鎖の酸素原子との間の距離は3.1~3.7 Åであった。Cs-O間距離の理論値は3.1~3.3 Åであり<sup>5)</sup>、この値とほぼ一致している。

今回発見したCs<sup>+</sup>結合部位は、Cs<sup>+</sup>の代わりにNa<sup>+</sup>やCa<sup>2+</sup>を含む溶液条件下 (条件A) では水分子を結合していた (図2b)。また、このCs<sup>+</sup>結合部位の構造は、結晶化母液の条件を様々に変えてもほとんど変化せず、例えば条件A~Dや二価金属イオンをMg<sup>2+</sup>、Ca<sup>2+</sup>、Sr<sup>2+</sup>に変えた場合においても、Gln 186とThr188の主鎖酸素原子位置及びTrp 189側鎖のRMSDは0.18 Å以下であった。従って、Cs<sup>+</sup>に適した結合部位の構造が溶媒環境の影響を受けにくく、Cs<sup>+</sup>以外のイオン半径を有する金属イオンに対して親和性が低いことが、高いCs<sup>+</sup>選択性の要因になっていると考えられる。

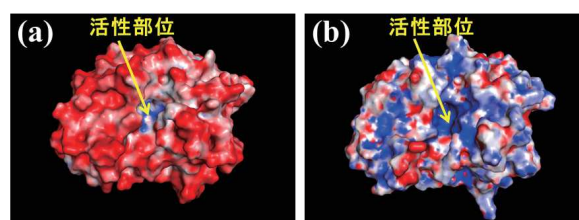


図1 β-lactamase 分子表面の静電ポテンシャル。(a) HaBLA、(b) 相同性の通常細菌 *Enterobacter aerogenes* 由来 EaBLA。赤は負電荷、青は正電荷。

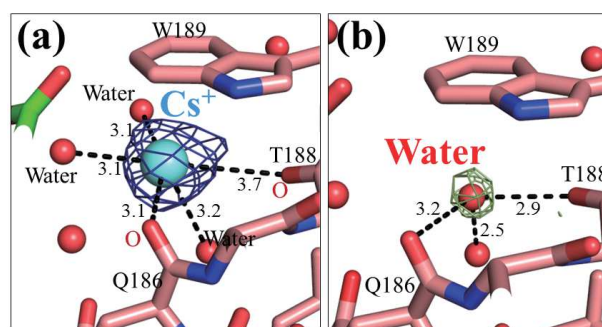


図2 HaBLAのCs<sup>+</sup>結合部位。(a) Cs<sup>+</sup>存在下 (条件B)、(b) Cs<sup>+</sup>非存在下 (条件A)。青のメッシュは5σレベルの異常分散差フーリエマップ。緑のメッシュは、2σレベルの2F<sub>o</sub>-F<sub>c</sub>オミットマップ。

#### 4. まとめ

本研究により、NQ-HaBLA には、Cs<sup>+</sup>に似た性質を有する Na<sup>+</sup>が Cs<sup>+</sup>の 9 倍量含まれる溶液でも Cs<sup>+</sup>を選択して結合する部位が存在することが明らかになった。今回解明した Cs<sup>+</sup>選択的結合部位の構造情報を利用することで、Cs<sup>+</sup>に対する配位子数を増やして NQ-HaBLA の Cs<sup>+</sup>親和性・選択性を更に向上するなどのタンパク質分子設計が可能になる。また、他のタンパク質に Cs<sup>+</sup>結合部位を人工構築することも可能になる。これらの検討を経て、今後は Cs<sup>+</sup>捕集タンパク質材料の実現を目指す。本研究成果は、*Acta Crystallographica Section D*に掲載された<sup>6)</sup>。

#### 参考文献

- [1] Kabsch, W. “XDS”, *Acta Crystallogr. D*, **66**, 125-132 (2010).
- [2] Vagin, A. & Teplyakov, A. “Molecular replacement with MOLREP.” *Acta Crystallogr. D*, **66**, 22-25 (2010).
- [3] Murshudov, G.N., *et al.*, “REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures.”, *Acta Crystallogr. D*, **67**, 355-367 (2011).
- [4] Emsley, P. & Cowtan, K. “Coot: model-building tools for molecular graphics.”, *Acta Crystallogr. D*, **60**, 2126-2132 (2004).

[5] Haynes, W.M. *et al.*, “CRC Handbook of Chemistry and Physics, 94th ed.”, Boca Raton: CRC Press, pp. 12-11-12-12 (2013).

[6] Arai, S. *et al.*, “Structure of a highly acidic  $\beta$ -lactamase from the moderate halophile *Chromohalobacter* sp. 560 and the discovery of a Cs<sup>+</sup>-selective binding site.” *Acta Crystallogr. D*, **71**, 541-554 (2015).

表 1 好塩性  $\beta$ -lactamase (HaBLA)と通常の  $\beta$ -lactamase (EaBLA)に含まれるアミノ酸の比較

	HaBLA	EaBLA
細菌	<i>Chromohalobacter</i> sp. 560 (好塩性細菌)	<i>Enterobacter</i> <i>aerogenes</i> (通常の細菌)
酸性残基数 (Asp + Glu)	32 + 25	12 + 17
塩基性残基数 (Arg + Lys)	18 + 9	13 + 18
酸性残基含量 (酸性/塩基性 残基数)	2.11	0.94
C $\alpha$ 原子の RMSD (Å)	-	1.3
負電荷密度 (e Å <sup>-2</sup> )	1.49 × 10 <sup>-3</sup>	-0.86 × 10 <sup>-3</sup>

表 2 波長 1.000 Å の X 線を用いた NQ-HaBLA の X 線結晶解析の統計値

条件	A	B	C	D
PDB ID	3WRZ	3WS0	3WS1	3WS2
Metal ion in the mother liquor	0.1 M Na <sup>+</sup> 0.2 M Ca <sup>2+</sup>	0.1 M Cs <sup>+</sup> 0.2 M Ca <sup>2+</sup>	25 mM Cs <sup>+</sup> 75 mM Na <sup>+</sup> 0.2 M Ca <sup>2+</sup>	10 mM Cs <sup>+</sup> 90 mM Na <sup>+</sup> 0.2 M Ca <sup>2+</sup>
Space group	<i>P</i> 3 <sub>1</sub> <i>a</i> = <i>b</i> = 114.9	<i>P</i> 3 <sub>1</sub> <i>a</i> = <i>b</i> = 115.4	<i>P</i> 3 <sub>1</sub> <i>a</i> = <i>b</i> = 115.1	<i>P</i> 3 <sub>1</sub> <i>a</i> = <i>b</i> = 115.3
Unit cell (Å, °)	<i>c</i> = 67.6 $\alpha$ = $\beta$ = 90 $\gamma$ = 120	<i>c</i> = 67.7 $\alpha$ = $\beta$ = 90 $\gamma$ = 120	<i>c</i> = 67.3 $\alpha$ = $\beta$ = 90 $\gamma$ = 120	<i>c</i> = 67.5 $\alpha$ = $\beta$ = 90 $\gamma$ = 120
Resolution (Å)	1.80 (1.85-1.80)	2.00 (2.05-2.00)	1.80 (1.85-1.80)	2.10 (2.15-2.10)
Redundancy	5.4 (4.8)	3.7 (4.0)	5.7 (5.6)	3.2 (2.4)
<i>R</i> <sub>merge</sub> (%)	8.3 (26.3)	8.1 (31.2)	4.1 (30.8)	7.9 (40.9)
Completeness (%)	99.9 (99.4)	97.7 (99.9)	99.2 (98.0)	93.7 (91.5)
<i>I</i> / $\sigma$ <i>I</i> (%)	23.1 (15.5)	15.3 (12.4)	18.4 (3.8)	8.7 (1.9)
<i>R</i> -factor (%)	17.2 (15.3)	19.0 (21.9)	18.5 (20.4)	14.4 (12.5)
<i>R</i> <sub>free</sub> (%)	22.1 (19.8)	22.4 (26.0)	21.1 (22.8)	17.4 (17.0)
Metal ions in an asymmetric unit	11 Ca <sup>2+</sup>	2 Cs <sup>+</sup> 10 Ca <sup>2+</sup>	2 Cs <sup>+</sup> 10 Ca <sup>2+</sup>	1 Cs <sup>+</sup> 10 Ca <sup>2+</sup>